



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

Gustavo Augusto Ferreira Mota

**Proteoma miocárdico de ratos com disfunção
cardíaca por estenose aórtica supraválvular atenuada
pelo treinamento físico aeróbico**

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

Orientador: Prof. Emérito. Antonio Carlos Cicogna

Botucatu

2021

Gustavo Augusto Ferreira Mota

**Proteoma miocárdico de ratos com disfunção cardíaca por
estenose aórtica supravalvar atenuada pelo treinamento
físico aeróbico**

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

Orientador: Prof. Emérito. Antonio Carlos Cicogna

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mota, Gustavo Augusto Ferreira.

Proteoma miocárdico de ratos com disfunção cardíaca por estenose aórtica supravalvar atenuada pelo treinamento físico aeróbico / Gustavo Augusto Ferreira Mota. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101002

1. Disfunção ventricular. 2. Estenose da valva aórtica. 3. Miocárdio. 4. Proteoma. 5. Exercício físico. 6. Ratos .

Palavras-chave: Disfunção ventricular; Estenose aórtica supravalvar; Miocárdio; Proteoma; Treinamento físico aeróbico.

Epígrafe

O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las.

Mario Sergio Cortella

Dedicatória



Dedico este trabalho a minha mãe Elza Paula da Mota, que ainda hoje, não mede esforços para que eu tenha a oportunidade de ter um bom estudo, ensinando como seguir o melhor caminho para que eu possa ser feliz neste plano. Mulher, professora, mãe guerreira que abriu mão de sua vida para cuidar dos irmãos portadores de esquizofrenia, aliás, que ainda cuida com tanto amor e carinho da tia Maria a primogênita da família. Infelizmente o tio Evaldo nos deixou em 2016, mas sendo muito bem cuidado até o último minuto pela senhora, tenha certeza, sua passagem para o plano espiritual foi de forma tranquila e serena. Saiba que a senhora é o meu maior exemplo de ser humano a ser seguido no plano terrestre, e seus ensinamentos me conduzem para que eu possa ser uma pessoa melhor e tentar fazer a diferença na vida das pessoas, sempre tentando ajudar o próximo, mesmo que isso signifique sacrificar um tempo que eu não tenho. Sou e serei eternamente grato por tudo que você dedicou a mim, muitas vezes abrindo mão de seus próprios objetivos para que eu alcance os meus. Eu tenho muito orgulho de ser seu filho e muita admiração pela mãe que tenho. Obrigado por tudo. Amo muito você!

Agradecimentos



Este trabalho, por fins acadêmicos, é um trabalho individual, no entanto ele não seria realizado sem a ajuda de pessoas que colaboraram, direta ou indiretamente, para que este objetivo fosse concretizado. A colaboração, não apenas em termos científicos e práticos, mas também como um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, compreensão, etc. Todas as pessoas listadas abaixo são especiais, espero não ter esquecido ninguém.

Agradeço a Deus, pois nele encontro a força que necessito para continuar a minha jornada, neste plano terrestre e almejando o plano espiritual.

Ao meu pai Sebastião Ferreira, que sempre me ajudou da maneira dele para que eu chegasse onde estou hoje. Gostaria de lhe agradecer por tudo o que o senhor fez por mim. Amo você!

À minha irmã Janaina Mota, que mesmo longe sempre me ajudou de forma direta e indireta, torcendo pelo meu crescimento pessoal. Gostaria de lhe agradecer por acreditar em mim. Espero que Deus continue bençoando sua família. Amo você!

A minha esposa Mariana Gatto, que além de companheira de jornada terrestre e também companheira de laboratório e trabalho. Colaborou para a realização deste estudo, além de seu incentivo, amizade, paciência, carinho e por me apoiar nas horas mais difíceis e compartilhar os momentos de felicidade. Acredite, sem você não teria conseguido realizar este trabalho! Amo você!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, por ter aceitado me orientar. Agradeço pelos aconselhamentos no sentido de ser uma pessoa íntegra, ética, disciplinada e competente naquilo que faz, sempre me incentivando a sair da zona de conforto e ir em busca de outros desafios para meu crescimento intelectual e pessoal. Espero que o senhor saiba que nosso relacionamento interpessoal não está ligado somente ao trabalho, te considero como um segundo pai, sempre me ensinando a melhor forma de encarar os problemas da vida pessoal, conjugal, trabalho, etc. Acredito que tive a melhor formação que poderia ter na pós-graduação, mesmo com todas as nossas discussões

acaloradas, teimosia por ambas as partes, mas como o senhor sempre me ensinou, é por meio da diferença de pensamentos que há crescimento intelectual. Espero poder trabalhar e conviver com o senhor por um longo tempo, e após nossa estadia neste plano, nos encontremos no plano espiritual (mesmo que o senhor não acredite nisso). Obrigado por tudo!

Agradeço ao Prof. Dr. Mário Sugizaki, o qual tive a oportunidade de conviver no decorrer da minha iniciação científica e que me incentivou a ingressar na Pós-Graduação, e me incentiva até hoje a continuar na carreira acadêmica. Obrigado por acreditar em mim!

Ao amigo e companheiro de jornada científica, Sérgio Borges, que foi fundamental para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do *Lab. Cic* e agregados, Vitor Loureiro, Paula Gripa, Dijon Campos, Loreta De Tomasi, Luana Pagan, Lidiane, Leiliane, Patricinha, Felipe Damato, Felipe Sarzi, Cristina Gregolin, Jéssica, Mariane, obrigado pela ajuda e convivência. Em especial a Danielle Vileigas, pelo auxílio relacionado à proteômica. Obrigado!

À Profa. Dra. Lucilene Delazari, por me receber no seu laboratório no CEVAP-Unesp, para o preparo das amostras para a realização da proteômica e pelas valiosas contribuições científicas.

À Profa. Dra. Silméia Bazan, por se disponibilizar em fazer as análises ecocardiográficas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, sempre disponível para conversar sobre as análises de bioestatística.

À Profa. Dra. Marília Buzallaf e Larissa, da Faculdade de Odontologia da USP de Bauru, pela realização do sequenciamento peptídico.

Ao Prof. Dr. Daniel Martins, da Universidade Estadual de Campinas, e sua aluna Lígia por nos auxiliarem com a utilização do *Software* Progenesis.

As professoras Dra. Suzana Tanni e Dra. Marina Okoshi, por terem me dado a oportunidade de trabalhar como coordenador de estudo clínico, e pelas conversas e ensinamentos.

Aos Upecliners, Luana, Luiz, Neto, Leiliane, Andressa, Letícia, Priscila, Tati, Ricardo e Danilo Loucura, obrigado pelas conversas e pela convivência.

Aos meus supervisores do estágio docência na enfermagem Professores (as), Dra. Silvia Bocchi, Dra. Meire Novelli e Dr. Rodrigo Jansen, obrigado por todos os ensinamentos e pela confiança depositada em mim. Aproveito para agradecer a minha colega de estágio docência Tayomara, obrigado por compartilhar suas experiências e pensamentos com minha pessoa.

A minha supervisora do PRAT na função pulmonar, Enfª. Estefânia Franco, obrigado por me ajudar na reaproximação da enfermagem e pelos puxões de orelha, seus ensinamentos foram fundamentais para a minha visão da profissão hoje em dia.

Aos professores, Dr. Marcos Minicucci e Dra. Fabiana Souza, pelas orientações prestadas no exame geral de qualificação.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental da FMB (UNIPLEX): José Georgette, que não mede esforços em nos ajudar. Muito obrigado Zé! E em especial ao meu eterno amigo Paulo Dionísio, o famoso Paulinho, cara do bem, sempre alegre e disposto a ajudar o próximo. Infelizmente não poderá ver a minha defesa de tese, partiu cedo para o plano espiritual, mais uma vida ceifada pela COVID-19. É meu amigo, gostaria de te agradecer por tudo que você fez por mim, sempre me motivando e querendo o meu bem. Escrevo essas palavras com dor no coração por não ter mais a oportunidade de ir a sua casa, para tomarmos uma cerveja e conversamos sobre todos

os assuntos possíveis. Muitas vezes não acredito que você se foi, mas sei que está torcendo por mim e pela Mari, de onde você estiver. Até um dia, obrigado por tudo.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Ana Maria Mengue e Janete Herculano Nunes, pela presteza na resolução dos problemas inerentes ao curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica - CNPq, pelas bolsas e auxílio concedidos. Bolsa de Doutorado (processo: 140406/2017-4), fundamental para que eu pudesse realizar este trabalho. Auxílio Universal (processo:421058/2018-8), fomento no qual não teríamos condições financeiras de realizar este projeto. Bolsa produtividade nível 1D de meu Orientador (processo:310284/2019-8), que julgo ser um reconhecimento pelo seu amor e dedicação a este projeto, e aos mais de 50 anos dedicados a ciência básica nesta instituição de pesquisa, ensino e extensão.

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste estudo, os meus sinceros agradecimentos!

Resumo



Resumo

Diferentes autores analisaram o efeito do treinamento físico (TFa) no coração patológico de roedores com estenose aórtica (EAo). Enquanto alguns autores não detectaram alteração no desempenho, outros mostraram que o TF promoveu atenuação da disfunção diastólica e/ou sistólica. Entretanto, estes trabalhos não analisaram os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos desta terapêutica. Desta forma, o objetivo deste estudo é investigar por meio do proteoma miocárdico os mecanismos envolvidos na atenuação da disfunção ventricular pelo TFa em ratos com EAo. Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos: Sham, Sham exercitado (ShamTF), EAo e EAo exercitado (EAoTF). O TFa consistiu em cinco sessões de corrida, em esteira por semana, por 16 semanas. A análise estatística foi realizada por ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis e teste de Goodman. Todos os resultados foram discutidos ao nível de significância de 5%. Ratos EAoTF apresentaram maior capacidade funcional, menor concentração de lactato sanguíneo, atenuação estrutural e funcional cardíaca quando comparados com o grupo EAo. A análise do proteoma miocárdico evidenciou aumento de proteínas relacionadas a via glicolítica, estresse oxidativo, inflamação e diminuição da beta-oxidação no grupo EAo vs Sham. O grupo EAoTF aumentou a expressão de uma proteína relacionada à biogênese mitocondrial e diminuiu proteínas intrincadas com o estresse oxidativo e inflamação. A avaliação das vias fisiológicas e patológicas hipertróficas por Western Blot, não mostrou diferença estatística entre os grupos avaliados, exceto para a p-p38, que aumentou no grupo EAo. Os dados proteômicos foram validados para proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico e glicolítico. A análise do proteoma nos permitiu mostrar que o exercício físico atenua o estresse oxidativo, inflamação e acarreta melhoria no processo de biogênese mitocondrial. Os resultados encontrados nos fazem inferir que estes são os possíveis mecanismos relacionados com a cardioproteção gerada pelo treinamento físico aeróbio neste modelo de sobrecarga pressórica.

Palavras-chave: Proteoma, miocárdio, disfunção ventricular, treinamento físico aeróbio, estenose aórtica supralvar, ratos.

Abstract



Abstract

Different authors have analyzed the effect of physical training (ET) on the pathological heart of rodents with aortic stenosis (AS). While some authors did not detect changes in performance, others showed that ET promoted attenuation of diastolic and/or systolic dysfunction. However, these studies did not analyze the mechanisms involved in the beneficial effects of this therapy. Thus, the aim of this study is to investigate through myocardial proteome the mechanisms involved in the attenuation of ventricular dysfunction by ET in rats with AS. Wistar rats were divided into four groups: C-Sed, Control exercised (C-Ex), AS and AS exercised (AS-Ex). The ET consisted of five treadmill running sessions per week for 16 weeks. Statistical analysis was performed by ANOVA or Kruskal-Wallis test and Goodman test. All results were discussed at a significance level of 5%. AS-Ex rats had higher functional capacity, lower blood lactate concentration, structural and functional cardiac attenuation when compared to AS group. The myocardial proteome analysis showed an increase in proteins related to the glycolytic pathway, oxidative stress, inflammation and a decrease in beta-oxidation in AS vs C-Sed group. The AS-Ex group increased the expression of a protein related to mitochondrial biogenesis and decreased proteins intricate with oxidative stress and inflammation. The evaluation of physiological and pathological hypertrophic pathways by Western Blot did not show any statistical difference between the groups evaluated, except for p-p38, which increased in the AS group. Proteomic data were validated for proteins related to lipid and glycolytic metabolism. Proteome analysis allowed us to show that physical exercise attenuates oxidative stress, inflammation and improves the mitochondrial biogenesis process. The results found make us infer that these are the possible mechanisms related to the cardioprotection generated by physical training in this pressure overload model.

Keywords: Proteome, myocardium, ventricular dysfunction, aerobic exercise training, supraaortic stenosis, rat.

Lista de abreviaturas

Lista de Abreviaturas

A' - Velocidade do anel mitral durante a contração atrial

AE - Diâmetro do átrio esquerdo

AE/AO - Relação entre átrio esquerdo e diâmetro da aorta

AKT - Proteína quinase B

ANOVA - Análise de variância

AT - Átrio

BHADH - beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

CS - Citrato sintase

CK - Creatina quinase

DDVE - Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DP - Distância percorrida

E/A - Razão entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral

E/E' - Relação entre a velocidade de fluxo transmitral e a velocidade de deslocamento do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce

E' - Velocidade de deslocamento do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce

EDPP – Espessura diastólica da parede posterior

EAo - Estenose aórtica supralvar

EAoTF - Estenose aórtica supralvar submetido ao treinamento físico aeróbio

Enc Meso VE (%) - Porcentagem de encurtamento mesocárdico do ventrículo esquerdo

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

ERPVE - Espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo

FC - Frequência cardíaca

FE - Fração de ejeção

FABP3 - Proteína de ligação de ácido graxo

GO - Ontologia genética

IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IC - Insuficiência cardíaca

JNK - c-Jun N-terminal quinase

KEGG - Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto

KOBAS - Sistema de anotação baseado em ontologia KEGG

LDH - Lactato desidrogenase

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

mTOR - Alvo mamífero da rapamicina

MCAD - Acil-CoA desidrogenase de cadeia média

Onda E - Pico de velocidade do fluxo transvalvar mitral na fase precoce de enchimento

Onda A - Pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio.

p38 MAPK - p38 proteína quinase ativadas por mitógeno

PANTHER - Análise de proteínas por meio de relações evolutivas

PCF - Peso corporal final

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PK- Piruvato quinase

RC - Remodelação cardíaca

REVIGO - Sumariza e visualiza longas listas de termos de ontologia genética

Sham - Controle operado

ShamTF - Controle operado submetido ao treinamento físico aeróbio

STRING - Análise de enriquecimento funcional de redes de interação de proteínas

S - Velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral.

TFa - Treinamento físico aeróbio

TT - Tempo total

TRIV - Tempo de relaxamento isovolumétrico

TDE - Tempo de desaceleração da onda E

VD - Ventrículo direito

VE - Ventrículo esquerdo

VENNY - Ferramenta de desenho de diagramas

VEPP - Velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo

VEX - Velocidade de exaustão

Lista de Tabelas e Figuras



Lista de Tabelas

Tabela 1. Adaptação a esteira ergométrica	37
Tabela 2. Protocolo de treinamento físico aeróbio	39
Tabela 3. Teor de água dos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar	56
Tabela 4. Avaliação ecocardiográfica dos 4 grupos após 2 semanas de cirurgia	57
Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica após 18 semanas de cirurgia	58
Tabela 6. Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i>	59
Tabela 7. Função biológica das proteínas do grupo EAO vs Sham	62
Tabela 8. Função biológica das proteínas do grupo EAoTF vs EAO	63

Lista de Figuras

Figura 1. Delineamento experimental.....	36
Figura 2. Teste de esforço progressivo.....	38
Figura 3. Capacidade funcional dos animais	53
Figura 4. Determinação da concentração de lactato sanguíneo.....	54
Figura 5. Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca	55
Figura 6. Agrupamento de dados proteômicos EAoTF vs EAo	60
Figura 7. Agrupamento de dados proteômicos EAo vs Sham	61
Figura 8. Rede de interação proteína-proteína EAo vs Sham	64
Figura 9. Rede de interação proteína-proteína EAoTF vs EAo	65
Figura 10. Análise de enriquecimento de ontologia gênica EAo vs Sham	67
Figura 11. Análise de enriquecimento de ontologia gênica EAoTF vs EAo	68
Figura 12. Expressão proteica da via hipertrófica patológica miocárdica.....	69
Figura 13. Expressão proteica da via hipertrófica fisiológica miocárdica	70
Figura 14. Verificação dos resultados proteômicos por Western blotting	72
Figura 15. Verificação dos resultados proteômicos por espectrofotometria	73
Figura 16. Visão geral dos efeitos da estenose sobre o proteoma de cardiomiócitos ...	86
Figura 17. Visão geral dos efeitos exercício sobre o proteoma de cardiomiócitos	90

Sumário



SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Animais	34
3.2. Delineamento experimental.....	34
3.3. Indução de estenose aórtica supralvar.....	35
3.4. Treinamento físico aeróbio	36
3.4.1. Aclimação	36
3.4.2. Teste de esforço máximo progressivo	37
3.4.3. Protocolo de treinamento	38
3.4.4. Determinação da concentração de lactato sanguíneo	40
3.5. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca.....	40
3.6. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	40
3.7. Caracterização da remodelação cardíaca.....	41
3.7.1. Análise estrutural e funcional por ecocardiograma.....	41
3.7.2. Análise macroscópica <i>post mortem</i>	42
3.8. Análise proteômica <i>shotgun label-free</i>	43
3.8.1. Extração de proteínas.....	43
3.8.2. Quantificação de proteínas	44
3.8.3. Digestão <i>in solution</i>	44
3.8.4. Sequenciamento peptídico por nLC-MS/MS.....	44
3.8.5. Análise quantitativa <i>label free</i>	45
3.8.6. Análise de bioinformática.....	46

3.8.7. Validação por Western Blotting	46
3.8.7.1. Extração das proteínas	46
3.8.7.2. Eletroforese em gel	47
3.8.7.3. Transferência e identificação das proteínas	47
3.9. Validação por Espectrofotometria	48
3.10. Análise estatística	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Análise da capacidade funcional	51
4.1.1. Determinação da concentração de lactato sanguíneo	53
4.2. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca.....	54
4.3. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	54
4.4. Caracterização da remodelação cardíaca.....	55
4.4.1. Análise da estrutura e função cardíaca in vivo	55
4.4.2 Análise macroscópica do coração post mortem	57
4.5. Proteômica quantitativa por LC-MS/MS Label-free	58
4.5.1. Análise de bioinformática.....	61
4.6. Expressão das proteínas ligadas as vias de hipertrofia fisiológica e patológica	68
4.7. Validação das proteínas diferencialmente expressas por Western Blotting	71
4.8. Validação das proteínas diferencialmente expressas por espectrofotometria	72
5. DISCUSSÃO	75
5.1. Efeitos do treinamento sobre a capacidade funcional e níveis séricos do lactato .	75
5.2. Efeitos do treinamento nos dados anatômicos post mortem e sinais clínicos de IC.....	76
5.3. Efeitos do treinamento físico na estrutura e função cardíaca	77
5.4. Efeito da estenose aórtica supravalvar sobre o proteoma miocárdico	78
5.4.1. Metabolismo energético	78
5.4.2. Estresse oxidativo e inflamação	80
5.4.3. Arquitetura estrutural	83
5.4.4. Homeostase celular	84
5.5. Efeito do treinamento físico aeróbio sobre o proteoma miocárdico	87
5.5.1. Metabolismo energético	87
5.5.2. Estresse oxidativo e inflamação	88

5.5.3. Arquitetura estrutural	89
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS	94
8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	106
9. ANEXOS.....	127

Introdução



1. INTRODUÇÃO

Embora tenha ocorrido nos últimos anos significativo avanço na biomedicina cardiovascular, as doenças cardíacas ainda representam marcante problema de saúde pública, com alta prevalência, elevados custos financeiros e relevante taxa de mortalidade (1). Estes indicadores, apontam para a importância do entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese dessas patologias, o que poderá resultar no desenvolvimento de possíveis novas terapias.

O coração, em resposta a um determinado estímulo, passa por um processo denominado remodelação cardíaca (RC), definido como alteração na expressão do genoma, resultando em modificações moleculares, celulares e intersticiais e manifestado clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração (2). Embora, presente do nascimento à vida adulta, o termo RC é predominantemente empregado para descrever as respostas patológicas como, isquemia miocárdica, sobrecarga de volume e pressão. É um processo adaptativo que visa manter o funcionamento hemodinâmico adequado do coração com intuito de preservar a homeostasia corpórea. Entretanto, na dependência das características do agente agressor e do receptor, a RC pode, a curto ou longo prazo, acarretar distúrbio funcional, sistólico e/ou diastólico e, posteriormente, insuficiência cardíaca (IC).

Trabalhos abrangendo seres humanos com RC seriam úteis na elucidação dos diferentes mecanismos envolvidos na disfunção cardiovascular; entretanto, por limitações éticas, vários modelos experimentais vêm sendo utilizados para o estudo da remodelação, por exemplo, a sobrecarga pressórica como, estenose de artéria renal (3), aorta abdominal (4,5), torácica (6–8), e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (9). Em nossa instituição vem sendo utilizado o modelo de estenose aórtica supravalvar (EAO) em ratos, que tem como característica promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda (10–12). Inicialmente, a sobrecarga pressórica é leve e acentua-se progressivamente à medida que os roedores crescem, assemelhando-se, parcialmente, a estenose aórtica no ser humano. Investigadores do nosso grupo tem utilizado este modelo experimental visando compreender aspectos moleculares, metabólicos, estruturais e funcionais durante o seu processo evolutivo, da agressão à IC (8,10,13–16). Os achados funcionais desses estudos mostraram que os animais com EAO

apresentam na fase inicial disfunção diastólica e melhoria do desempenho sistólico do ventrículo esquerdo (VE) e, posteriormente, deterioração da função sistólica e IC.

Diferentes mecanismos fisiopatológicos podem contribuir para a transição da disfunção para a IC em animais com hipertrofia patológica, cujo panorama tem sido caracterizado por alterações, **1) na biologia do miócito**: acoplamento excitação-contracção-relaxamento; expressão de genes fetais; sistema beta adrenérgico; hipertrofia; miocitólise; citoesqueleto e metabolismo energético; **2) no miocárdio**: perda de miócitos (necrose, apoptose ou autofagia) e modificação na matriz extracelular (fibrose e degradação); **3) na geometria da câmara**: hipertrofia concêntrica ou excêntrica; aumento da esfericidade e incompetência valvar (17–19). A diminuição da densidade capilar, aumento da estimulação dos sistemas adrenérgico, renina-angiotensina-aldosterona, liberação de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e desbalanço da expressão gênica miocárdica por micro RNAs são considerados os geradores determinantes da hipertrofia patológica (18,20).

Tratamentos farmacológicos (21–25) e não farmacológicos (26–32) são utilizados com o objetivo de atenuar a falência ventricular em indivíduos com remodelação cardíaca patológica. No âmbito das terapias não medicamentosas para as doenças cardiovasculares, destaca-se o treinamento físico que consiste em uma atividade programada, sistematizada e repetitiva com objetivo pré-estabelecido de aprimorar as valências físicas (26–28,30–33). A importância do TF nos dias atuais é relacionada a sua atribuição, a qual resulta na melhoria do condicionamento físico (34), na prevenção de doenças (35), na diminuição de distúrbios vinculados com a senescência (36) e por abrandar sintomas de doenças crônicas (36–39).

De acordo com estas evidências, o TF é de fundamental importância para melhorar a qualidade de vida, a longevidade e diminuir as taxas de morbimortalidade populacional (33,38–40). A prática do TF tem sido relacionada com a diminuição da ocorrência de eventos cardíacos fatais e atenuação dos fatores de risco cardiovascular (34,41–44); neste sentido, diretrizes internacionais e nacionais passaram a recomendar o TF para pacientes com IC classes I, II, III, de acordo com a *New York Heart Association* (45,46). É importante ressaltar que o tipo e a magnitude da resposta cardiovascular dependem das características do exercício executado, ou seja; tipo, duração, intensidade, e a massa muscular envolvida (37,40,47). Com relação aos tipos de

treinamento, destacam-se o resistido e o aeróbio, amplamente estudados por pesquisadores (48). O TF resistido tem como exemplo a musculação, que visa o aumento de força e resistência muscular (40). O segundo, representado pela corrida, visa a melhoria da aptidão cardiovascular (captação, transporte e utilização do oxigênio), consistindo em um exercício dinâmico, repetitivo e de longa duração, o qual utiliza vários grupos musculares simultaneamente (37).

Para atender o aumento da demanda energética muscular em resposta ao TF, uma série de adaptações nos órgãos periféricos ocorrem no sentido de ajustar o comportamento do organismo às necessidades dos grupos musculares envolvidos no treinamento (47,48). Neste sentido, o corpo apresenta uma série de ajustes ao **efeito agudo do TF**, como ativação do sistema nervoso simpático e inibição do sistema nervoso parassimpático (49). As alterações do sistema nervoso autonômico promove mudanças nos fatores envolvidos na regulação da função cardíaca (frequência de batimentos, contratilidade, pré-carga e pós-carga) e do tônus vascular (venoso e arterial) com o intuito de promover o aumento da oferta de sangue para os órgãos periféricos, principalmente para a musculatura esquelética (49,50). Em resposta ao **efeito crônico do TF**, o aumento da atividade simpática, liberação de hormônios e fatores de crescimento decorrente de cada sessão de TF agudo, resulta em hipertrofia cardíaca fisiológica, caracterizada por um estado funcional normal e alteração harmoniosa entre os diferentes componentes da estrutura do miocárdio, isto é, miócito, matriz extracelular e sistema vascular (51). O processo de hipertrofia cardíaca normaliza o estresse/força parietal e conseqüentemente a deformação miocárdica, acarretando funcionamento adequado do coração (51,52). Em razão do treinamento físico promover alteração harmoniosa dos componentes do miocárdio estimulando a via PI3K/AKT/MTOR, o mesmo pode ser utilizado como estratégia para se contrapor à via patológica JNK/P38/ERK, responsável pela remodelação mal adaptativa do coração (48,53).

Em nossa instituição, diferentes investigadores analisaram o efeito do exercício físico na RC, utilizando roedores com cardiopatia por sobrecarga pressórica induzida por EAO e disfunção ventricular (11,15,16,26–28,54,55). Enquanto alguns investigadores não detectaram alteração no desempenho do coração (11,54), outros mostraram que o TF promove atenuação da disfunção diastólica (16,26–28,55) ou sistólica (15,55);

entretanto, os trabalhos que mostraram os efeitos benéficos não avaliaram os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na performance cardíaca (26–28) ou estudaram os mesmos de forma isolada (15,16,55). Os pesquisadores que investigaram as maquinarias, analisaram a participação do sistema β -adrenérgico (16), trânsito de cálcio (55), proliferação de cardiomiócitos e sistema renina angiotensina (15). Somente Silva, VL (55) constatou que a melhoria da função estava relacionada com o fluxo de cálcio intracelular; os outros autores verificaram que o benefício funcional não foi consequente dos elementos acima reportados. A participação do metabolismo dos lipídios na atenuação da disfunção cardíaca está sendo investigada como outro possível fator de proteção cardíaca pelo TF (56). Os trabalhos realizados (15,16,55) e o em andamento (56) são investigações específicas, ou seja, analisaram ou analisam, como referido acima, os possíveis mecanismos de forma pontual, por exemplo, proliferação de cardiomiócitos (15).

Atualmente a comunidade científica vem realizando grandes esforços na elucidação das maquinarias envolvidos nas diversas doenças, com a finalidade de melhor entendimento, desenvolvimento de novas terapias e biomarcadores para as patologias. O avanço tecnológico em instrumentações analíticas está contribuindo para uma melhor compreensão dos elementos participantes nos processos fisiopatológicos. Neste sentido, uma das abordagens de pesquisa que tem se destacado nos últimos anos é a abordagem proteômica (57). Esta estratégia tem sido utilizada nos últimos anos no âmbito da saúde, resultando em número crescente de publicações científicas (58). Investigações nesta área buscam identificar as mudanças globais nas proteínas de corações patológicos, visando fornecer informações necessárias para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares (59–64). Embora estas buscas sejam emergentes (64), trabalhos com esta abordagem vem sendo conduzidos em pesquisas clínicas cardiológicas (65–67) e em modelos experimentais de cardiopatias como, infarto do miocárdio (68,69), hipertensão arterial sistêmica (70,71), diabetes mellitus (72,73), obesidade (74,75) e constrição aórtica (76–82). Neste último modelo as seguintes áreas são enfocadas: mitocôndria (78,79,82), gotículas lipídicas (76) tecido miocárdico (77,80) e proteínas fosforiladas (81). O proteoma cardíaco também tem sido analisado, sob o efeito do TF,

em roedores saudáveis (83–87) e cardiopatas por obesidade (88), infarto do miocárdio (89), hipertensão arterial sistêmica (90,91) e diabetes mellitus (92).

Embora existam várias pesquisas que analisaram o proteoma do tecido cardíaco na constrição aórtica (76–81), não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos da cardioproteção gerada pelo treinamento físico aeróbio em ratos com EAo, utilizando a abordagem proteômica. Neste projeto almeja-se investigar por esta técnica analítica, o perfil das proteínas miocárdicas de ratos com EAo e disfunção ventricular atenuada pelo TF, enfocando a via fisiológica (PI3K/AKT/MTOR) e patológica (JNK/P38/ERK) no processo hipertrófico. Neste trabalho hipotetizamos que o TF altera o panorama das proteínas do miocárdio, promove aumento na expressão das envolvidas na via fisiológica e diminui na patológica no coração remodelado por sobrecarga pressórica. Acreditamos que a mudança do perfil do proteoma está relacionada com a atenuação da disfunção cardíaca, por contra regular os estímulos patológicos envolvidos na EAo.

Objetivos

Two horizontal lines are positioned below the title 'Objetivos'. The top line is light gray and spans the width of the text. The bottom line is dark gray and is slightly shorter, starting from the left margin and ending under the 's' in 'Objetivos'.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar pela abordagem proteômica o panorama das proteínas miocárdicas de ratos com estenose aórtica com atenuação da disfunção ventricular pelo treinamento físico aeróbico.

2.2. Específicos

2.2.1 - Investigar o perfil das proteínas do ventrículo esquerdo, enfocando as vias fisiológicas e patológicas por meio da abordagem proteômica;

2.2.2 - Validar os resultados do proteoma miocárdico por Western Blotting e espectrofotometria;

2.2.3 - Avaliar a expressão proteica da via fisiológica e patológica miocárdica por Western Blotting;

2.2.4 - Avaliar a estrutura e função cardíaca pelo ecocardiograma;

2.2.5 - Estudar a morfologia cardíaca *post-mortem*;

2.2.6 - Avaliar a capacidade aeróbia pelo teste de esforço máximo;

2.2.7 - Analisar a eficácia do protocolo de TF por meio da determinação da concentração do lactato sanguíneo.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. 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 no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNIPEX/FMB, nas seguintes condições: gaiolas coletivas de polipropileno com tampas de arame cromado, forradas com xilana de sabugo de milho esterilizada (Suprimart, Itaquaquecetuba, SP, BR), temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) controladas por climatizador (LG, Manaus, AM, BR) e ciclos de iluminação de 12 horas invertidos. A oferta de água purificada (Lorenzetti, São Paulo, SP, BR) e ração (Presence, Paulínia, SP, BR) foi *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisa”. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número 1308/2019.

3.2. Delineamento experimental

Inicialmente, foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supralvar (EAo). No início da terceira semana do procedimento cirúrgico, quando os animais apresentaram remodelação cardíaca (RC) constatada por ecocardiograma, o grupo EAo foi redistribuído em dois subgrupos semelhantes quanto a RC, e randomizados quanto a presença ou ausência do TF. O mesmo procedimento foi realizado no grupo Sham. Dentro deste contexto, na segunda etapa o experimento foi composto por 4 grupos experimentais: Sham (n=15), ShamTF (n=15), EAo (n=15) e EAoTF (n=14). O cálculo amostral foi baseado em trabalhos anteriores do grupo (15,16). Os animais de todos os grupos foram avaliados e eutanasiados após 16 semanas do início do TF, ou seja, 18 semanas após o procedimento cirúrgico (**Figura 1**).

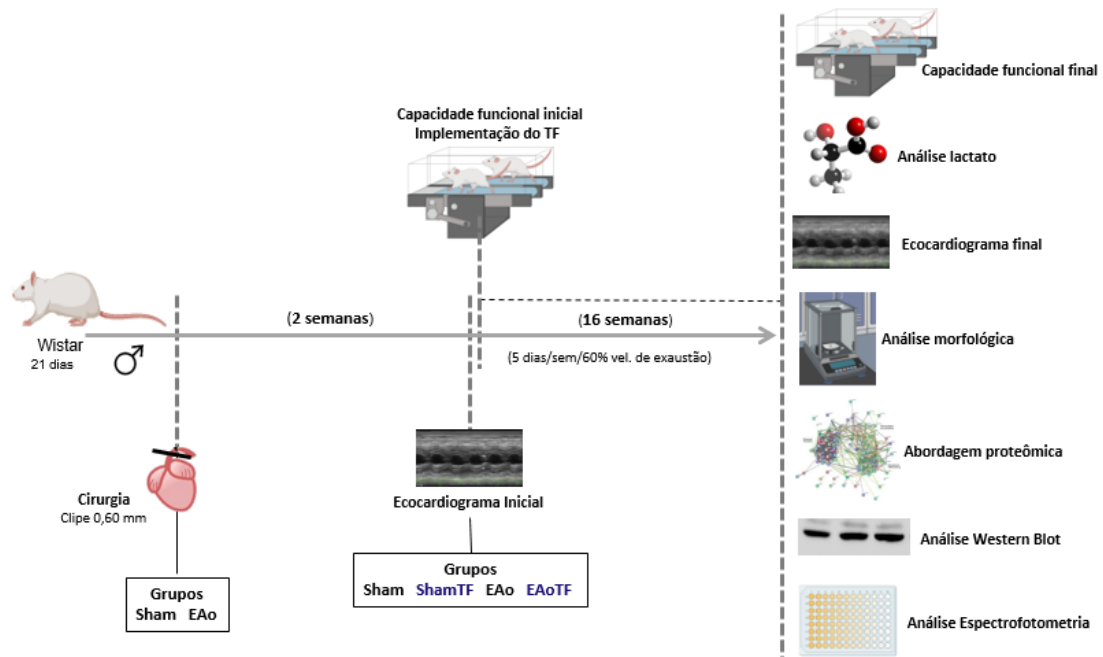


Figura 1. Delineamento experimental do estudo. Sham: Controle operado; ShamTF: Controle operado exercitado; EAo: Estenose aórtica; EAoTF: Estenose aórtica exercitado.

3.3. Indução de estenose aórtica supravalvar

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (15). Os animais com três a quatro semanas de vida, pesando de 70 a 90 gramas, foram anestesiados com cloridrato de cetamina intraperitoneal (IP), (60 mg/kg, Dopalen®, Sespo - Divisão Vetbrands, Jacareí, SP, BR) e cloridrato de xilazina IP, (10 mg/kg, Anasedan®, Sespo - Divisão Vetbrands, Jacareí, SP, BR), a profundidade anestésica foi considerada adequada quando não houve reflexo podal ao pinçamento da pata. Em seguida os ratos foram submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata (Analion, Ribeirão Preto, SP, BR) com 0,60 mm de diâmetro interno foi colocado aproximadamente a 3 mm da raiz da aorta. Asutura dos componentes da parede torácica foi realizada com fio *mononylon* 5.0 (Shalon Medical, Goiânia, GO, BR). Durante a cirurgia, os roedores foram ventilados manualmente com pressão positiva com oxigênio a 100% (White Martins, Jundiaí, SP, BR). Os ratos dos grupos Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem a colocação do clipe. Concluído o ato cirúrgico, os animais foram colocados em superfície aquecida a 30°C (CETEC, Botucatu, SP, BR) até retornarem da anestesia.

Antes da retomada da ingestão hídrica voluntária dos animais, foi administrado soro fisiológico 0.9% IP, (1 mL/kg/dia, ADV Farma, Nova Odessa, SP, BR) duas vezes ao dia. Durante os três dias seguintes à cirurgia, todos os animais foram medicados com antibiótico enrofloxacino IP, (10mg/kg/dia, Baytril[®], Bayer, SP, BR) e analgésico carprofeno IP, (5mg/kg/dia, Rymadyl[®], Pfizer, Nova Iorque, NY, USA). Neste período, foi feita assepsia da cicatriz cirúrgica com digliconato de clorexidina 1% tópico, (10mg/mL/dia/ Riohex 1%[®], São José do Rio Preto, SP, BR). O protocolo de analgesia foi mantido até desaparecimento das evidências de dor. Com o intuito de manter assepsia adequada nas caixas de contenção dos animais, as xilanas de sabugo de milho foram trocadas diariamente.

3.4. Treinamento físico aeróbio

3.4.1. Aclimação

Antes de iniciar o TF, no início da 2ª semana pós cirurgia, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira ergométrica para ratos (Modelo 2506, AVS Projetos, São Carlos, SP, BR), o qual consiste em caminhada de baixa intensidade, velocidade de 5 m/min, tempo de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos do 1º ao 5º dia, respectivamente. Esta fase, adaptativa, tem como finalidade minimizar o estresse dos roedores ao meio ambiente (**Tabela 1**).

Tabela 1. Adaptação a esteira ergométrica

Dias	Velocidade (m/min)	Tempo (min)
1º	5	10
2º	5	15
3º	5	20
4º	5	25
5º	5	30

3.4.2. Teste de esforço máximo progressivo

Após a aclimação, com a finalidade de ajustar as velocidades da esteira ergométrica e avaliar o desempenho físico nos momentos pré e pós-treinamento, os ratos foram submetidos ao teste de esforço máximo (TEM), adaptado de Rodrigues et al. (93). A velocidade inicial do TEM foi de 6 m/min, sendo progressivamente aumentada em 3 m/min a cada 3 minutos, até a exaustão dos roedores. O critério para a determinação da estafa do animal e, conseqüente interrupção do teste, foi o momento em que o mesmo não foi capaz de manter a corrida após incremento na velocidade da esteira. As variáveis analisadas ao final do TEM foram: velocidade de exaustão (VEx, m/min), tempo total (TT,min) e distância percorrida (DP,min) (**Figura 2**).

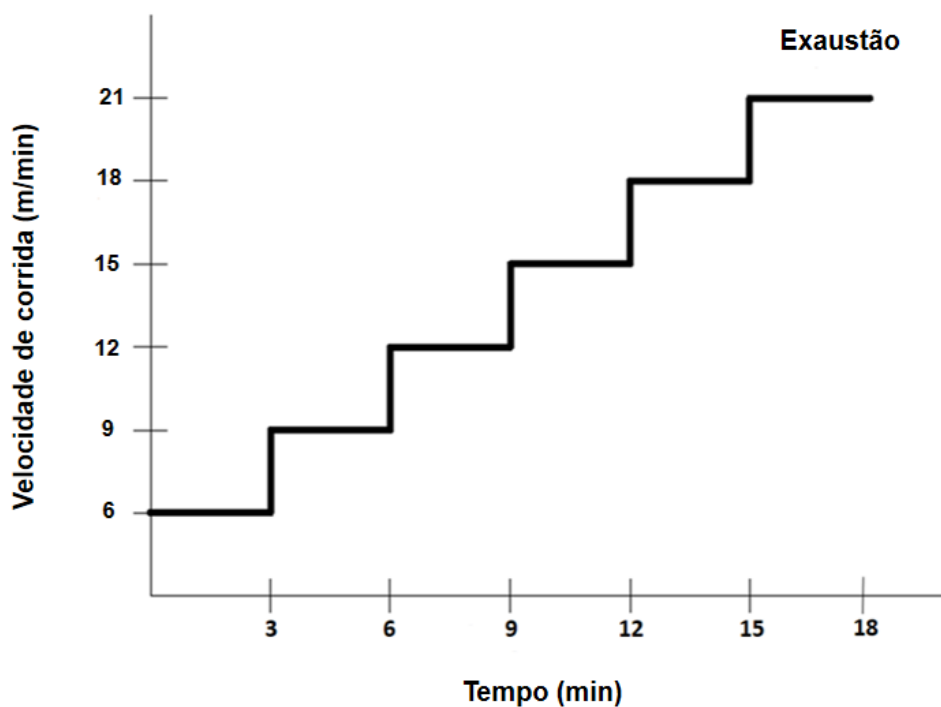


Figura 2. Teste de esforço progressivo. Esquema gráfico mostrando como é realizado o aumento de velocidade em relação ao tempo durante o teste de esforço incremental.

3.4.3. Protocolo de treinamento

O TF teve início na **3ª** semana pós cirurgia e consistiu em um programa de corrida em esteira ergométrica, descrita anteriormente, **5** vezes por semana, durante **16** semanas. Os roedores realizaram o TF com uma carga equivalente a 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo, isto é, na 1ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas do TF. Este procedimento visa ajustar as velocidades de corrida de acordo com a individualidade biológica dos animais. A duração das sessões do TF da 1ª à 3ª semana foi de 30, 40 e 50 minutos, respectivamente; entre a 4ª e 16ª semana, o tempo foi fixado em 60 minutos. O TEM foi repetido após o final da última semana de treinamento (16ª), com a finalidade de avaliar a capacidade funcional dos roedores. Este protocolo é uma adaptação de Souza et al. (28) que o utilizou no modelo experimental de estenose aórtica supraválvular (**Tabela 2**).

Tabela 2. Protocolo de treinamento físico aeróbio

Semanas	Intensidade (% VEx)	Tempo (min)
Teste de esforço 1 (Inicial)		
1ª	60	30
2ª	60	40
3ª	60	50
4ª	60	60
Teste de esforço 2		
5ª	60	60
6ª	60	60
7ª	60	60
8ª	60	60
Teste de esforço 3		
9ª	60	60
10ª	60	60
11ª	60	60
12ª	60	60
Teste de esforço 4		
13ª	60	60
14ª	60	60
15ª	60	60
16ª	60	60
Teste de esforço 5 (Final)		

VEx: velocidade máxima atingida no teste de esforço.

3.4.4. Determinação da concentração de lactato sanguíneo

A concentração do lactato, marcador biológico do condicionamento físico, determinada imediatamente após o teste de esforço final, 16ª semana, nos permite avaliar a eficácia do protocolo de TF (94,95). A amostra de sangue foi obtida por compressão da extremidade da cauda do animal, foi depositada em lâminas de vidro para microscopia *Sigma Chemical Company*, modelo Techware S 8902 (Pittsburgh, PA, USA) e 25 µL foi aspirado por meio de uma pipeta manual (Eppendorf PhysioCare Concept®, Hamburgo, Germany), utilizando ponteiras descartáveis 100 µL, (Axygen, Corning Inc, NY, USA) que foram trocadas depois de cada coleta. O sangue coletado foi imediatamente armazenado em tubos Eppendorf de 100 µL com tampa contendo 50 µL solução de fluoreto de sódio a 1% (m/v), anticoagulante e inibidor da enzima enolase para suprimir a atividade glicolítica (Quimesp Química, Guarulhos, SP, BR). As amostras de sangue foram primeiramente refrigeradas durante a coleta e mantidas em freezer - 20°C até a sua utilização. A concentração de lactato foi determinada pelo Analisador de Lactato e Glicose - YSI 2300 (Stat Plus Glucose Lactate Analyzer, Yellow Springs, OH, USA). O equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante (96).

3.5. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca

O diagnóstico de insuficiência cardíaca (IC) dos animais EAo e EAoTF foi baseado na presença dos seguintes sinais clínico-patológicos: alteração do padrão respiratório, derrame pleural, ascite, trombo no átrio esquerdo e congestão hepática.

3.6. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Os animais submetidos a indução da EAo podem desenvolver retenção hídrica presente na insuficiência cardíaca, portanto, a avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras do ventrículo esquerdo (VE), do direito (VD), dos átrios (AT), do pulmão e do fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi aferido o peso *in natura* em balança analítica (SPLabor, Presidente Prudente, SP, BR). Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Fanem, Guarulhos, SP, BR) 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: $[(PN-PS)/PN] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

3.7. Caracterização da remodelação cardíaca

A remodelação foi analisada por meio de estudos moleculares, estruturais e funcionais. A estrutura e função foi avaliada *in vivo* por ecocardiograma. O grau de hipertrofia também foi examinado pela morfologia macroscópica *post mortem*. A avaliação molecular foi realizada por abordagem proteômica e validada pela técnica de Western blot. Os métodos utilizados estão descritos abaixo.

3.7.1. Ecocardiograma

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada *in vivo* por meio do ecocardiograma após 2 e 18 semanas da indução de EAo. Este método permite avaliar: 1) a morfologia e a função do coração (97); 2) a evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão (98) e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração (99). É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriais (100). É um processo que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que técnicas invasivas, como a hemodinâmica (101). É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício (101). O estudo após 2 semanas teve como finalidade formar grupos homogêneos no Sham (Sham x ShamTF) e EAo (EAo x EAoTF) e, com 18 semanas avaliar os efeitos do protocolo de TF no coração dos roedores.

Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg/ip; Dopalen®) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®). Após anestesia e tricotomia da face anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Haifa, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 – 11,5 MHz. A avaliação do fluxo transvalvar mitral foi realizado com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. A mensuração das estruturas cardíacas foi realizada a partir de imagens obtidas em modo monodimensional (M), com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional e o transdutor posicionado na região paraesternal eixo menor. A imagem do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida

posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As seguintes estruturas do VE foram analisadas: diâmetros sistólico e diastólico (DSVE e DDVE), espessuras sistólica e diastólica da parede posterior (ESPP e EDPP) e do septo interventricular (ESSIV e EDSIV). O DDVE, a EDPP e a EDSIV foram medidos no momento coincidente ao diâmetro máximo da cavidade, e o DSVE, ESPP, ESSIV no instante correspondente ao menor diâmetro da cavidade. A espessura relativa da parede (ERVE) foi calculada pela equação $(2 \times EDPP)/DDVE$. As imagens dos diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) foram obtidas ao nível da valva aórtica. A mensuração das estruturas cardíacas foi realizada com o auxílio de um paquímetro, utilizando-se a média aritmética de cinco ciclos cardíacos consecutivos.

O desempenho sistólico do VE foi mensurado pelos seguintes índices: 1) fração de ejeção do VE (FE) = $[(DDVE^3 - DSVE^3)/(DDVE^3)]$; 2) fração de encurtamento mesocárdico (ΔD_{meso}) = $\{[(DDVE + \frac{1}{2}EDPP + \frac{1}{2}EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2}ESPP + \frac{1}{2}ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2}EDPP + \frac{1}{2}EDSIV)\} \times 100\%$; 3) velocidade de encurtamento sistólico da parede posterior (VEPP) foi mensurada pela tangente máxima do encurtamento sistólico da parede posterior.

A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial (onda E) e tardia (onda A), consequente à contração atrial; 2) relação entre onda E e A (E/A); 3) tempos de desaceleração da onda E (TDE) e do relaxamento isovolumétrico (TRIV); 4) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E'). Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente a ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras. O TRIV foi mensurado na imagem denominada cinco câmaras. As medidas de velocidade e tempo foram realizadas em tempo real no monitor do ecocardiógrafo.

3.7.2. Análise macroscópica *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* foi realizada após 18 semanas de indução da EAO e permite identificar a presença de hipertrofia a nível atrial e ventricular. Os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de cetamina (60 mg/kg/ip;

Dopalen®) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®), eutanasiados por decapitação e o coração removido e dissecado para a identificação dos átrios (AT) e ventrículo direito (VD) e esquerdo (VE). A massa cardíaca foi avaliada utilizando balança analítica (SPLabor, Presidente Prudente, SP, BR); o grau de hipertrofia do VE, VD, AT foi obtida pelo peso absoluto e suas relações com o comprimento da tíbia (TB): VE/TB, VD/TB e AT/TB.

3.8. Análise proteômica

O termo proteoma foi concebido por Marc Wilkins na década de 90 e descreve todo o conjunto de proteínas presentes em biofluidos, organelas, células e tecidos em condições específicas e em determinado momento (102,103). Proteômica utiliza um conjunto de técnicas analíticas para detectar, quantificar e identificar proteínas, incluindo os produtos resultantes de modificações pós-traducionais; permite caracterizar a função biológica das proteínas em processos fisiológicos ou patológicos, opostamente aos estudos gênicos, que não refletem necessariamente o perfil fenotípico do organismo (61,104,105).

Atualmente, a quantificação livre de marcação (*label free*) é a metodologia mais utilizada para a análise do proteoma (106–108), em razão de detectar maior número de proteínas comparada a eletroforese bidimensional em gel (2-DE), além de ser menos laboriosa. Para a realização da abordagem proteômica são necessárias as seguintes etapas: 1) extração, 2) quantificação, 3) digestão *in solution* (*shotgun*), 4) sequenciamento peptídico e 5) identificação das proteínas por bioinformática.

3.8.1. Extração das proteínas

A porção anterior do VE foi separada, rapidamente congelada em nitrogênio líquido (Centro de Isótopos Estáveis, Instituto de Biociências de Botucatu, SP, BR) utilizando-se o dispositivo *freeze-clamping* (109), e armazenada em Ultrafreezer a -86°C, modelo ExF24086A (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As amostras congeladas foram homogeneizadas em equipamento Bullet Blender Storm (Next Advance, Troy, NY, USA), utilizando esferas de aço inoxidável com 0,5 mm de diâmetro (Next Advance). Para a realização da extração das proteínas, 50 mg do tecido foi transferido para um microtubo Safe-lock (Eppendorf) no qual foi adicionado 500 µL de bicarbonato de

amônio a 50 mmol/L contendo inibidores de protease (Sigma Fast Protease Inhibitor Cocktail Tablets Edta-Free, St. Louis, Missouri, USA) a uma velocidade de 5.000 rpm durante 3 ciclos (5 minutos com intervalo de 1 minuto em ambiente de 2°C a 8°C).

3.8.2. Quantificação das proteínas

A quantificação total das proteínas foi determinada por ensaio BCA, utilizando o Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific), tendo albumina bovina (BSA) como proteína padrão, de acordo com as instruções do fabricante (110).

3.8.3. Digestão *in solution* (shotgun)

As amostras de proteína do tecido cardíaco (50 µg) foram transferidas para microtubos Lobind (Eppendorf) e nestes adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio a 50 mmol/L e 25 µL de RapiGest™ 0,2%, (Waters, Manchester, UK) e incubados a 80°C por 15 min. Em seguida as amostras foram reduzidas e alquiladas, por meio da incubação com 2,5 µL de ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 mmol/L, 60°C por 30 min; em seguida foi adicionada 2,5 µL de Iodacetamida (IAA) (Sigma-Aldrich) 300 mmol/L por 30 min, no escuro em temperatura ambiente. A digestão proteolítica foi realizada com adição de 10 ng/µL de tripsina, (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, USA) incubadas por 14 h à 37°C. Após a digestão, 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% (v/v) foi adicionado, incubado por 90 min a 37°C e centrifugado (14.000 rpm por 30 min). O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos Lobind, nos quais foram adicionados 5 µL de álcool desidrogenase (ADH), 1 µmol/L e 85 µL de acetonitrila (ACN) a 3% (v/v) (Merck Milipore, Burlington, MA, EUA); posteriormente as amostras contendo os peptídeos foram destinadas à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3.8.4. Sequenciamento peptídico

A identificação dos peptídeos foi feita em um sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS (Waters, Manchester, UK). O nanoACQUITY UPLC® é equipado com uma coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 µm X 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 µm). A coluna foi equilibrada com 93% (v/v) da fase móvel A (ácido fórmico 0,10% (v/v) em água) e 7% (v/v) da fase móvel B (ácido fórmico 0,10 % (v/v) em ACN 100%

(v/v)). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85% (v/v) (ácido fórmico 0,10% (v/v) em ACN 100% (v/v)) por 70 minutos num fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{min}$. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C. O espectrômetro de massas Xevo® G2 Q-TOF foi operado em modo iônico positivo de nanoeletrospray e os dados foram coletados usando o método MSE em elevada energia (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos numa única injeção. As condições de fonte usadas incluem: voltagem do capilar de 2,5 kV, cone de amostra de 30 V, cone de extração de 5,0 V e temperatura da fonte de 80°C. Os dados foram adquiridos durante 70 min, com varredura na faixa de 50–2000 Da. O lockspray, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1]fibrinopeptídeo (1 pmol/ μL), com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, como um íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427.

3.8.5. Análise quantitativa *label-free*

Os arquivos de dados *raw* da espectrometria de massa foram enviados para Progenesis QI for Proteomics v.4.0 (Nonlinear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, UK) para realizar a análise quantitativa. Para o alinhamento, o resultado de uma amostra foi selecionado como referência automaticamente. Os demais resultados foram alinhados com a referência (*score* de alinhamento maior que 80%), e a *peak picking* foi realizada usando o método de sensibilidade automática. As intensidades de pico foram então normalizadas calculando-se razões de abundância em relação a uma referência. A lista de picos foi pesquisada no banco de dados UniProt de *Rattus norvegicus* usando o Mascot v.2.6 (Matrix Science, London, UK) (7,989 sequências; 4,044,314 resíduos – Junho 2021). Tripsina foi a enzima especificada e uma clivagem perdida foi permitida. A carbamidometilação da cisteína foi definida como uma modificação fixa e a oxidação da metionina, como uma modificação variável. Uma tolerância de massa precursora de 10 ppm e uma de íon de fragmento de 0,01 Da foram aplicadas. Um *false discovery rate* (FDR) de 1% foi considerado. Uma quantificação relativa, utilizando peptídeos não conflitantes, foi selecionada para quantificar as proteínas. Para uma proteína ser considerada diferencialmente expressa, ela deveria ser identificada e quantificada usando pelo menos dois peptídeos únicos e apresentar um valor $p < 0,05$ e um valor $q < 0,05$.

3.8.6. Análise de Bioinformática

As proteínas diferencialmente expressas identificadas por *shotgun label-free* foram submetidas à análise de enriquecimento para os termos Gene Ontology (GO) "função molecular", "processo biológico" e "componente celular" usando a ferramenta "KEGG Orthology-Based Annotation System" – (KOBAS 3.0) (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) (111). Essa análise fornece a classificação das proteínas de acordo com as categorias de GO "processo biológico", "função molecular" e "componente celular". As redes de interação proteína-proteína foram construídas usando o banco de dados on-line 'Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes' (STRING, v. 11.0) (<https://string-db.org>) (112). Todas as análises da rede STRING foram realizadas com um nível de confiança médio de 0,4.

3.8.6. Validação por Western blotting

Após a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, quatro proteínas foram submetidas à técnica de Western Blotting para validação dos dados proteômicos. Devido ao fato da maioria das proteínas moduladas estarem envolvidas em processos metabólicos, foram selecionadas 2 relacionadas metabolismo de lipídios (Fabp3, Mcad) e 2 da via glicolítica (Ldh, Pk). Além disso, analisamos também as proteínas relacionadas as vias de hipertrofia fisiológica (PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR e p-mTOR) e patológica (JNK, p-JNK, p38, p-p38, ERK e p-ERK) miocárdica. A metodologia está descrita abaixo.

3.8.6.1. Extração das proteínas

A porção anterior do VE foi separada e rapidamente congelada em nitrogênio líquido utilizando-se o dispositivo *freeze-clamping* (109), e armazenada em freezer a -86°C. As amostras congeladas foram homogeneizadas em equipamento *Bullet Blender* (Next Advance) usando esferas de aço inoxidável (0,5 mm) em tampão de lise RIPA (150 mmol/L NaCl, 1% (m/v) Triton X-100, 0,5% (m/v) Desoxicolato de sódio, 0,1% (m/v) SDS, 50 mmol/L Tris Base pH 8,0) contendo inibidores de protease (Sigma-Aldrich) e fosfatase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), durante 5 min a 4°C. O produto da homogeneização foi centrifugado (Sorvall ST16R, Thermo Scientific) a 12.000 rpm por

20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos limpos e armazenado em freezer -86°C (ExF24086A-Thermo Scientific). A concentração de proteína foi analisada utilizando o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

3.8.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras foram diluídas em tampão *Laemmli*, (Tris-HCl 240 mmol/L, SDS, 0,80% (v/v), glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (m/v) e β -mercaptoetanol 200 mmol/L) (Sigma-Aldrich). As amostras (50 μ g) foram submetidas a 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 240 mmol/L pH 6,8, bis-acrilamida 30% (v/v), APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mmol/L pH 8,8, bis-acrilamida 30% (v/v), APS e Temed), na concentração de 10% (v/v) a 12% (v/v), dependente da massa molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão da massa molecular (10 a 250 kD) *Kaleidoscope Prestained Standards* (Thermo Scientific) para identificação da faixa de massa molecular das bandas. A corrida eletroforética foi realizada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e SDS 1% (m/v), AMRESCO, Radnor, PE, USA).

3.8.6.3. Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Armsham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) em sistema *Mini-Trans Blot* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L, metanol 20% (v/v) e SDS 0,1% (m/v), AMRESCO). As membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 137 mmol/L e detergente Tween 20 0,1% (v/v), AMRESCO). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araras, SP, BR) dissolvido em tampão TBS-T por 60 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação (Agitador Kline, Kasvi, São José dos Pinhais, PR, BR). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 16 horas a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, a

membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário (ab97080, Abcam, Cambridge, MA, USA) em solução bloqueadora por 90 minutos sob agitação constante em temperatura ambiente. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imunodetecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA) (113). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador *ImageQuant™ LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK) e as análises quantitativas das bandas protéicas (blots) foram realizadas pelo software *ImageJ* (National Institutes of Health). Proteínas envolvidas na hipertrofia patológica, formas total e fosforilada, da via das MAPK (JNK, ERK e p38-MAPK); os anticorpos primários utilizados foram: (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA): p-JNK (sc-6254), JNK total (sc-137019), p-ERK (sc-16982), ERK total (sc-93), p-p38-MAPK (sc-17852), p38-MAPK total (sc-7972). Proteínas envolvidas na hipertrofia fisiológica, formas total e fosforilada, da via PI3K/Akt/mTOR; os anticorpos primários foram: p-PI 3-Kinase p85 α Tyr467 (sc-293115, Santa Cruz), PI 3-kinase p85 α B-9 (sc-1637, Santa Cruz), Phospho-Akt Ser473 (5538S, Cell Signaling, St. Louis, Missouri, USA), Akt (9272S, Cell Signaling), Phospho-mTOR Ser2448 (2971S, Cell Signaling), mTOR (2972S, Cell Signaling). Proteínas envolvidas no metabolismo energético lipídico e glicolítico; os anticorpos primários foram: Fabp3 (ab133585, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK), Mcad (ab110296, Abcam); Ldha (2012S, Cell Signaling); Pk (3186S - Cell Signaling). Todas as expressões proteicas foram normalizadas pela expressão do GAPDH 6C5 (sc-32233, Santa Cruz).

3.9. Validação por Espectrofotometria

As atividades das enzimas beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase (BHADH), citrato sintase (CS), creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) que participam do metabolismo dos ácidos graxos, do ciclo do ácido cítrico e metabolistmo glicolítico foram analisadas no miocárdio. As amostras de LV foram homogeneizadas 1:20 (massa/vol) em Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L e coquetel de inibidor de protease, pH 7,4, utilizando equipamento Bullet Blender Storn, (Next Advanced, Troy, NY, EUA). O lisado foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante coletado. Todas

as atividades enzimáticas foram determinadas a 25 °C por espectrofotometria UV-Visível utilizando um espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), e o tampão de ensaio sem a amostra foi usado como branco. A atividade da CK foi determinada em meio reacional contendo 91,1 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L ATP, 0,262 mmol/L β -NAD forma reduzida, 0,728 mmol/L PEP, 10 mmol/L de creatina, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgSO₄, 10 unidades de desidrogenase láctica, 0,4 a 0,6 unidades de piruvato quinase e 0,05% de Triton X-100. pH 7,4. O volume total da solução de análise continha 165 microlitros de solução do meio reacional e 2 microlitros de homogenato. A análise foi iniciada pela adição de creatina. A absorbância dos ensaios de CS e CK foi monitorada a 340 nm. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi quantificada pela velocidade de oxidação do NADH, medida a 340 nm, tendo como substrato o piruvato. Para BHADH, a reação continha PBS 100 mmol/L pH 7,3, NADH 0,45 mmol/L e acetoacetil CoA 1,0 mmol/L. A atividade de CS foi medida em uma reação contendo Tris-HCl 100 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) 0,2 mmol/L, acetil CoA 0,3 mmol/L e oxaloacetato 0,5 mmol/L, pH 8,2. A taxa de mudança na absorbância foi monitorada a 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$).

3.10. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade usando o teste Shapiro-Wilk e foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. As comparações entre os grupos na 3ª semana pós indução da EAO e ao final do experimento, após 16 semanas de TF, foram realizadas pela técnica de ANOVA seguida de Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis seguida de Dunn (não paramétrico) (114). Na comparação das frequências dos sinais de IC foi utilizado o teste de associação de Goodman (115). As conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no Sigma Plot 12.0 (Microsoft, Albuquerque, NM, USA) e os gráficos foram gerados no GraphPad Prisma 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

Two horizontal lines are positioned below the title 'Resultados'. The top line is light gray and the bottom line is dark gray. Both lines are slightly offset to the left and right relative to the text.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da capacidade funcional

A indução da estenose aórtica ocasionou diminuição da tolerância ao esforço, antes e depois do protocolo de TF, na velocidade de exaustão, tempo total, distância percorrida em relação aos grupos controle. O grupo EAoTF apresentou melhora na capacidade funcional em todas variáveis comparadas ao EAo. O ShamTF ostentou melhora em todos os parâmetros em relação aos grupos Sham e EAoTF (**Figura 3. A, B, C**).

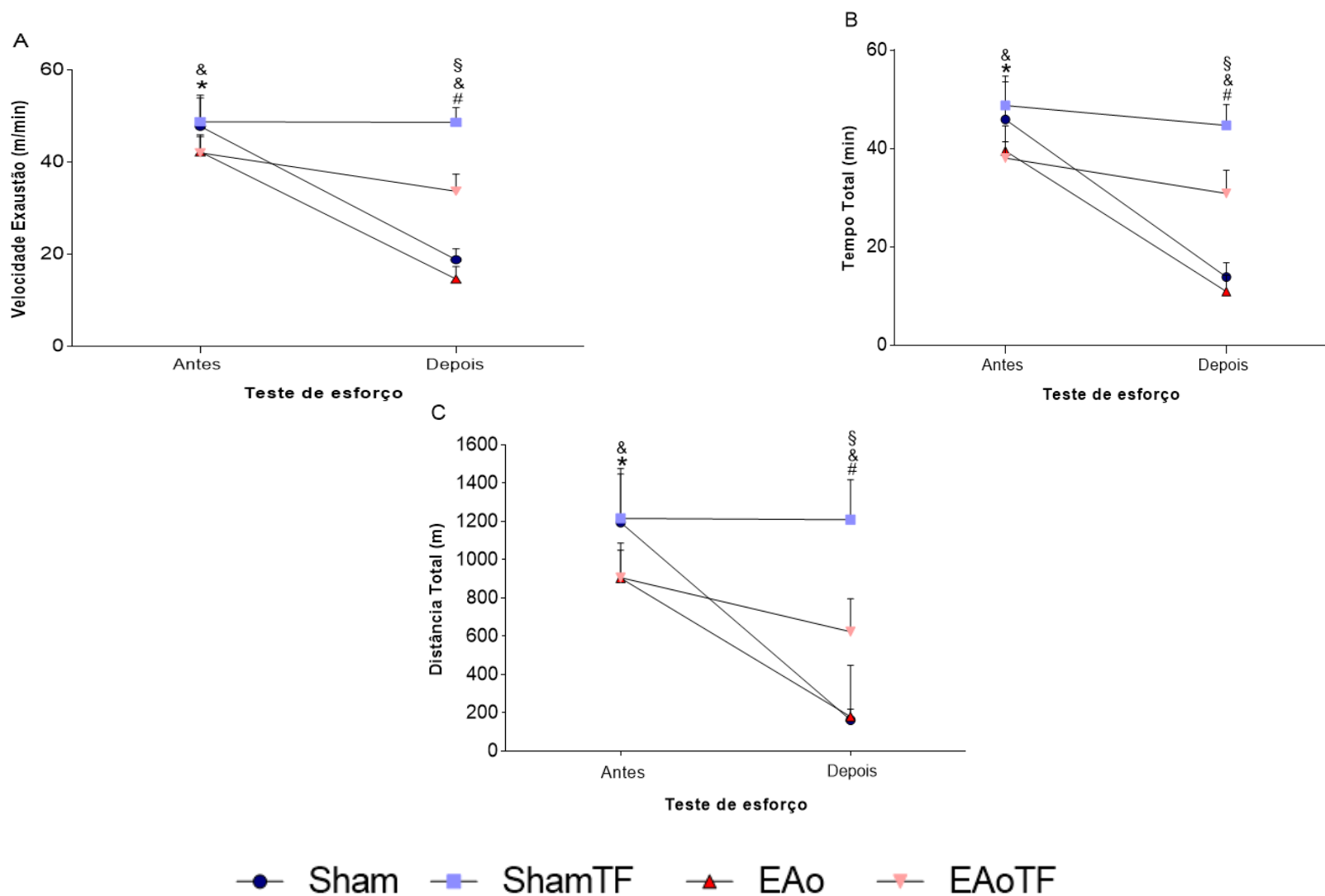


Figura 3. Avaliação da capacidade funcional. Velocidade de exaustão (A), tempo total (B) e distância total (C) obtidos nos testes de esforço máximo realizados antes e depois do protocolo de TF. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). ANOVA de duas vias para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes, complementada com Bonferroni. $p < 0,05$. *: EAo vs Sham; #: EAoTF vs EAo; &: EAoTF vs ShamTF; §: ShamTF vs Sham.

4.1.1. Determinação da concentração de lactato sanguíneo

Nossos resultados mostraram que o grupo EAo não diferiu do grupo Sham. Entretanto, houve efeito positivo do TF em ambos os grupos treinados (EAoTF e ShamTF), que apresentaram diminuição dos níveis de lactato em relação aos seus respectivos controles, EAo e Sham (**Figura 4**).

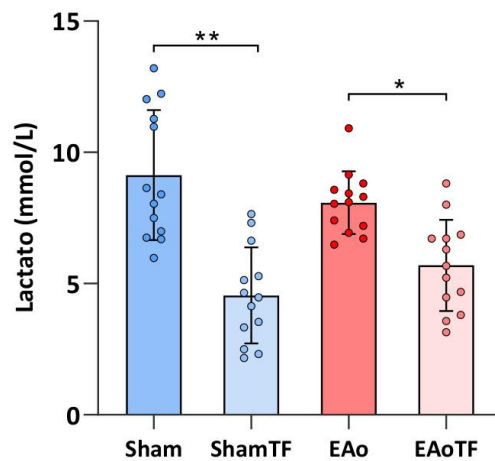


Figura 4. Concentração plasmática de lactato após o teste de esforço máximo pós-treinamento. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão. *:p<0,05; **: p<0,001.

4.2. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca

Os sinais clínico-patológicos de IC dos grupos EAo e EAoTF estão apresentados na **Figura 5**. O grupo EAo apresentou maior frequência de sinais em comparação ao grupo EAoTF. Além disso, o grupo EAoTF não apresentou ascite e congestão hepática. Nenhuma alteração foi observada nos grupos controles.

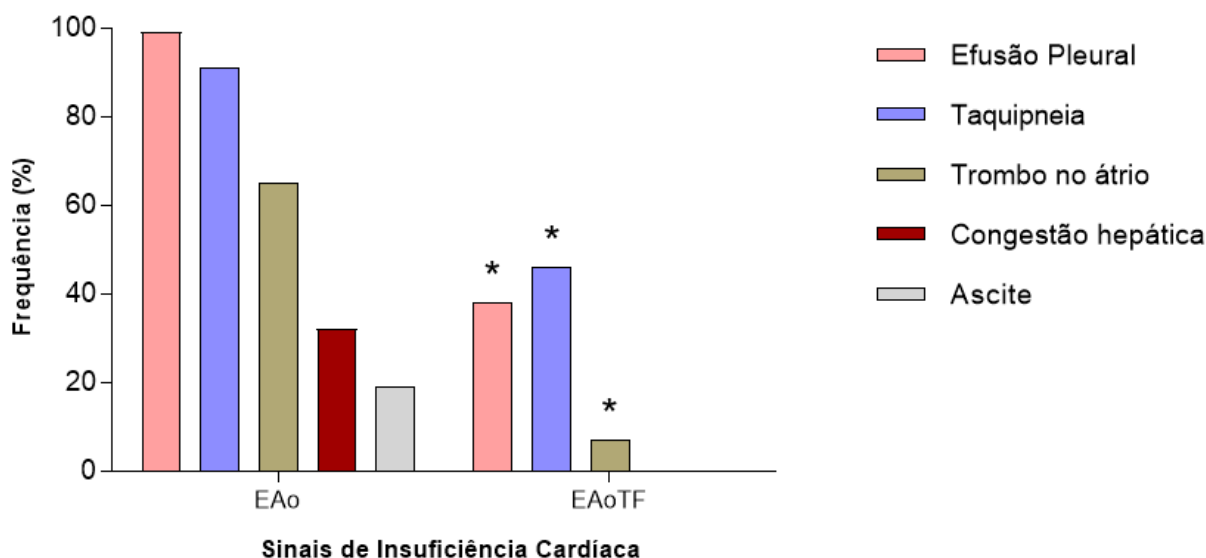


Figura 5. Sinais clínico-patológicos de IC. EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). Dados expressos em frequência relativa (%). Teste de associação de Goodman. $p < 0,05$. *: EAoTF vs EAo.

4.3. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A avaliação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático está apresentada na **Tabela 3**. Em relação ao VD, os grupos EAo e EAoTF apresentaram maior teor de água em relação aos respectivos controles (Sham e ShamTF). Com relação ao fígado, o grupo EAo mostrou aumento no teor de água comparado ao Sham, e o EAoTF apresentou diminuição em relação ao EAo.

Tabela 3. Teor de água dos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar

	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
VE[©]	74,3 (73,4; 76,6)	74,7 (74,1;76,5)	76,8 ± (75,0; 78,8)	76,1(75,0;77,8)
VD	76,2 ± 0,60	76,3 ± 0,70	77,6 ± 0,84*	77,2 ± 0,98&
AT	78,4 ± 1,27	78,8 ± 2,11	79,4 ± 0,76*	79,2 ± 0,93
Pulmão	78,3 ± 1,56	77,7 ± 7,40	80,5 ± 1,07	79,9 ± 0,87
Fígado	67,6 ± 1,23	68,1 ± 0,95	70,0 ± 1,57*	68,9 ± 1,10 [#]

Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis complementado com Dunn (não paramétrico). Dados expressos em média ± desvio padrão. [©]: Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75. p<0,05. *: EAo vs Sham; #: EAoTF vs EAo; &:EAoTF vs ShamTF.

4.4. Caracterização da remodelação cardíaca

4.4.1 Análise da estrutura e função cardíaca *in vivo*

A **Tabela 4** mostra os resultados ecocardiográficos dos roedores após 2 semanas de cirurgia, **antes de iniciar o TF**. Os grupos EAo e EAoTF apresentaram diminuição no DDVE, % Enc. Meso, S', onda E' e aumento do EDPP, ERVE, AE, AE/AO, onda E/E' em relação aos respectivos grupos controles (Sham e ShamTF). Além disso, os dados da 2 semana revelam a homogeneidade entre os grupos Sham/ShamTF e EAo/EAoTF para todas as variáveis; essas informações mostram que o resultado final após o protocolo de TFa é dependente somente da terapêutica aplicada nos animais.

Tabela 4. Avaliação ecocardiográfica dos 4 grupos experimentais após 2 semanas de cirurgia

	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
FC (bpm)	372 ± 47	375 ± 58	410 ± 59	357 ± 67
DDVE (mm)	6,11 ± 0,50	6,24 ± 0,53	5,44 ± 0,59*	5,80 ± 0,62 ^{&}
EDPP (mm) [®]	1,31 (1,28; 1,31)	1,28 (1,28; 1,28)	1,79 (1,65; 1,97) *	1,75 (1,64; 1,79) ^{&}
Esp.rel.VE	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,64 ± 0,08*	0,61 ± 0,07 ^{&}
AE (mm)	3,40 ± 0,32	3,53 ± 0,46	4,01 ± 0,31*	4,13 ± 0,57 ^{&}
AE/AO	1,13 ± 0,09	1,17 ± 0,11	1,23 ± 0,07*	1,31 ± 0,18 ^{&}
FE (%)	94,1 ± 2,00	94,3 ± 2,00	93,7 ± 1,00	94,6 ± 2,00
Enc. Meso (%)	30,3 ± 3,96	30,4 ± 4,10	26,1 ± 2,70*	26,3 ± 1,79 ^{&}
VEPP (mm/s)	74,6 ± 8,85	79,3 ± 7,61	72,4 ± 5,41	68,6 ± 10,0
s' (cm/s)	5,71 ± 0,39	5,77 ± 0,33	5,38 ± 0,36*	5,28 ± 0,51 ^{&}
TRIV (ms) [®]	22,0 (22,0; 22,0)	22,0 (20,0; 24,0)	19,0 (15,0; 22,0)	22,0 (19,0; 22,0)
TDE (ms)	44,1 ± 2,64	47,4 ± 5,11	43,7 ± 6,68	44,0 ± 4,69
Onda E (cm/s)	96,8 ± 12,2	99,6 ± 11,9	102 ± 18	104 ± 12
Onda A (cm/s)	65,6 ± 13,7	69,7 ± 9,94	75,3 ± 13,5	68,7 ± 17,3
E/A	1,51 ± 0,19	1,44 ± 0,11	1,39 ± 0,26	1,50 ± 0,22
E' (cm/s)	6,20 ± 0,65	6,14 ± 0,52	5,24 ± 0,79*	5,20 ± 1,17 ^{&}
A' (cm/s) [®]	4,40 (4,00; 5,10)	4,50 (4,20; 5,10)	3,40 (3,20; 4,80)	3,80 (3,60; 4,25)
E/E'	15,7 ± 2,34	16,2 ± 1,83	20,0 ± 4,57*	21,2 ± 5,99 ^{&}

Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); EDPP: espessura diastólica da parede posterior; ERVE: relação entre a espessura da parede e o diâmetro do VE; AE: átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; % FE: porcentagem fração de ejeção do VE; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; S': velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; Onda E: velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce (EVP); Onda A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio; E/A: relação entre as velocidades de fluxo transmitral nas fases de EVP e de contração atrial; E': velocidade do anel mitral durante o EVP; A': velocidade do anel mitral durante a contração atrial; E/E': relação entre a velocidade de fluxo transmitral durante o EVP e a velocidade do anel mitral durante o EVP. ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis complementado com Dunn (não paramétrico). Dados expressos em média ± desvio padrão. [®]: Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75. p<0,05. *: EAo vs Sham; &:EAoTF vs ShamTF.

A **Tabela 5** mostra os dados obtidos pelo ecocardiograma após o protocolo de TF na 18ª semana. O grupo EAo apresentou aumento do DDVE, EDPP, ERVE, relação AE/AO, onda E, razões E/A, E/E', e diminuição na FE, Enc. Meso, VEPP, E' e A', comparado ao Sham. O grupo EAoTF mostrou diminuição do DDVE, AE/AO, E/A e E'/E' e aumento da % FE, % Enc. Meso, VEPP, TDE, A' comparado ao EAo. Estes resultados mostram que o TF atenua as alterações estruturais e a disfunção sistólica e diastólica de ratos com EAo.

Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica após 18 semanas de cirurgia

	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
PCF (g)	491 ± 66,9	430 ± 54,4 [§]	422 ± 48,6*	364 ± 49,1 ^{#&}
FC (bpm)	289 ± 25	323 ± 38	316 ± 53	321 ± 55
DDVE (mm)	7,48 ± 0,50	7,47 ± 0,45	8,42 ± 0,61*	7,47 ± 0,93 [#]
EDPP (mm) [©]	1,53 (1,53; 1,53)	1,53 (1,50; 1,53)	2,81 (2,65; 2,81)*	2,55 (2,30; 2,68) ^{&}
Esp.rel.VE	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,67 ± 0,06*	0,68 ± 0,10 ^{&}
AE (mm) [©]	4,85 (4,60; 5,11)	4,85 (4,60; 5,11)	7,92 (7,66; 8,43)*	7,15 (6,39; 8,17) ^{&}
AE/AO	1,24 ± 0,10	1,23 ± 0,08	1,99 ± 0,19*	1,78 ± 0,34 ^{#&}
FE (%)	93,4 ± 2,00	93,5 ± 2,00	85,0 ± 5,00*	90,0 ± 3,00 ^{#&}
% Enc.Meso	27,2 ± 3,89	27,9 ± 3,00	20,6 ± 3,78*	23,7 ± 2,52 ^{#&}
VEPP (mm/s)	72,5 ± 3,80	72,8 ± 7,26	44,6 ± 6,68*	56,1 ± 11,8 ^{#&}
s' (cm/s) [©]	5,80 (5,70; 5,90)	5,70 (5,60; 5,80)	4,20 (3,80; 4,40)*	4,70 (4,40; 5,10) ^{&}
TRIV [©]	24,0 (22,0; 25,0)	22,0 (22,0; 25,0)	14,0 (12,0; 15,0)*	15,0 (13,5; 22,0) ^{&}
TDE	48,6 ± 2,80	48,3 ± 2,99	26,1 ± 6,44*	36,4 ± 10,3 ^{#&}
Onda E (cm/s) [©]	83,8 (82,0; 87,5)	82,0 (79,0; 86,3)	132 (116; 143)*	105 (95; 121) ^{&}
Onda A (cm/s) [©]	51,2 (48,2; 53,6)	55,4 (49,3; 62,7)	22,8 (20,3; 25,5)*	23,9 (19,7; 66,1) ^{&}
E/A	1,61 ± 0,17	1,50 ± 0,19	5,86 ± 0,96*	4,07 ± 2,48 ^{#&}
E' (cm/s)	5,65 ± 0,69	6,14 ± 0,73	5,08 ± 0,70*	5,52 ± 0,74 ^{&}
A' (cm/s)	3,83 ± 0,70	4,00 ± 0,38	2,77 ± 0,84*	3,52 ± 1,00 [#]
E/E'	15,3 ± 1,08	13,7 ± 1,36	26,2 ± 4,98*	20,1 ± 3,95 ^{#&}

Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). PCF: peso corporal final; Demais significados das variáveis, vide Tabela 4. ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis complementado com Dunn (não paramétrico). Dados expressos em média ± desvio padrão. [©]: Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75. p<0,05. *: EAo vs Sham; #: EAoTF vs EAo; &:EAoTF vs ShamTF. §: ShamTF vs Sham.

4.4.2. Análise macroscópica do coração *post mortem*

Os dados de estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos grupos analisados estão apresentados na **Tabela 6**. A EAo provocou aumento em todas variáveis estudadas, exceto na tibia, em relação ao Sham. O grupo EAoTF apresentou diminuição de todos os dados estruturais analisados, com exceção da tibia, comparado ao EAo.

Tabela 6. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem*

	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Tíbia (cm)	4,36 ± 0,07	4,30 ± 0,06	4,25 ± 0,12	4,24 ± 0,10
Coração (g)	1,21 ± 0,13	1,10 ± 0,18	2,45 ± 0,32*	1,86 ± 0,30#&
VE (g)	0,85 ± 0,09	0,77 ± 0,13	1,49 ± 0,19*	1,27 ± 0,15#&
VD (g)	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,52 ± 0,08*	0,32 ± 0,08#&
AT (g)	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,44 ± 0,09*	0,27 ± 0,09#&
Coração/Tíbia	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,58 ± 0,07*	0,44 ± 0,07#&
VE/Tíbia	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,35 ± 0,04*	0,30 ± 0,04#&
VD/Tíbia	0,057 ± 0,006	0,052 ± 0,008	0,123 ± 0,019*	0,075 ± 0,019#&
AT/Tíbia	0,026 ± 0,003	0,025 ± 0,004	0,102 ± 0,021*	0,063 ± 0,021#&

Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 13-15 por grupo). VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: soma do peso dos átrios direito e esquerdo. ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão. p<0,05. *: EAo vs Sham; #: EAoTF vs EAo; &: EAoTF vs ShamTF; §: ShamTF vs Sham.

4.5. Proteômica quantitativa por LC-MS/MS Label-free

A análise pelo software Progenesis permitiu a identificação e quantificação de 404 proteínas no tecido miocárdio, porém apenas 165 proteínas foram consideradas para o estudo comparativo, por atenderem ao critério de dois ou mais peptídeos únicos. Como o Progenesis só fornece como resultado, duas condições (média mais alta e mais baixa), houve a necessidade de utilizar o *software SigmaPlot 12*, para realizarmos a análise de variância e indentificarmos as comparações que respondam nossa pergunta biológica. Destas proteínas, 58 foram significativamente diferentes entre os quatro grupos estudados; constatamos que a EAo aumentou a expressão de 26 proteínas e diminuiu 26, enquanto o treinamento físico aeróbio elevou 01 e reduziu 09. Essas informações estão detalhadas na (**Tabela suplementar 1 e 2**).

Para representar graficamente os resultados do proteoma miocárdico, e compreender o nível de significância e magnitude das mudanças observadas neste estudo, realizamos a análise de agrupamento hierárquico de todas as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos EAo vs Sham e EAoTF vs EAo, que mostram uma separação evidente dos grupos experimentais (**Figuras 6 e 7**). Além disso, realizamos a análise multivariada de componentes principais (PCA), mostrando que de acordo com a agressão os animais de comportam de maneira diferente (**Figuras 6 e 7**).

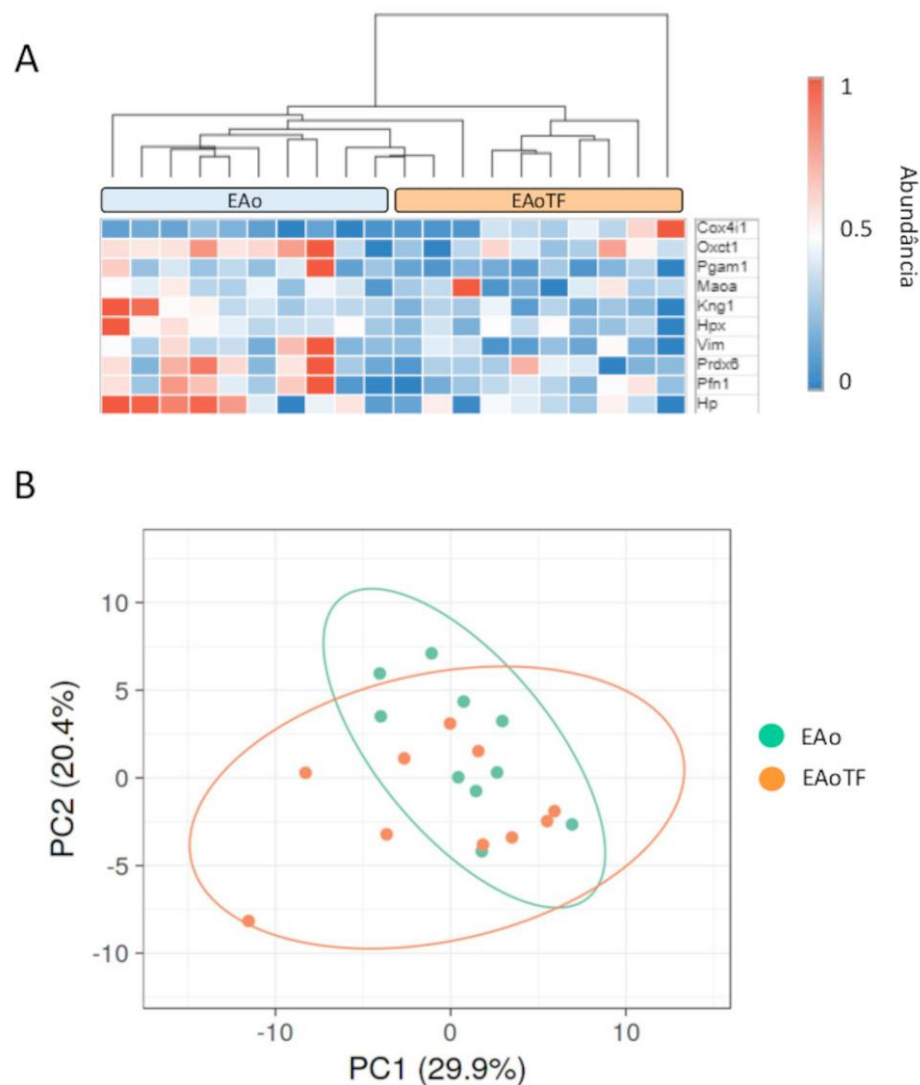


Figura 6. Agrupamento de dados proteômicos livre de marcação em tecido cardíaco de grupos EAO TF vs EAO. (A) Análises de agrupamento hierárquico (mapa de calor) usando distância euclidiana não supervisionada de todas as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. (B) Análise multivariada de componentes principais não supervisionada (PCA).

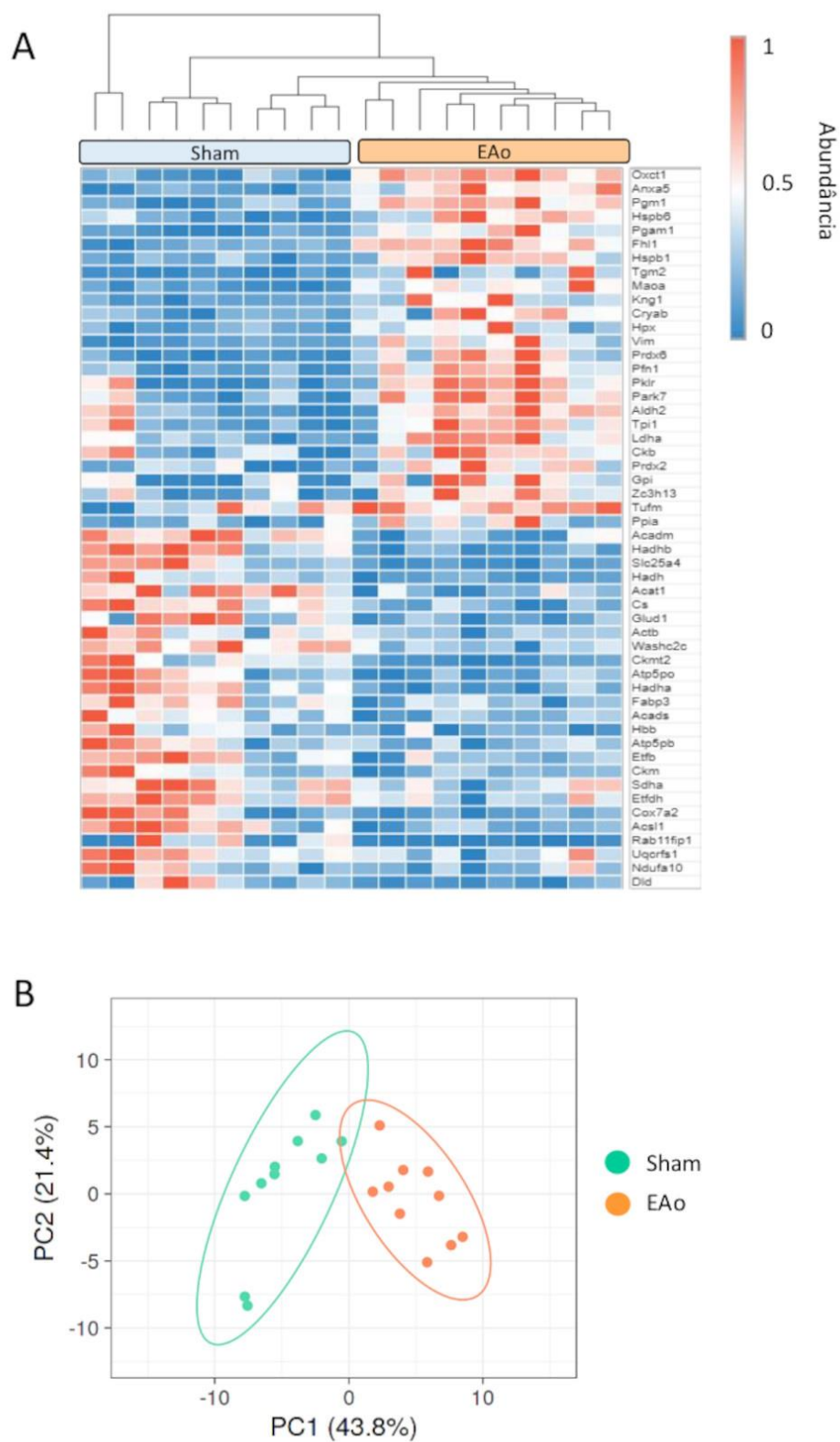


Figura 7. Agrupamento de dados proteômicos livre de marcação em tecido cardíaco de grupos EAo vs Sham. (A) Análises de agrupamento hierárquico (mapa de calor) usando distância euclidiana não supervisionada de todas as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. (B) Análise multivariada de componentes principais (PCA).

4.5.1 Análise de bioinformática

Os resultados proteômicos adquiridos por meio da análise quantitativa livre de marcação (*shotgun label free*) e foram submetidos a *softwares* de bioinformática para melhor elucidar as funções biológicas das proteínas com aumento e diminuição de expressão, enfocando em duas comparações (EAo vs Sham e EAoTF vs EAo). A lista das proteínas com suas respectivas funções biológicas esta apresentada nas **Tabelas 7 e 8**, e os nomes dos genes estão detalhados na **Tabela Suplementar 1**.

Tabela 7. Função biológica das proteínas do grupo EAo vs Sham

Função Biológica	Proteínas	
	<i>Aumentadas</i>	<i>Diminuídas</i>
Metabolismo dos lipídios		
Receptor de ácidos graxos	–	Fabp3
β-Oxidação mitocondrial	–	Acadm; Hadhb; Hadh; Acat1; Hadha; Acads; Etfb; Acsl1
Metabolismo da glicose		
Glicólise	Pgm1; Pklr; Tpi1; Ldha; Gpi	–
Metabolismo de corpos cetônicos		
Catabolismo	Oxct1	–
Ciclo do ácido cítrico	–	Cs; Glud1
Fosforilação oxidativa		
Cadeia de transporte de elétrons	–	Etfdh; Sdha; Cox7a2; Uqcrrfs1; Ndufa10; Dld
Complexo ATP-sintase	–	Atp5pb
Transferência de energia	Ckb	Ckm; Ckmt2
Estresse oxidativo e inflamação	Kng1; Ppia; Hpx; Aldh2	–
Defesa antioxidante	Prdx6; Prdx2; Park7	–
Citoesqueleto	Pfn1; Fhl1; Vim; Tgm2	Actb; Washc2c
Apoptose	Anxa5; Zc3h13; Maoa; Tufm	–
Antiapoptótica	Hspb6; Hspb1; Cryab	–
Transporte		
Prótons	–	Slc25a4; Atp5po
Oxigênio	–	Hbb
Intracelular de proteína	–	Uqcrrfs1

Tabela 8. Função biológica das proteínas do grupo EAoTF vs EAo

Função Biológica	Proteínas	
	Elevadas	Diminuídas
Metabolismo de corpos cetônicos		
Catabolismo	–	Oxct1
Metabolismo da glicose		
Glicólise	–	Pgam1
Fosforilação oxidativa		
Cadeia de transporte de elétrons	Cox4i1	–
Defesa antioxidante	–	Maoa; Hpx; Prdx6; Hp
Estresse oxidativo e inflamação	–	Kng1
Citoesqueleto	–	Vim; Pfn1

Para visualizarmos as possíveis relações entre as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, a rede de interação proteína-proteína foi construída usando o banco de dados *STRING*. Uma ampla rede de interação ocorreu entre a maioria das 52 proteínas diferencialmente expressas. O maior número das proteínas que apresentaram elevação ou diminuição da expressão no miocárdio de ratos com EAo vs Sham está relacionada a processos metabólicos, representados por círculos vermelhos (*False discovery rate*: 6.49e-18). A análise da rede também destacou fortes evidências para o metabolismo lipídico (círculo cinza), sendo a categoria funcional com maior número de alterações nas proteínas (**Figura 8**).

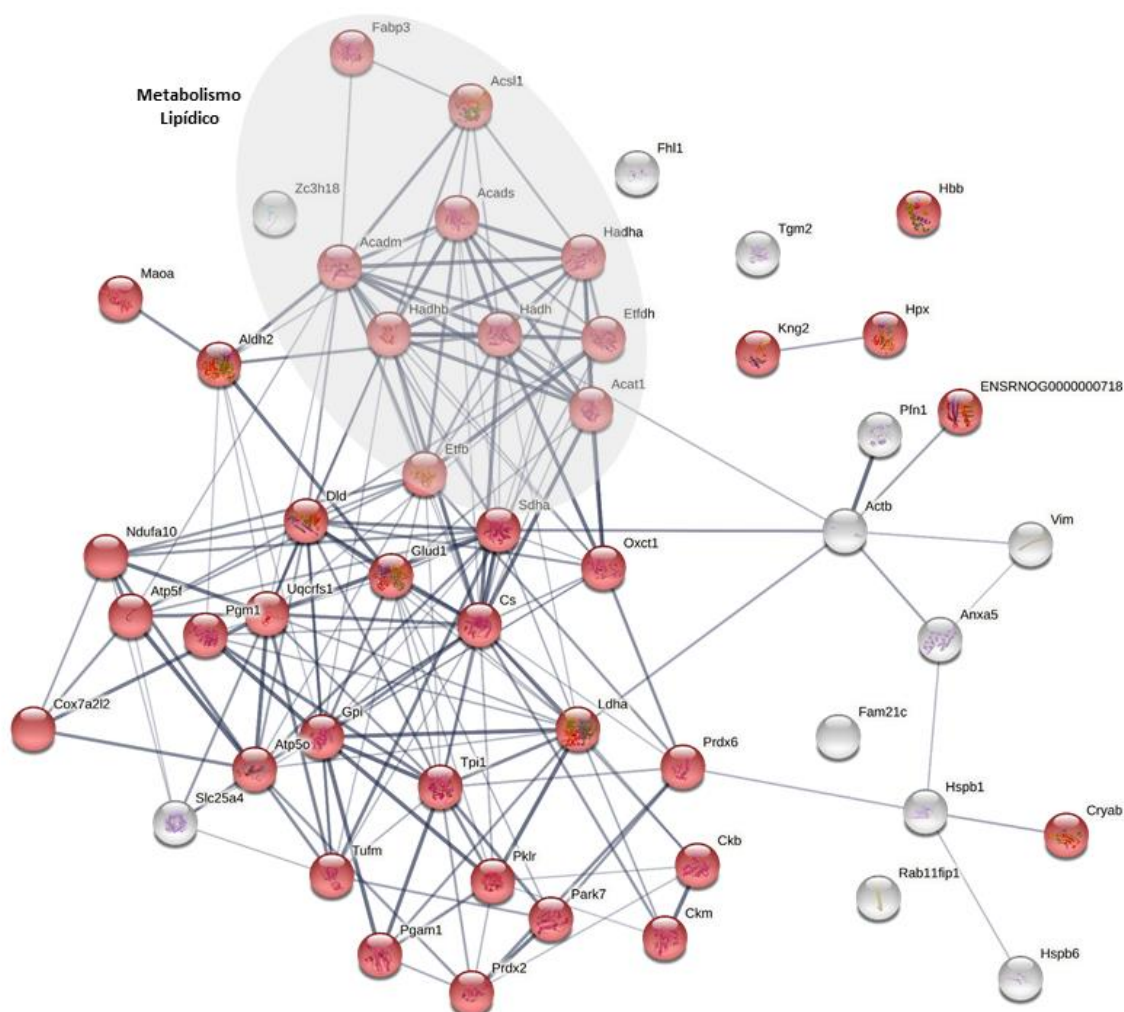


Figura 8. Rede de interação proteína-proteína diferencialmente expressas no miocárdio de ratos com EAO vs Sham. A análise da rede de interação foi construída usando o software on-line STRING com um nível de confiança médio (0,4). Os círculos representam proteínas, enquanto as linhas retas representam as interações entre diferentes proteínas. A espessura da linha indica a força da evidência, com conexões mais espessas indicando maior robustez na interação. Círculos vermelhos representam as proteínas dos processos metabólicos; círculo cinza delimita as proteínas do metabolismo lipídico.

Após o protocolo de TFa nos animais EAO, ocorreu alteração em 10 proteínas miocárdicas, sendo que a rede de interação mostrou que 50% delas se conectaram, a maioria relacionada à regulação biológica, que são representados por círculos azuis (false discovery rate: 0.0106). A análise da rede destacou fortes evidências para a desintoxicação de oxidante celular e resposta inflamatória aguda (círculo cinza) (**Figura 9**).

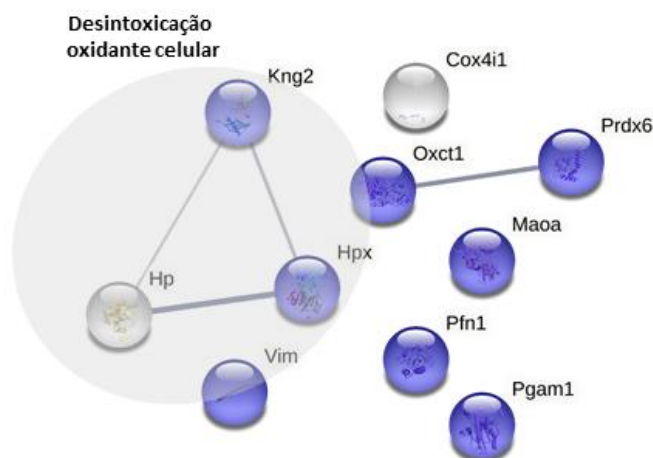


Figura 9. Rede de interação proteína-proteína de todas as proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de ratos com cardioproteção gerada pelo TFA vs EAO. As análises de rede de interação foram construídas usando o software on-line STRING com um nível de confiança médio (0,4). Os círculos representam proteínas, enquanto as linhas retas representam as interações entre diferentes proteínas. A espessura da linha indica a força da evidência, com conexões mais espessas indicando maior confiança na interação proteína-proteína. Círculos azuis representam as proteínas envolvidas nos processos de regulação biológica; círculo cinza delimita as proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos.

Para classificar as proteínas diferencialmente expressas de acordo com as anotações biológicas de “função molecular”, “processo biológico” e “componente celular” foi realizada a análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) pela ferramenta analítica (KOBAS 3.0). Nossos resultados mostraram que o grupo EAO gerou 270 termos ontológicos, enquanto que o treinamento físico aeróbio gerou 123 GOs significativamente expressos (**Tabela suplementar 3**).

Utilizando a ferramenta online REVIGO (*Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms*) (116), resumimos em termos *Parent* e *Child* os termos mais e menos expressos para as categorias *função molecular*, *processo biológico*, e *componente celular* entre as duas comparações. Com relação a EAO vs Sham, as proteínas alteradas apresentaram GO “funções moleculares” distintas, destacando-se a atividade da acetil-CoAtransferase, ligação de acil-CoA graxo e atividade de transferência de elétrons; a maioria das proteínas foram reguladas negativamente

(**Figura 10**). A maior parte das vias enriquecidas para o GO “processo biológico” estava envolvida no metabolismo lipídico, destacando-se a beta-oxidação de ácidos graxos, cadeia de transporte de elétrons e ciclo do ácido tricarboxílico; grande parte destas proteínas apresentou níveis diminuídos em animais com estenose aórtica. Por outro lado, as proteínas reguladas positivamente, estão relacionadas com o processo glicolítico, metabólico de carboidratos, resposta ao estresse oxidativo e hipóxia. Outras proteínas (*Up e Down*) estavam envolvidas em regulação de morte celular, cascata mapk ativada por estresse e processo baseado em filamento intermediário. A análise do GO “componente celular”, mostrou que a maioria das alterações estavam diminuídas e associadas às proteínas mitocondriais e matriz mitocondrial. Proteínas relacionadas ao sarcômero, como as pertencentes ao citoesqueleto e à maquinaria contrátil, representavam outros grupos de proteínas alteradas, sendo que maiorias estava regulada positivamente.

Com relação ao grupo EAoTF vs EAo (**Figura 11**) a análise do GO “funções moleculares” mostrou que o exercício modula negativamente a atividade oxidante, constituinte estrutural do citoesqueleto, e atua positivamente na atividade da citocromo c-oxidase. A avaliação do GO “processos biológicos” estão relacionados a desintoxicação de oxidante celular, vasodilatação, regulação do processo glicolítico, processo do sistema imunológico. É interessante ressaltar, que todas estas vias foram diminuídas pelo treinamento físico aeróbio. Quanto ao GO “componente celular”, a maiorias das vias enriquecidas estavam relacionadas com as mitocôndrias, citoesqueleto/maquinaria contrátil e o complexo haptoglobina-hemoglobina, que diminuíram com o exercício.

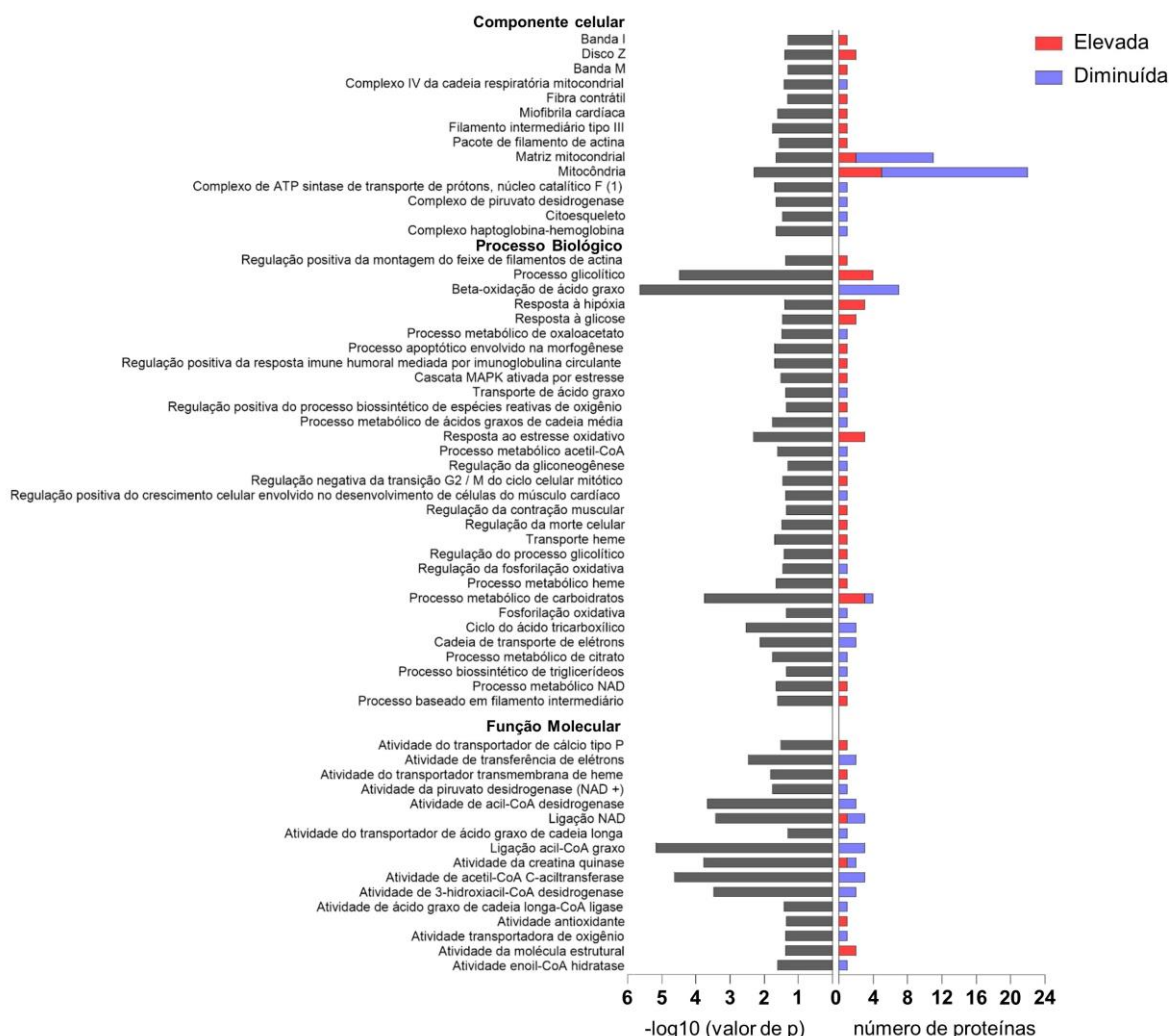


Figura 10. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) para proteínas *Up e Down* reguladas no miocárdio de ratos com EAO vs Sham. A análise foi realizada usando a ferramenta *Kobas* (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>), fornecendo os termos GO significativamente enriquecidos, Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular. No painel esquerdo, o eixo horizontal indica a significância ($-\log_{10}$ p-valor) da associação funcional, que é dependente do número de proteínas na classe. No painel direito, as mudanças no padrão de componentes celulares da proteína são exibidas como o número de proteínas com níveis aumentados ou diminuídos (eixo horizontal).

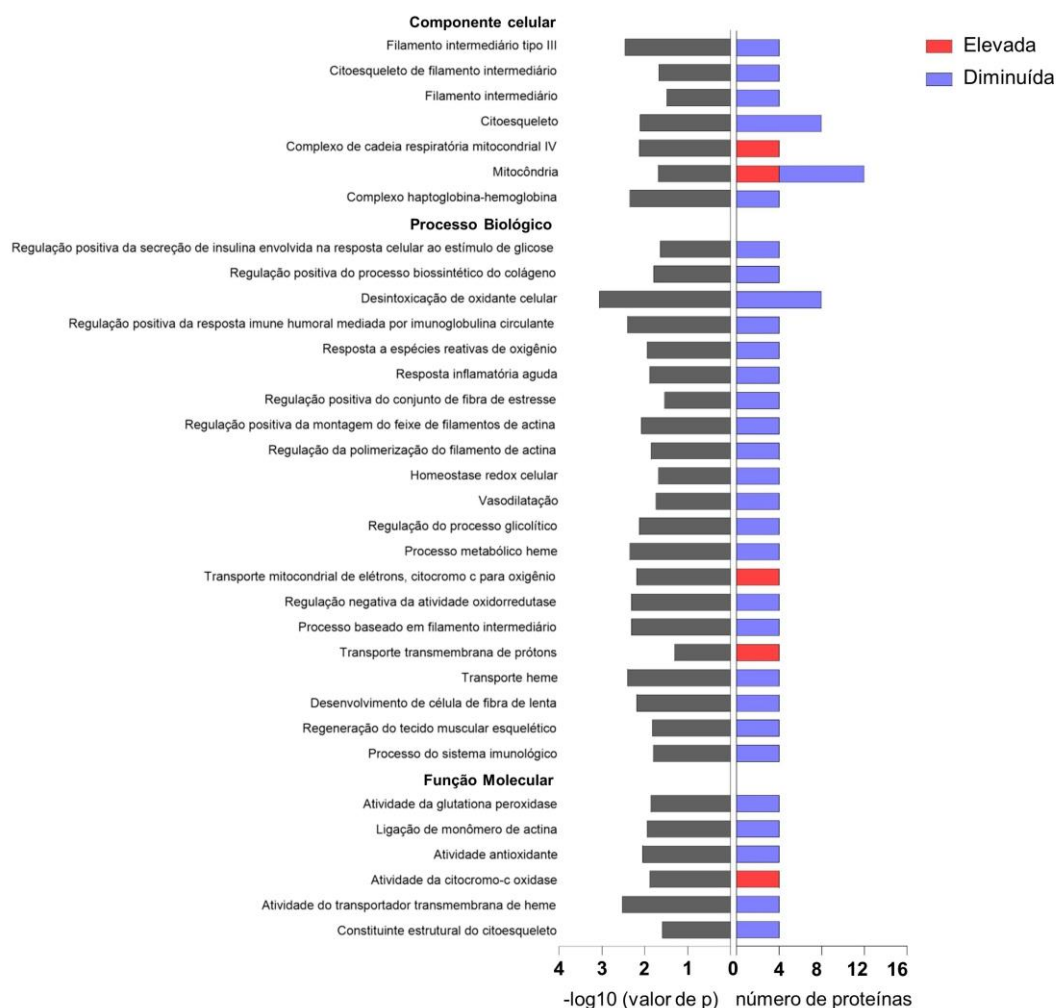


Figura 11. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) para proteínas *Up e Down* reguladas no miocárdio de ratos com EAoTF vs EAo. A análise foi realizada usando a ferramenta *Kobas* (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>), fornecendo os termos GO significativamente enriquecidos, Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular. No painel esquerdo, o eixo horizontal indica a significância ($-\log_{10}$ p-valor) da associação funcional, que é dependente do número de proteínas na classe. No painel direito, as mudanças no padrão de componentes celulares da proteína são exibidas como o número de proteínas com níveis aumentados ou diminuídos (eixo horizontal).

4.6. Expressão das proteínas relacionadas as vias de hipertrofia fisiológica e patológica

Para verificarmos a participação das vias relacionadas com a remodelação cardíaca adaptativa e mal adaptativa, realizamos a técnica de Western Blot para proteínas chaves nestas vias de sinalização, apresentadas nas **(Figuras 12 e 13)**. As proteínas da via patológica (JNK, p-JNK, p38, ERK e p-ERK), e da via fisiológica (PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR e p-mTOR), não apresentaram diferenças entre os quatro grupos. A expressão proteica da p-p38 foi maior nos grupos EAo e EAoTF em relação aos seus controles.

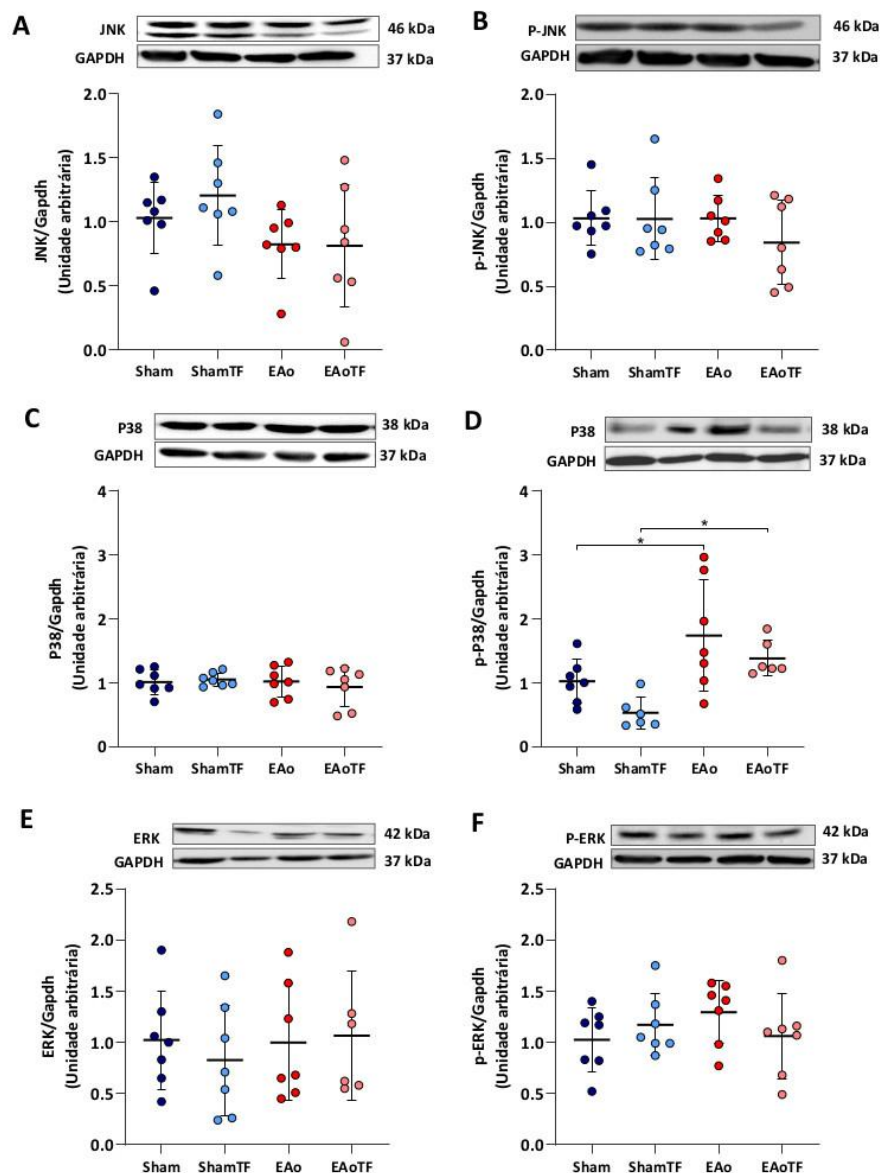


Figura 12. Expressão proteica da via hipertrófica patológica miocárdica. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 06 a 07 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni

(paramétrico). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. *: $p < 0,05$.

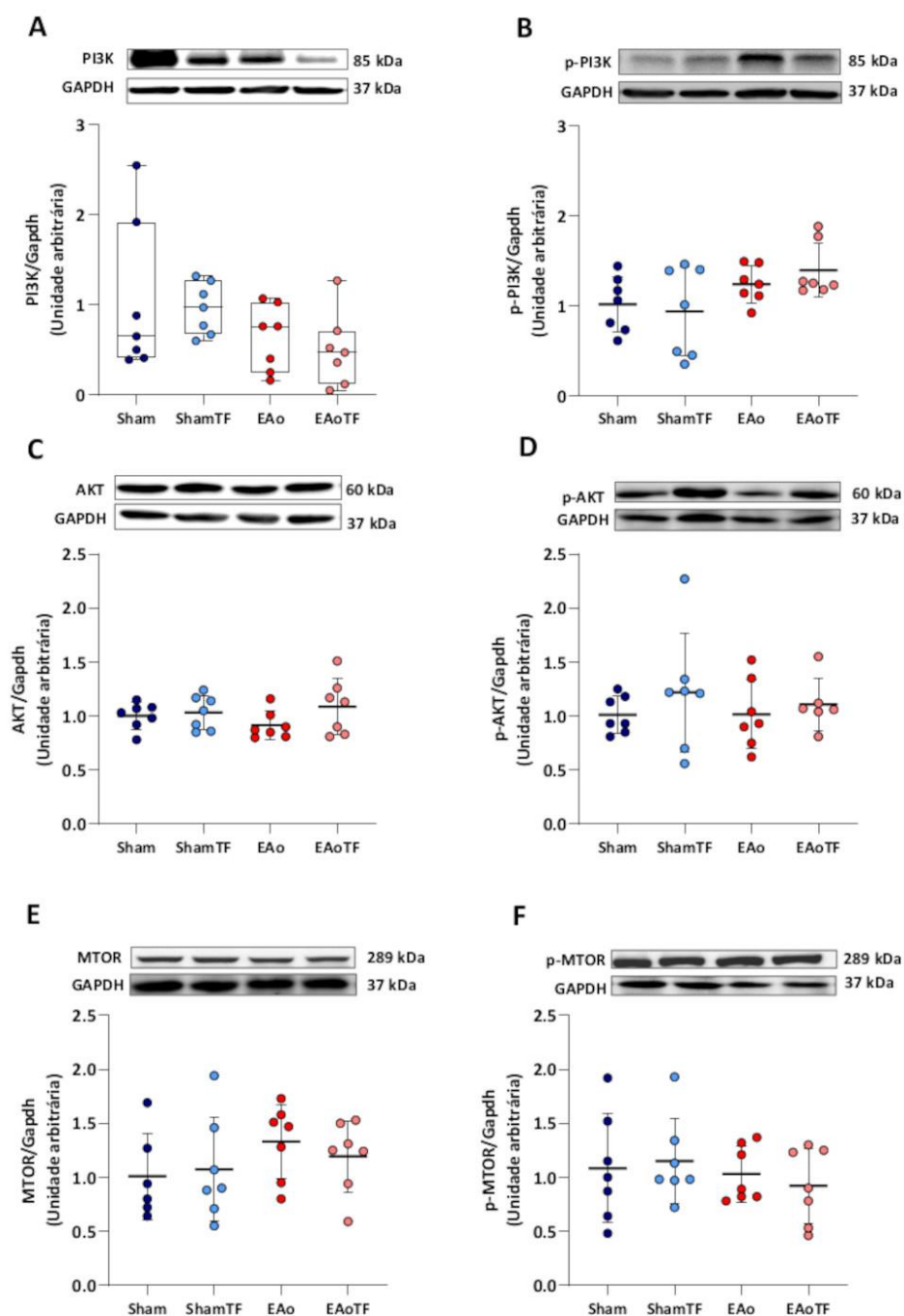


Figura 13. Expressão proteica da via hipertrófica fisiológica miocárdica. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 06 a 07 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis complementada com Dunn (não paramétrico).

4.7. Validação das proteínas diferencialmente expressas por Western Blotting

Para validar as proteínas diferencialmente expressas, o Western blot foi realizado para 4 proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco, que foram selecionadas com base na confiança da identificação da proteína, magnitude da mudança por proteômica, e o papel biológico no comprometimento cardíaco (**Figura 14**). Os dados proteômicos foram confirmados para as proteínas MCAD, FABP3 que diminuíram e LDH que aumentou no grupo EAo vs Sham. A expressão da PK, não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados, desta forma não corroborando com resultados proteômicos. Observação: As proteínas MCAD, FABP3 e LDH foram analisadas em outro estudo do grupo (56), que utilizou a mesma metodologia, e são apresentadas apenas como ferramenta de validação do proteoma. Em adição, analisamos a expressão da PK, também identificada na análise proteômica.

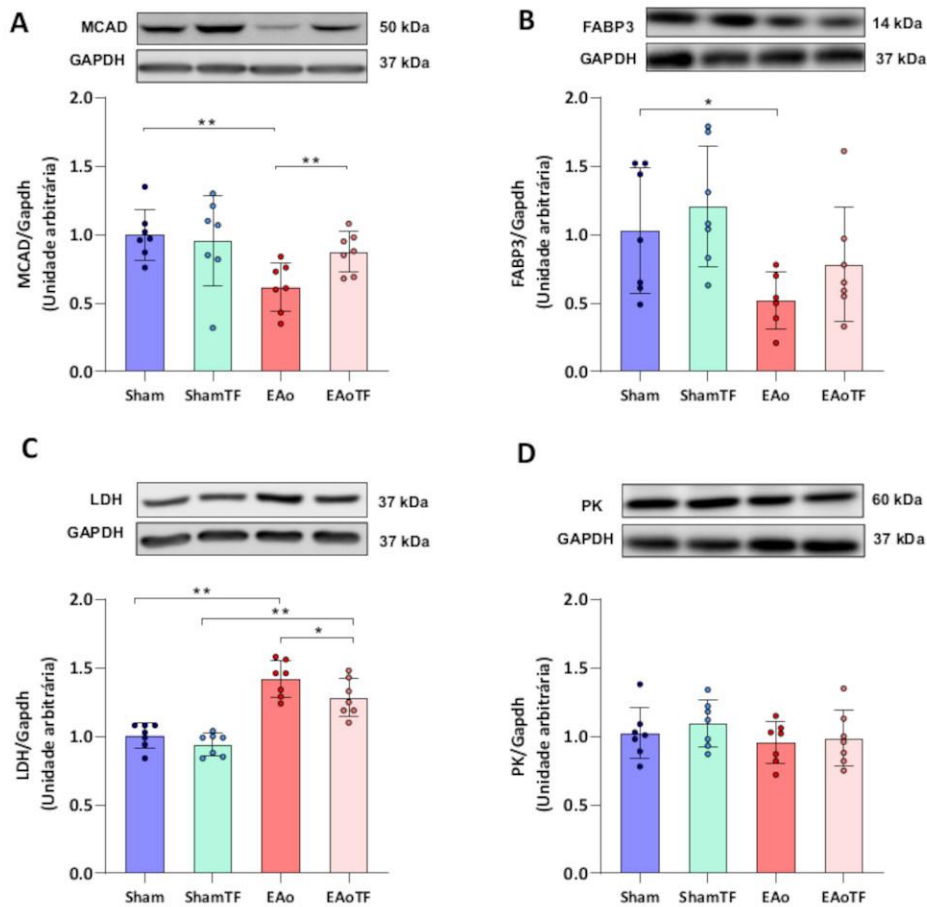


Figura 14. Verificação dos resultados proteômicos por Western blot. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 06 a 07 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$.

4.8. Validação das proteínas diferencialmente expressas por espectrofotometria

Para validar as proteínas diferencialmente expressas, as atividades enzimáticas de quatro proteínas envolvidas no metabolismo energético foram selecionadas com base na confiança da identificação da proteína, magnitude da mudança por proteômica, e o papel biológico no comprometimento cardíaco (**Figura 15**). Os dados proteômicos foram confirmados para BHAD, CS, CK que apresentarão diminuição no grupo EAo vs Sham. A atividade da LDH não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos, em discordância com os resultados da proteômica. Obsevação: As enzimas BHAD, CS, CK foram analisadas em outro estudo do grupo (56), que utilizou a mesma metodologia, e

são apresentadas apenas como ferramenta de validação do proteoma. Em adição, analisamos a atividade da LDH, também identificada na análise proteômica.

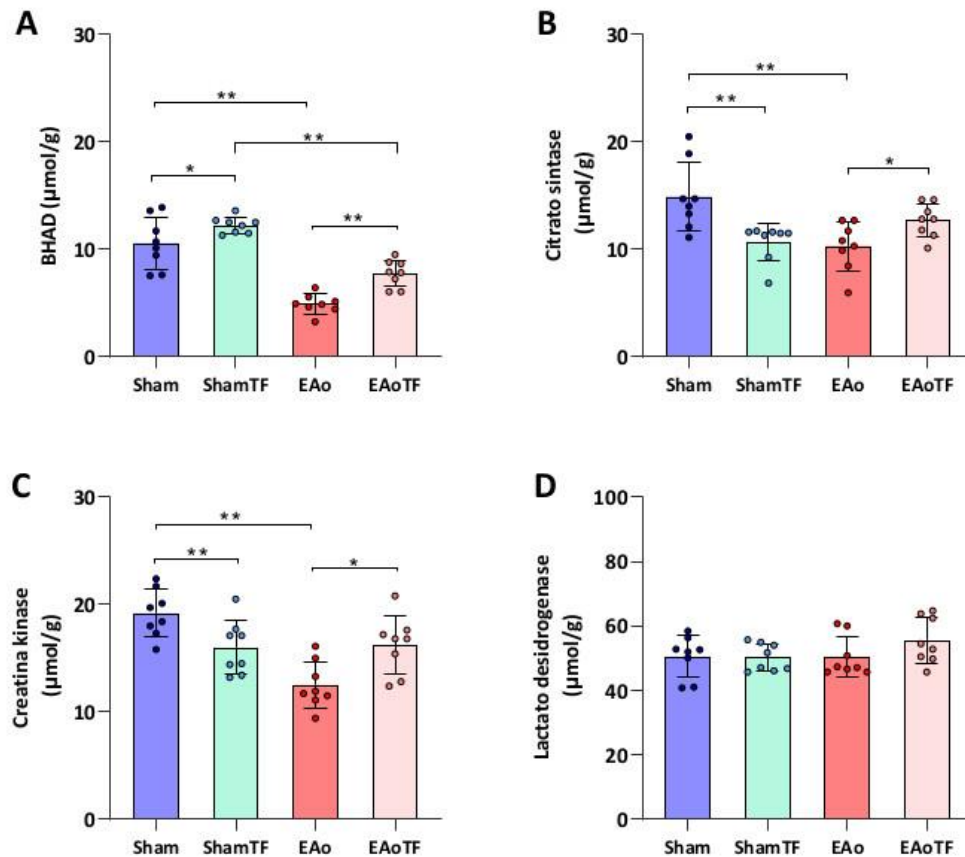


Figura 15. Verificação dos resultados proteômicos por espectrofotometria. Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 08 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico). Dados expressos em média ± desvio padrão. *: p<0,05; **: p<0,001.

Discussão

Two horizontal lines of different lengths and shades of gray are positioned below the title 'Discussão'. The top line is light gray and the bottom line is dark gray.

5. DISCUSSÃO

A visão molecular global dos mecanismos relacionados à cardioproteção gerada pelo treinamento físico aeróbio em animais com disfunção cardíaca por estenose aórtica supra-avalvar continua pouco compreendida. A proteômica *shotgun label-free* é uma ferramenta robusta que fornece novas informações sobre esses mecanismos biológicos. Desta forma, esta metodologia permitiu rastrear especificamente as alterações da expressão de proteínas no ventrículo esquerdo dos quatro grupos de animais estudados. A técnica utilizada identificou 57 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. A análise de bioinformática mostrou que a maioria das proteínas alteradas estão envolvidas no metabolismo energético (lipídico e glicolítico), estresse oxidativo, inflamação e arquitetura estrutural, além de fornecer novos *insights* sobre a disfunção cardíaca induzida por estenose aórtica, e como o treinamento físico atua sobre este processo.

5.1 Efeitos do treinamento físico sobre a capacidade funcional e níveis séricos do lactato

A prática do exercício físico regular tem sido foco de estudos por se tratar de abordagem terapêutica não farmacológica muito utilizada na prevenção e tratamento de diversas doenças. Pesquisadores têm investigado as respostas adaptativas benéficas, estruturais e funcionais proporcionadas pela prática frequente do exercício físico em vários sistemas orgânicos, entre eles, o cardiovascular (48,117). O exercício previne prejuízos proporcionados ao coração por diversos tipos de agressão, como: estenose aórtica, obesidade, infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica, entre outros (118–121).

Para obtermos melhoria do perfil cardiológico dos animais cardiopatas foi utilizado um protocolo de treinamento com volume moderado e baixa intensidade, em razão dos animais com a sobrecarga pressórica possuírem intolerância ao esforço físico. Importante salientar que o protocolo foi adaptado de estudos anteriores do grupo que utilizaram o mesmo modelo animal (15,16). Este treinamento foi efetivo em melhorar a aptidão física dos grupos ShamTF e EAoTF, conforme mostrado na **Figura 3**. A velocidade de exaustão, o tempo total de permanência na esteira e a distância percorrida foram significativamente maiores nos animais treinados em relação aos não exercitados. Estes

achados estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram a capacidade funcional de animais com EAo (11,15,16). Acreditamos que o aumento da capacidade funcional possa estar relacionado à otimização da eficiência oxidativa muscular e cardiocirculatória, advindas do treinamento físico (28,54).

Além disso, avaliamos também a concentração de lactato sanguíneo dos animais, marcador biológico do condicionamento físico, realizado imediatamente após o teste de esforço final, que nos permitiu observar a eficácia do protocolo de TFa empregado. Nossos resultados mostraram que houve diminuição do lactato nos animais treinados comparados aos seus respectivos controles. Estes achados indicam que a redução do lactato possa ter participado da melhoria da capacidade funcional. Os mecanismos responsáveis por esse fenômeno estão relacionados à maior oxidação de ácidos graxos, redução na magnitude de funcionamento da glicólise anaeróbia e a conversão do lactato em glicogênio, predominantemente no tecido hepático (122).

5.2 Efeitos do treinamento físico nos dados anatômicos *post mortem* e sinais clínicos de insuficiência cardíaca

A análise macroscópica cardíaca *post mortem* realizada na 18ª semana (**Tabela 6**), permitiu avaliar as alterações estruturais no coração remodelado. Foi observado hipertrofia ventricular esquerda e atrial nos animais com EAo, o que está de acordo com trabalhos anteriores (15,16). Além disso, o exercício acarretou atenuação da hipertrofia ventricular e atrial no grupo EAoTF; vários pesquisadores atribuem esta mudança em razão das vias fisiológicas ativadas pelo exercício contraregular as vias patológicas (48), o que não deve ter ocorrido em nosso estudo em razão de não termos encontrado diferença entre os grupos nas vias supracitadas. O modelo de EAo expõe o VE à sobrecarga de pressão prolongada levando-o à hipertrofia concêntrica, mecanismo compensatório para preservar a função sistólica. Inicialmente, a RC consegue manter a função cardíaca adequada, entretanto, se esse processo persistir, há deterioração do desempenho do coração (15). O estímulo para a RC pode ocorrer por fatores mecânicos e bioquímicos, que agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes na membrana sarcolemal, que via sinalizadores citosólicos, acarretam alterações na expressão gênica e desencadeiam maior síntese proteica miocárdica (53).

Após 18 semanas de experimento, a maioria dos animais EAO apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (**Figura 5**). O diagnóstico foi baseado na presença de taquipnéia e confirmado por achados *post mortem* como, trombo no átrio esquerdo, derrame pleural, ascite e congestão hepática. Os roedores que praticaram o exercício físico evidenciaram menor ou ausência da intensidade e frequência destes achados, demonstrando claramente que a terapêutica atenuou o desenvolvimento da IC nestes animais. Os resultados observados se devem ao fato do exercício se contrapor ao eixo vasoconstritor e retentor de sal e água, aumentando a diurese renal (48). Trabalhos anteriores corroboram nossos resultados (15,16), no entanto, Gomes et al. (54) não observaram diferença nos sinais de IC entre os grupos sedentário e treinado.

A insuficiência ventricular esquerda se manifesta principalmente por congestão pulmonar e, posteriormente, hepática. Neste estudo não foi observado incremento do teor de água no pulmão; entretanto, foi observado aumento do teor de água no VD, átrio e fígado, o que não ocorreu nos animais treinados. Não encontramos explicações para o desfecho observado no pulmão, desde que a falência cardíaca esquerda é acompanhada por congestão pulmonar.

5.3 Efeitos do treinamento físico na estrutura e função cardíaca

Como o objetivo de avaliar previamente a função e estrutura cardíaca antes de iniciar o TF, foi realizada a análise ecocardiográfica destes animais ao final da 2ª semana, com a finalidade de homogeneizar os grupos estudados. Os dados evidenciaram que a EAO ocasionou hipertrofia ventricular do tipo concêntrica, disfunção sistólica e diastólica. Os dados ecocardiográficos após 16 semanas de treinamento físico, mostraram atenuação das alterações estruturais ventriculares e atriais, e melhoria da função sistólica e diastólica de ratos com EAO. Diferentes mecanismos estão envolvidos na deterioração da função cardíaca (20). Como o principal objetivo deste estudo é avaliar as maquinarias relacionados a cardioproteção gerada pelo exercício físico, foi utilizada a abordagem proteômica com o intuito de proporcionar uma visão ampla da biologia dos mecanismos envolvidos na atenuação da disfunção cardíaca pelo treinamento físico.

5.4 Efeito da estenose aórtica supravalvar sobre o proteoma miocárdico

5.4.1 Metabolismo energético

O processo biológico mais evidente no proteoma cardíaco foi relacionado ao metabolismo energético, que apresentou diminuição na expressão das proteínas lipídicas (Fabp3, Acadm; Hadhb; Hadh; Acat1; Hadha; Acads; Etfb; Acsl1), e elevação das proteínas da via glicolítica (Pgm1; Pklr; Tpi1; Ldha; Gpi) em ratos com EAo vs Sham. Apesar da fisiopatologia complexa e multifatorial do dano cardíaco relacionada a sobrecarga de pressão, é bem estabelecido na literatura que as modificações no metabolismo energético é um dos principais contribuintes da disfunção ventricular (48). O coração é um órgão com alta plasticidade metabólica, podendo utilizar diferentes substratos como ácidos graxos (AG), glicose, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos para geração de ATP, necessária para o processo de contração e estiramento cardíaco (123). O AG é a principal fonte de energia, enquanto a glicose é reconhecidamente a segunda escolha; no coração adulto, cerca de 50-70% da síntese de ATP é normalmente oriunda da beta oxidação de AG, sendo a contribuição da via glicolítica em torno de 30-40% (124). Na remodelação patológica ocorre mudança no padrão de utilização do substrato energético miocárdico evidenciado por diminuição no metabolismo de AG, secundário à redução da expressão e atividade de proteínas envolvidas no processo de captação e oxidação; em paralelo, ocorre aumento na glicólise, sem aumento proporcional na oxidação mitocondrial desse substrato (125). Essa mudança do perfil metabólico é evento clássico no curso da remodelação, entretanto os fatores envolvidos não estão completamente compreendidos (125). Nossos resultados estão de acordo com os achados da literatura, desde que mostramos uma diminuição em proteínas chaves na regulação do metabolismo lipídico e um aumento da expressão das proteínas da via glicolítica.

Nossos dados proteômicos mostraram diminuição da abundância de proteínas envolvidas no ciclo de Krebs (Cs; Glud1), cadeia de transporte de elétrons (Etfdh; Sdha; Cox7a2; Uqcrcf1; Ndufa10; Dld), complexo ATP-Sintase (Atp5pb) no miocárdio de ratos com EAo, sugerindo que a produção de energia esta prejudicada. Estes resultados, junto com a diminuição das proteínas envolvidas na β -oxidação apontam para uma possível perda de função mitocondrial. De fato, a insuficiência cardíaca tem sido associada à disfunção mitocondrial pela diminuição da fosforilação oxidativa, desacoplamento

mitocondrial e redução da síntese de ATP (126). Nossos resultados são corroborados pela diminuição de duas proteínas cinases que participam da formação do ATP no citoplasma (Ckm; Ckmt2) (125).

Além das alterações no metabolismo lipídico, glicolítico, ciclo de Krebs e no sistema de fosforilação oxidativa, uma proteína chave relacionada ao metabolismo de cetonas também foi alterada pela sobrecarga pressórica. A alteração dos corpos cetônicos no miocárdio tem recebido crescente atenção (125). Este fenômeno é evidenciado no proteoma que mostrou aumento da expressão da proteína Oxct1, enzima responsável pelo catabolismo de corpos cetônicos, evidenciando a utilização de outro substrato energético como fonte de energia para a manutenção desta remodelação mal adaptativa. É fundamental ressaltar alguns aspectos sobre o uso deste substrato; há duas décadas não se sabia de fato qual a influência dos corpos cetônicos no miocárdio, benéfico ou maléfico (127). Com o decorrer dos anos a comunidade científica demonstrou que este substrato é altamente competitivo para o metabolismo oxidativo do coração remodelado (125,127). Além disso, os corpos cetônicos circulam em concentrações aumentadas no cenário da insuficiência cardíaca, diretamente proporcionais à gravidade da cardiopatia (127). Outro ponto importante está relacionado ao fato de que este substrato pode atuar de forma protetora por gerar menos espécies reativas de oxigênio (127). Consistente com nossos resultados, Aubert e colaboradores (128) utilizaram a proteômica mitocondrial quantitativa para identificar desarranjos metabólicos energéticos que ocorrem durante o desenvolvimento de hipertrofia e insuficiência cardíaca em modelo de camundongos com constrição transversa da aorta. Os autores mostraram que as quantidades de proteínas envolvidas na utilização de ácidos graxos foram diminuídas; por outro lado, a expressão de β -hidroxibutirato desidrogenase 1 (Bdh1), enzima chave na via de oxidação dos corpos cetônicos, foi aumentada. Recentemente, Byrne e colaboradores (129) mostraram que as elevadas concentrações de cetonas circulantes podem reduzir a inflamação miocárdica e impedir o desenvolvimento da falência cardíaca. Neste sentido, estudos futuros são necessários para determinar a relevância destes achados na insuficiência cardíaca em humanos, e delinear o impacto da utilização crônica de cetonas no tratamento da disfunção ventricular.

5.4.2 Estresse oxidativo e inflamação

O estresse oxidativo, definido como uma produção excessiva de espécies reativas do oxigênio (ROS) em relação à defesa antioxidante, desempenha um papel importante na fisiopatologia da insuficiência cardíaca (130). Alterações metabólicas encontradas no coração em falência, principalmente diminuição da β -oxidação, disfunção mitocondrial e aumento da oxidação de glicose, podem causar aumento da liberação de ROS. A exposição prolongada a espécies reativas acarreta a efeitos deletérios, como disfunção celular, peroxidação proteica e lipídica, dano ao DNA e, eventualmente, leva a morte celular (131). Em concordância com a literatura, nossos dados proteômicos evidenciaram várias proteínas alteradas relacionadas aos mecanismos de defesa antioxidante (Prdx6, Maa, Prdx2, Park7). Duas proteínas, enzimas antioxidantes mitocondriais, estão elevadas, a Prdx2, responsável pela desintoxicação de ROS, principalmente de peróxido de hidrogênio, e a Prdx6, que também desempenha papel no *turnover* de fosfolipídios celulares, reparando a membrana celular peroxidada (132). A proteína de Parkinson 7 (Park7/DJ-1) também se encontra elevada no grupo EAO. Esta proteína, primeiramente identificada na doença de Parkinson, participa da homeostase celular e está envolvida em vários processos biológicos, como regulação transcricional, controle da função mitocondrial, proteólise, autofagia e atividades das chaperonas (133). Essa proteína é expressa no tecido cardíaco onde exerce papel antioxidante, e sua ausência tem sido ligada ao aumento do infarto do miocárdio, injúria pós isquemia-reperfusão e aumento da disfunção ventricular por sobrecarga pressórica (134,135). Em condições basais não oxidativas, a Park7 impede a tradução de mRNAs envolvidos no combate ao estresse oxidativo, como p53, superóxido dismutase e proteínas envolvidas na síntese de glutathione (136,137). Deficiência dessa proteína no coração conduz a maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (138). Estudo *in vitro* com linhagens celulares cardíacas observaram que a alta expressão de Park7 estava relacionada com redução da morte celular, diminuição da produção de ROS e aumento da síntese de enzimas antioxidantes em condições de isquemia-reperfusão (139,140). Outro estudo mostrou que redução da via pro-apoptótica (PTEN) e o estímulo da via PI3K/Akt foi mediada via Park7 (141). Em modelo experimental com bandagem aórtica, pesquisadores observaram que animais deficientes dessa proteína

desenvolveram exagerada hipertrofia cardíaca e suscetibilidade ao desenvolvimento da IC. Além disso, esses animais apresentaram aumento da oxidação de DNA e da apoptose dos cardiomiócitos e comprometimento da gênese mitocondrial e da cadeia respiratória (134).

Além do estresse oxidativo, a Park7 também está envolvida na modulação do estresse glicativo (142). O estresse glicativo ocorre quando compostos dicarbonil provenientes da oxidação glicolítica e peroxidação lipídica, reagem não enzimaticamente com aminoácidos de proteínas por um processo chamado glicação ou glicosilação não enzimática, o qual é responsável por gerar produtos finais de glicação avançada (AGEs) (143,144). Esses produtos, ao reagirem com seus receptores (RAGE), culminam na propagação dos sinais de estresse, ativação de quinases ativadas por mitógenos e de vias pró-apoptóticas (145). A sinalização AGE-RAGE resulta em estresse glicativo e contribui para a injúria tecidual (146). Além disso, aumento da demanda da expressão de RAGE aumenta o estresse oxidativo, que por sua vez, resulta no aumento da produção de AGEs, perpetuando o sinal de estresse (147). Estudos realizados com humanos mostraram que AGE-RAGE estão implicados na insuficiência cardíaca (148,149). Estudos in vitro mostraram que atividade proteolítica da Park7 age contra o estresse glicativo (143). Um trabalho experimental recente evidenciou que expressão endógena de Park7 protege contra o desenvolvimento de insuficiência cardíaca induzida por isquemia-reperfusão por reduzir o estresse glicativo (142).

Acreditamos que o comportamento das proteínas Prdx6, Maoa, Prdx2 e Park7 refletem uma resposta compensatória para combater a elevação de ROS. Vários pesquisadores mostraram que existe um aumento das defesas antioxidantes em condição de insuficiência cardíaca (150). Este mecanismo de defesa, embora aumentado, não foi suficiente para impedir o estado pró-oxidante, o qual pode ter sido um dos mediadores para a falência cardíaca constatada neste estudo. Comprovando esta ideia, realizamos a expressão proteica da COX-2, marcador de estresse oxidativo e inflamação, que está aumentado no grupo EAO vs Sham (dado não mostrado).

Nossa análise mostrou que as proteínas Ppia, Kng1, Hpx, e Aldh2 relacionadas com inflamação, tiveram aumento de expressão em animais com hipertrofia patológica. Nos últimos anos pesquisas com doenças cardiovasculares têm mostrado a importância da família proteica chamada peptidil-prolil cis-trans-isomerases (PPIases), encodadas

pelo gene *Ppia*. Essas proteínas são imunofilinas que catalisam a isomeração de ligações peptídicas para acelerar o enovelamento de proteína (151). Algumas PPIases possuem afinidade com a ciclosporina A e são classificadas em ciclofilinas, as quais suas distintas isoformas são coadjuvantes em inúmeras doenças cardiovasculares (152). A ciclofilina A, por exemplo, tem papel chave no transporte e modelagem estrutural de proteínas, modulação imunológica e sinalização celular (153). No entanto, a ciclofilina A também está envolvida com perpetuação da injúria após isquemia-reperusão por aumentar a infiltração de macrófagos e neutrófilos na área danificada (154), induzir a ativação de fibroblastos e promover hipertrofia cardíaca (155). Estudos mecanísticos mostraram que ausência dessa proteína em vários modelos animais reduz a inflamação, estresse oxidativo e degradação de matriz extracelular (154) além de prevenir a formação de aneurisma aórtico abdominal em resposta a angiotensina II (156). O cininogênio 1 (*Kng1*) é a precursora de bradicinina que desempenha importante papel pró-inflamatório, pró-apoptótico e pró-oxidante (157). Foi observado que, em cardiomiócitos de camundongos neonatais, o aumento da produção de *Kng1* após exposição a doxorubicina, contribui para o agravamento do dano cardíaco por induzir aumento do estresse oxidativo pelas mitocôndrias. Depleção da produção do *Kng1*, reverteu o quadro e mostrou diminuição da citotoxicidade nos cardiomiócitos (158). A hemopexina (*Hpx*) é uma proteína plasmática que tem função de *scavenger*, liga-se a proteínas heme que estão livres no plasma facilitando sua captação pelo fígado e baço e consequente eliminação (159). Essa função figura o efeito benéfico da *Hpx*, já que proteínas heme livres induz a oxidação, promovendo disfunção endotelial e vasoconstrição. O efeito benéfico de *Hpx* também foi evidenciado em um estudo experimental de hemólise crônica, onde a *Hpx* inibiu a ativação dependente de heme da via de sinalização inflamatória do receptor *Toll-like 4*, contribuindo para a redução da formação de ROS endotelial (160). O aumento da expressão destas proteínas inflamatórias observadas neste estudo, está em paralelo com o grau de comprometimento funcional e estrutural no grupo EAO.

5.4.3 Arquitetura estrutural

Enquanto proteínas associadas ao citoesqueleto, Pfn1, Fhl1, Vim e Tgm2, apresentaram aumento, outras, Actb e Washc2c mostraram diminuição da abundância em animais com estenose aórtica. O citoesqueleto cardíaco é importante para manter a integridade estrutural e funcional do cardiomiócito em condições fisiológicas e patológicas. Distúrbios nos componentes do citoesqueleto têm sido fortemente associados a cardiopatias (161). Está bem estabelecido que a Pfn1 é uma proteína de ligação à actina, conservada evolutivamente, que exerce função na regulação da dinâmica do citoesqueleto, promovendo a polimerização da actina (162). Vários estudos têm demonstrado que o aumento da expressão da Pfn1 está associado a disfunção endotelial, inflamação vascular e remodelação sob estímulos patológicos, incluindo AGEs (163) e angiotensina II (164,165). Em relação a Fhl1, poucos trabalhos avaliaram seu papel nas doenças cardiovasculares; as evidências indicam que esta proteína faz parte de um complexo no sarcômero dos cardiomiócitos que detecta respostas biomecânicas induzidas por estresse, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento da hipertrofia patológica do VE (166). Foi demonstrado que a Fhl1 é essencial para a detecção biomecânica de estresse miocárdico, uma vez que camundongos nocaute para Fhl1, mostraram atenuação da resposta hipertrófica após constrição aórtica transversal (166). A elevação da expressão desta proteína também foi encontrada por outros pesquisadores em diferentes modelos de hipertrofia ventricular (167). Os resultados observados em relação as proteínas estruturais mostram que os desequilíbrios nos níveis proteicos podem explicar, em parte, a disfunção cardíaca observada nos ratos com sobrecarga pressórica. Nossos dados corroboram com as informações da literatura, com o aumento da expressão destas proteínas no miocárdio de ratos com IC. Além disso, estudos adicionais, indicaram que a anormalidade do citoesqueleto é uma alteração precoce durante a hipertrofia ventricular esquerda e subsequente falência cardíaca (168,169).

5.4.4 Homeostase celular

Algumas proteínas que participam da apoptose (Anxa5, Zc3h13, Maoa) foram elevadas no miocárdio pela estenose aórtica, e com o intuito de contra regular esta resposta, proteínas anti-apoptóticas (Hspb6, Hspb1, Cryab) também tiveram sua expressão aumentada neste estudo na condição de insuficiência cardíaca. É bem estabelecido que a apoptose dos cardiomiócitos é um mecanismo estimulado em várias patologias cardiovasculares. A apoptose destas células ocorre devido a morte celular, comprometimento da fosforilação oxidativa e geração de ATP por perda mitocondrial, e disfunção progressiva da contratilidade de cardiomiócitos viáveis (170). Este mecanismo induz ao longo do tempo a deterioração da função e desenvolvimento da insuficiência cardíaca (171).

A anexina A5 (Anxa5), é uma proteína de ligação a fosfolipídios, que possui alta afinidade com células inviáveis, as quais expressam externamente a fosfatidilserina como um marcador para fagocitose (172,173). Evidências mostraram que anexina 5 foi aumentada em pacientes em tratamento para a hipertensão arterial, provavelmente como um mecanismo de defesa com efeito anticoagulante e anti-inflamatório (174). A estimulação com Anxa5 também atenuou a resposta inflamatória e o tamanho do infarto e melhorou a função cardíaca após isquemia-reperfusão em ratos (175). A Anxa5 também se liga ao Ca^{2+} sendo realocada no sarcômero e secretada durante a ativação da apoptose, podendo contribuir para a desregulação do manuseio de cálcio cardíaco e deterioração da função sistólica em pacientes com IC (176,177). Foi observada em pacientes hipertensivos uma associação entre a alta produção de Anxa5 miocárdica e piora da função sistólica, no entanto esses resultados não foram influenciados pela apoptose (178).

A enzima mitocondrial Maoa (monoamina oxidase A) é uma potente indutora de ROS no coração, estando vinculada com o início e progressão de várias doenças cardíacas (179,180). A expressão da Maoa é aumentada em modelos animais com diabetes, hipertensão e constrição aórtica transversa (181,182) sendo associada com IC por aumentar a disfunção mitocondrial e dano cardíaco (181). O estresse oxidativo gerado por Maoa prejudicou a função dos lisossomos cardíacos, levando ao bloqueio do fluxo autofágico e acúmulo de mitocôndrias danificadas em cardiomiócitos de ratos (183).

As proteínas do choque térmico (HSP), especificamente a Hspb6 e Hspb1, são chaperonas moleculares que participam ativamente da homeostasia celular cardíaca, por prevenir o acúmulo de proteínas mal dobradas ou não dobradas nas células (184). A manutenção metabólica e contrátil do coração requer um alto grau de qualidade na síntese proteica, no entanto, o estresse oxidativo e mecânico neste órgão permite o acúmulo de proteínas mal formadas ou danificadas, as quais são tóxicas para os cardiomiócitos (185). O comportamento das chaperonas observado neste estudo, provavelmente estão relacionados com o mecanismo de defesa do coração insuficiente, desde que a família das HSP, promovem proteção para o miocárdio. Os nossos resultados estão de acordo com a literatura, desde que o proteoma dos animais com EAo, evidenciou proteínas relacionadas com o aumento da apoptose (186–188).

A **Figura 16** mostra a visão geral dos efeitos da estenose aórtica supralvar sobre o proteoma miocárdico de ratos. O nome das proteínas codificadas pelos genes está detalhado na **Tabela Suplementar 1**.

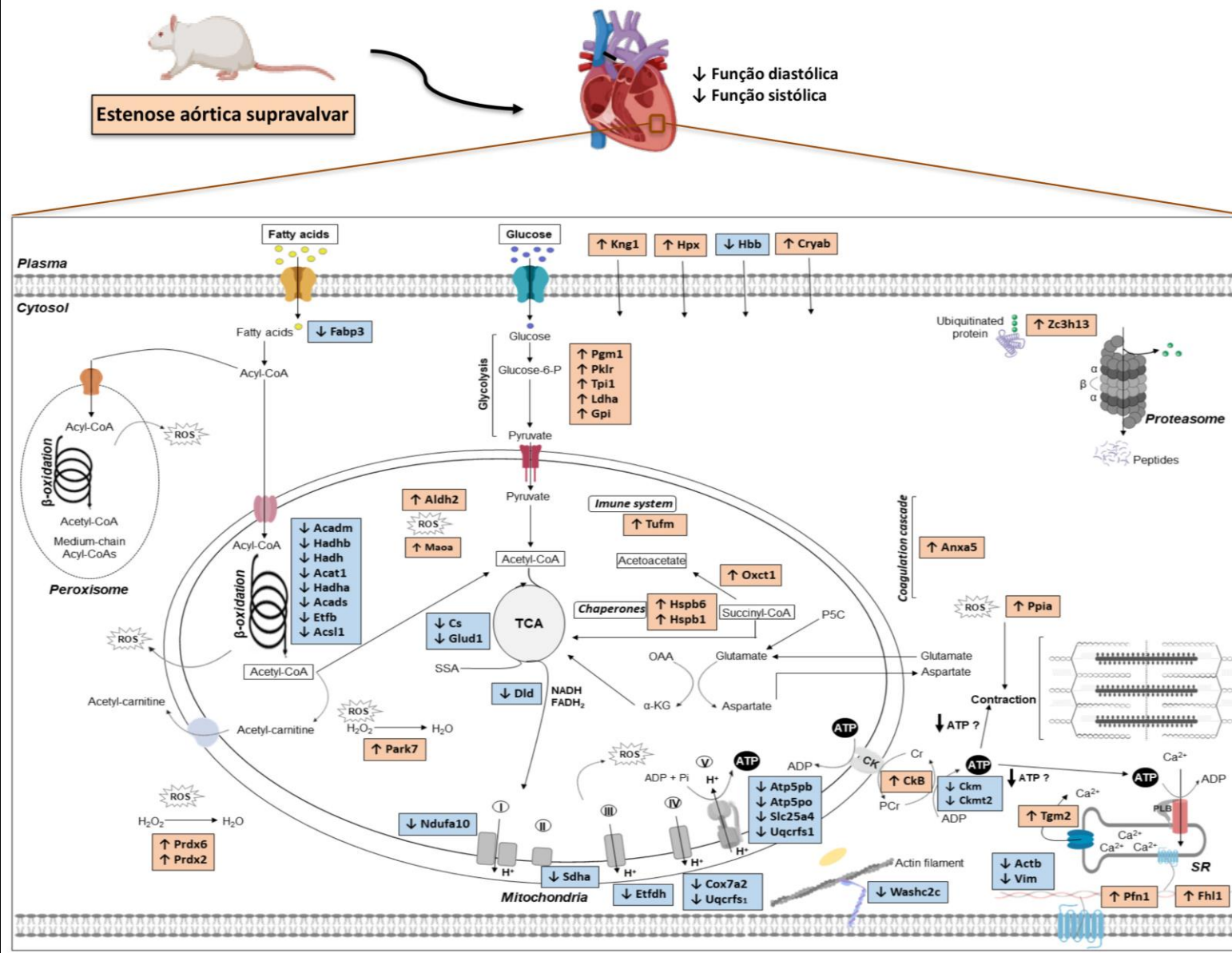


Figura 16. Visão geral dos efeitos da estenose aórtica supravalvar sobre o proteoma miocárdico de ratos. As proteínas identificadas são mostradas de acordo com a alteração; cor vermelha para proteínas reguladas positivamente e cor azul para proteínas reguladas negativamente no miocárdio de ratos EAO vs Sham. ROS, espécies reativas de oxigênio; AGEs, produtos finais de glicação avançada; P5C, pirrolina-5-carboxilato; OAA, oxaloacetato; α -KG, α -cetoglutarato; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; SSA, succinato semialdeído; I, II, III, IV e V, complexos de fosforilação oxidativa mitocondrial (I-IV: complexos de cadeia respiratória; V: complexo de ATP sintase); CK, creatina quinase; Cr, creatina; PCr, fosfocreatina; SR, retículo sarcoplasmático. A descrição detalhada dos nomes das proteínas é mostrada na Tabela Suplementar 1.

5.5 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre o proteoma miocárdico

5.5.1 Metabolismo energético

Entre as proteínas diferencialmente expressas, o protocolo de treinamento físico foi capaz de modular 10 proteínas, sendo 01 elevada e 09 diminuídas. Elegantemente, o exercício aumentou a expressão da Cox4i1, proteína relacionada com a biogênese mitocondrial. A hipóxia tecidual é um estímulo importante para as mudanças estruturais e funcionais no miocárdio (189). O regulador master da resposta à hipóxia, fator induzível por hipóxia (HIF-1 α), regula a enzima oxidativa citocromo C-oxidase (COX4), dependente de oxigênio, recrutando alternadamente as isoformas COX4-1 (*COX4I1*) e COX4-2 (*COX4I2*) (190). Em condições de normóxia, a expressão gênica de Cox4i1 está aumentada, e a Cox4i2 está reprimida. Alternativamente, sob condições de hipóxia, a atividade de HIF-1 α é elevada juntamente com uma série de genes, incluindo *Cox4i2*, necessário para a degradação da proteína Cox4i1. Autores propuseram que a troca da subunidade COX4 garante a máxima eficiência da respiração sob diferentes condições de oxigênio (190). Nossos resultados mostram que o exercício foi efetivo em aumentar a expressão da Cox4i1, o que nos leva a crer que houve aumento da oferta de oxigênio tecidual. Validando esta concepção, foi realizado a expressão proteica do HIF-1 no miocárdio de ratos com EAo, utilizando a mesma metodologia deste trabalho (56), que verificou que o exercício diminuiu o regulador máster da hipóxia tecidual causada pela sobrecarga pressórica. Estes resultados, na nossa visão, indicam que um dos mecanismos da cardioproteção gerada pelo exercício parece estar relacionado com a biogênese mitocondrial.

Interessantemente, tivemos uma diminuição na proteína Oxct1 com o exercício, que como descrita no item 5.4.1, está relacionada com o metabolismo energético de cetonas. Se trata de uma enzima que regula o catabolismo de corpos cetônicos, que é utilizado como substrato energético pelas células para geração de energia. Não encontramos estudos, descrevendo como o treinamento modula o seu papel no organismo em condição de insuficiência cardíaca. Importante ressaltar, que o uso deste substrato energético pelo coração é encontrado no estágio falência cardíaca, e possui

efeito cardioprotetor (127). Em razão da diminuição da Oxct1 pelo treinamento físico, esse tratamento não farmacológico poderia ser deletério para o coração.

Outra proteína que o exercício modulou negativamente foi a Pgam1, que está relacionada com a via glicolítica; especificamente esta enzima catalisa a oitava etapa da glicólise, ou seja, catalisa a transferência interna de um grupo fosfato de C-3 para C-2, que resulta na conversão de 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato (191). Como na fase de insuficiência cardíaca há um predomínio da via glicolítica em relação aos ácidos graxos, a diminuição desta proteína pode indicar uma redução da glicólise miocárdica. Interessante destacar, que o exercício não alterou a beta-oxidação. A somatória destes achados, diminuição da glicose, diminuição dos corpos cetônicos e manutenção da diminuição beta-oxidação, poderia indicar que treinamento físico na condição de insuficiência cardíaca grave, não é uma terapêutica indicada. Entretanto, contra este raciocínio, é o resultado do ecocardiograma que mostrou, uma melhoria estrutural e funcional do ventrículo esquerdo.

5.5.2 Estresse oxidativo e inflamação

O exercício físico também diminuiu a expressão de proteínas relacionadas a processos oxidativos e inflamatórios. A Maa, como descrito anteriormente é uma potente indutora de ROS no coração, sua expressão é aumentada em modelos animais com diabetes mellitus e hipertensão arterial, e esta associada a disfunção mitocondrial no cenário de insuficiência cardíaca. Nossos resultados evidenciam que o treinamento físico, tenta contra regular os danos causados pelo aumento de ROS no coração, podendo ser um dos mecanismos de atenuação da disfunção cardíaca. Em concordância com os nossos resultados, trabalhos mostram diminuição do estresse oxidativo pelo exercício físico (192,193). O Kng1, como referido acima desempenha importante papel pró-inflamatório, pró-apoptótico e pró-oxidante (157). O treinamento físico diminuiu o nível desta proteína que estava elevada nos animais com EAo; em razão desse resultado podemos inferir que deve ter ocorrido uma redução nos processos inflamatório, apoptótico e oxidante, que poderiam estarem associados a melhoria estrutural e funcional do coração. Diferentes autores mostraram que o treinamento físico atenua o estresse oxidativo e processos inflamatórios em ratos com disfunção ventricular (11,194). Outra importante proteína que o exercício diminuiu sua expressão é a Hpx, proteína

plasmática com maior afinidade de ligação para o Heme. A molécula Heme medeia a disponibilidade do ferro e é essencial para inúmeros processos biológicos nos organismos aeróbicos. No sistema cardiovascular desempenha papel crucial na defesa antioxidante, transdução de sinal, transporte de oxigênio, estocagem de hemoglobina e transporte de elétrons mitocondriais (195). Estudos experimentais mostraram que elevação dos níveis da proteína Heme estão relacionados com aumento do estresse oxidativo e toxicidade em cardiomiócitos em condição de insuficiência cardíaca (196,197). Nossos achados mostram que o exercício diminuiu a Hpx que faz o transporte da molécula Heme, que de acordo com a literatura está aumentada em animais com hipertrofia patológica (196). Estes resultados reforçam nossa hipótese de que o treinamento diminui o estresse oxidativo e inflamação em animais com disfunção.

5.5.3 Arquitetura estrutural

Os achados proteômicos também demonstraram que o exercício diminui proteínas relacionadas a arquitetura estrutural do miocárdio, como a Pfn1 e Vim. Como descrito anteriormente a Pfn1 é uma proteína de ligação à actina, conservada evolutivamente, que exerce função na regulação da dinâmica do citoesqueleto, promovendo a polimerização da actina. Além disso, ela está ligada com disfunção endotelial e aumento da inflamação. De acordo com o nosso resultado de macroscopia *post-mortem* e ecocardiograma, o exercício foi efetivo em atenuar a remodelação do coração, corroborando com os achados moleculares pela proteômica. De fato, vários trabalhos evidenciam que o treinamento físico diminui a hipertrofia no coração de animais com disfunção cardíaca (194,198,199). A Vim, é uma proteína de filamento intermediário do tipo III e participa no suporte e ancoragem das organelas citosólicas (200), também foi diminuída pelo exercício físico. Não encontramos trabalhos abordando o comportamento da vimentina em animais com sobrecarga pressórica submetidos ao exercício físico.

A **Figura 17** mostra a visão geral dos efeitos do exercício sobre o proteoma miocárdico de animais com estenose aórtica supraavalar. O nome das proteínas codificadas pelos genes está detalhado na **Tabela Suplementar 1**.

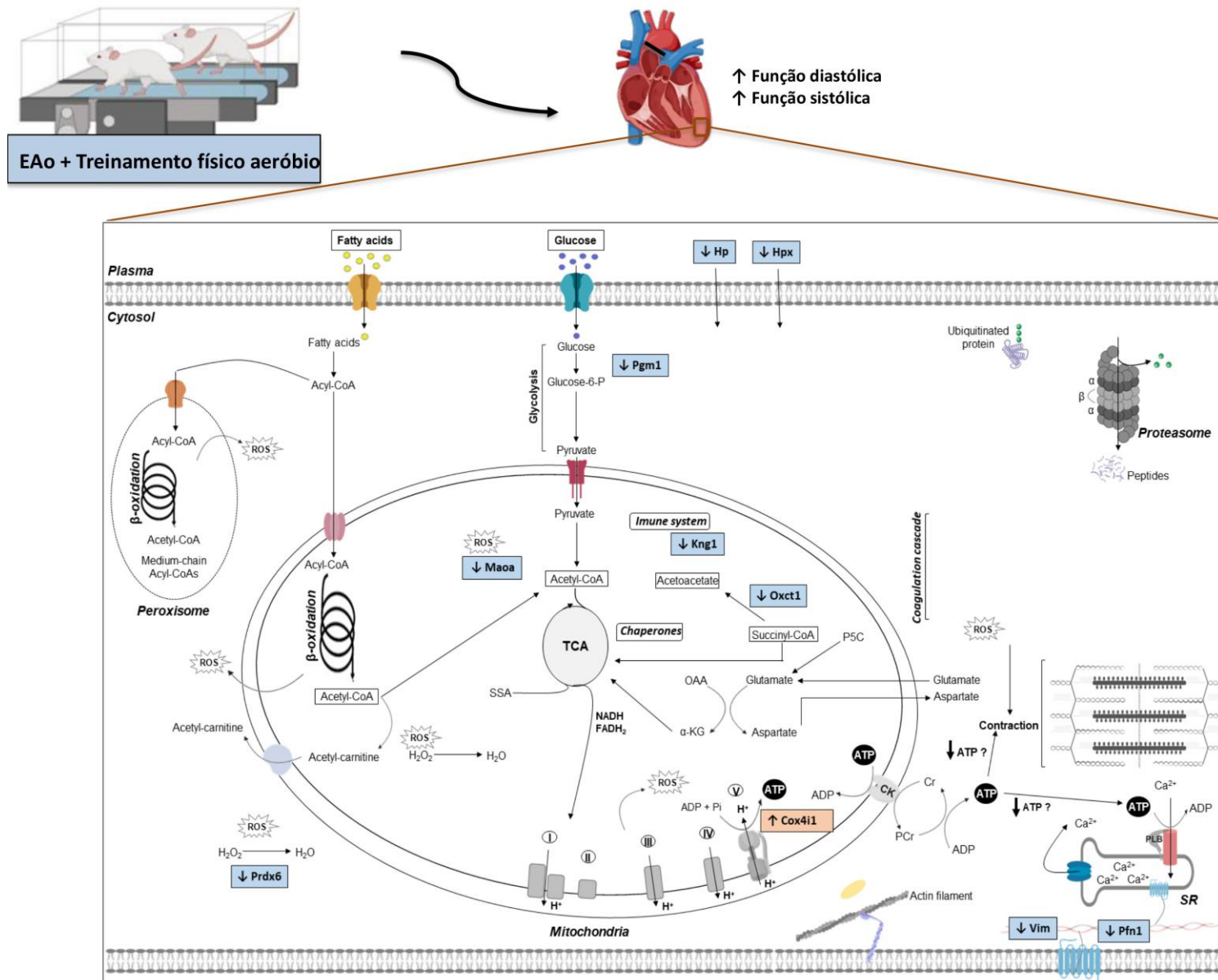


Figura 17. Visão geral dos efeitos do exercício sobre o proteoma miocárdico de ratos com EAo. As proteínas identificadas são mostradas de acordo com a alteração; cor vermelha para proteínas reguladas positivamente e cor azul para proteínas reguladas negativamente no miocárdio de ratos EAoTF vs EAo. ROS, espécies reativas de oxigênio; AGEs, produtos finais de glicação avançada; P5C, pirrolina-5-carboxilato; OAA, oxaloacetato; α -KG, α -cetoglutarato; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; SSA, succinato semialdeído; I, II, III, IV e V, complexos de fosforilação oxidativa mitocondrial (I-IV: complexos de cadeia respiratória; V: complexo de ATP sintase); CK, creatina quinase; Cr, creatina; PCr, fosfocreatina; SR, retículo sarcoplasmático. A descrição detalhada dos nomes das proteínas é mostrada na Tabela Suplementar 1.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise do proteoma revelou várias proteínas alteradas no miocárdio de ratos com disfunção cardíaca por estenose aórtica que estão envolvidas em processos biológicos importantes, principalmente no metabolismo energético lipídico e glicolítico. Os resultados mostraram que o treinamento físico aeróbio atenua o estresse oxidativo, inflamação e melhora o processo da biogênese mitocondrial. Essas mudanças podem estar associadas com a atenuação da disfunção cardíaca nos animais com EAo. Importante ressaltar que a hipótese deste trabalho foi confirmada em parte, pois acreditávamos que a estimulação das vias de sinalização da hipertrofia fisiológica pelo exercício contra regularia os estímulos hipertróficos patológicos, atenuando o processo de remodelação, o que não foi constatado neste trabalho. Entretanto, visualizamos que o treinamento interfere sobre outros geradores determinantes da hipertrofia patológica, atenuando o status redox, inflamação e melhorando o estado energético mitocondrial. Este estudo nos permitiu compreender melhor os possíveis mecanismos relacionados com a cardioproteção gerada pelo exercício físico, possibilitando o surgimento de novos alvos terapêuticos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(8):e254–743.
2. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569–82.
3. Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol*. 1997;30(9):1135–44.
4. Bregagnollo EA, Rodrigues MA, Montenegro MR, Curi PR, Tucci PJ. 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.
5. Rodrigues MA, Bregagnollo EA, Montenegro MR, Tucci PJ. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int J Cardiol*. 1992;35(2):253–7.
6. 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.
7. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, et al. Blockade of renin-angiotensin system attenuates cardiac remodeling in rats undergoing aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84(4):304–8.
8. 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.
9. Pagan LU, Gomes MJ, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Damatto FC, et al. Aerobic Exercise During Advance Stage of Uncontrolled Arterial Hypertension. *Front Physiol*. 2021;12:675778.
10. Casquel De Tomasi L, Salomé Campos DH, Grippa Sant’Ana P, Okoshi K, Padovani CR, Masahiro Murata G, et al. Pathological hypertrophy and cardiac dysfunction are linked to aberrant endogenous unsaturated fatty acid metabolism. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193553.
11. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Zanati SG, Damatto RL, et al. Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1235–45.
12. 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.
13. 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. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol*. 2018;25(4):373–9.
14. Silveira CFSMP, Campos DHS, Freire PP, Deus AF, Okoshi K, Padovani CR, et al. Importance of SERCA2a on early isolated diastolic dysfunction induced by supra-aortic stenosis in rats. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol*. 2017;50(5):e5742.
15. Mota GAF, de Souza SLB, da Silva VL, Gatto M, de Campos DHS, Sant’Ana PG, et al. Cardioprotection Generated by Aerobic Exercise Training is Not Related to the Proliferation of Cardiomyocytes and Angiotensin-(1-7) Levels in the Hearts of Rats with

- Supravalvar Aortic Stenosis. *Cell Physiol Biochem*. 2020;54(4):719–35.
16. de Souza SLB, Mota GAF, da Silva VL, Sant’Ana PG, Vileigas DF, de Campos DHS, et al. Adjustments in β -Adrenergic Signaling Contribute to the Amelioration of Cardiac Dysfunction by Exercise Training in Supravalvular Aortic Stenosis. *Cell Physiol Biochem*. 2020;54(4):665–81.
17. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):30–8.
18. Adamo L, Mann DL. Alterations in Ventricular Structure: Role of Left Ventricular Remodeling and Reverse Remodeling in Heart Failure. In: *Heart Failure: A Companion to Braunwald’s Heart Disease*. 3rd Editio. Saunders Company; 2016. 172–192 p.
19. Hasenfuss G, Mann DL. Pathophysiology of Heart Failure. In: *Braunwald’s Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 11th Editi. Saunders Company; 2019. 422–460 p.
20. 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;2017:1–16.
21. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo 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 U S A*. 2000;97(2):793–8.
22. 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.
23. Rinne P, Ruohonen ST, Ruohonen S SE. Pharmacological treatment with a melanocortin analogue protects against pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *FASEB J*. 2013;27:652–619.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA PC, Carvalho RF, Aguiar AF DPM. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(8):3887–905.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Turner MJ, Spina RJ, Kohrt WM, Ehsani AA. Effect of endurance exercise training on left ventricular size and remodeling in older adults with hypertension. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(4):245–51.
32. 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(1):103–9.
33. Capersen CJ, Powell KE CG. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and

- distinctions for health-related research. *Public Heal Rep.* 1985;100:126–31.
34. Egan B, Zierath JR. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab.* 2013;17(2):162–84.
35. Organization WH. Global Recommendations on Physical Activity for Health. 2010. 60 p.
36. Warburton DE, Nicol CW BS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;174(6):801–9.
37. Services USD of H and H. Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General. 1996.
38. Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther.* 2007;114(3):307–17.
39. Myers J. Exercise and Cardiovascular Health. *Circulation.* 2003;107(1):2e – 5.
40. Fernandes T, Soci UPR, Oliveira EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol.* 2011;44(9):836–47.
41. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;128(8):873–934.
42. Pedersen BK, Saltin B. 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.
43. Kiliszek M, Mackiewicz U, Maczewski M, Burzynska B. Molecular evidence that exercise training has beneficial effects on cardiac performance. *Ann Transl Med.* 2016;4(11):228.
44. Lin H, Sardana M, Zhang Y, Liu C, Trinquart L, Benjamin EJ, et al. Association of Habitual Physical Activity With Cardiovascular Disease Risk. *Circ Res.* 2020;127(10):1253–60.
45. Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(4):292–300.
46. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation.* 2013;128(16):1810–52.
47. Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T NC. Acute and chronic adaptations of exercise on the cardiovascular system. *Rev Pauli Educ Fís.* 2004;18:21-31.
48. Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, Patterson NL, McMullen JR. Understanding Key Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Protection to Mitigate Disease: Current Knowledge and Emerging Concepts. *Physiol Rev.* 2018;98(1):419–75.
49. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell.* 2014;159(4):738–49.
50. D’Souza A, Bucchi A, Johnsen AB, Logantha SJRJ, Monfredi O, Yanni J, et al. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat Commun.* 2014;5:1–12.
51. 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.
52. Weeks KL, Gao X, Du X-J, Boey EJH, Matsumoto A, Bernardo BC, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 α is a master regulator of exercise-induced cardioprotection and PI3K gene therapy rescues cardiac dysfunction. *Circ Heart Fail.* 2012;5(4):523–34.
53. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(7):387–407.
54. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, 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.
55. Silva VL 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. Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp; 2019.
56. SOUZA SL. Tese de Doutorado. Participação do metabolismo energético lipídico miocárdico na atenuação da disfunção cardíaca pelo treinamento físico precoce em ratos com estenose aórtica. Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP; 2021.
57. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837–46.
58. Mokou M, Lygirou V, Vlahou A, Mischak H. Proteomics in cardiovascular disease: recent progress and clinical implication and implementation. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(2):117–36.
59. Liddy KA, White MY, Cordwell SJ. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Med*. 2013;5(2):20.
60. Chugh S, Suen C, Gramolini A. Proteomics and mass spectrometry: what have we learned about the heart? *Curr Cardiol Rev*. 2010;6(2):124–33.
61. Suzuki T, Nagai R. Molecular markers for cardiovascular disease: cardiovascular biomarkers to proteomic discovery. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(6):295.
62. Van Eyk JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circ Res*. 2011;108(4):490–8.
63. Sun Z, Hamilton KL, Reardon KF. Phosphoproteomics and molecular cardiology: techniques, applications and challenges. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(3):354–68.
64. Lam L, Lind J, Semsarian C. Application of proteomics in cardiovascular medicine. *Int J Cardiol*. 2006;108(1):12–9.
65. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19(11):2031–42.
66. Beck HC, Jensen LO, Gils C, Ilondo AMM, Frydland M, Hassager C, et al. Proteomic Discovery and Validation of the Confounding Effect of Heparin Administration on the Analysis of Candidate Cardiovascular Biomarkers. *Clin Chem*. 2018;64(10):1–11.
67. Xia Y, Hong H, Ye L, Wang Y, Chen H, Liu J. Label-free quantitative proteomic analysis of right ventricular remodeling in infant Tetralogy of Fallot patients. *J Proteomics*. 2013;84:78–91.
68. Gu HJ, Gao C Bin, Gong JL, Li XJ, Sun B, Li XN. Comparative proteomic analysis in left ventricular remodeling following myocardial infarction in rats. *Biomed Environ Sci*. 2012;25(1):117–23.
69. Mitra A, Basak T, Ahmad S, Datta K, Datta R, Sengupta S, et al. Comparative Proteome Profiling during Cardiac Hypertrophy and Myocardial Infarction Reveals Altered Glucose Oxidation by Differential Activation of Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Subunit β . *J Mol Biol*. 2015;427(11):2104–20.
70. Manakov D, Ujcikova H, Pravenec M, Novotny J. Alterations in the cardiac proteome of the spontaneously hypertensive rat induced by transgenic expression of CD36. *J Proteomics*. 2016;145:177–86.
71. Meng C, Jin X, Xia L, Shen S-M, Wang X-L, Cai J, et al. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res*. 2009;8(5):2463–75.
72. Ma J, Banerjee P, Whelan SA, Liu T, Wei A-C, Ramirez-Correa G, et al. Comparative Proteomics Reveals Dysregulated Mitochondrial O-GlcNAcylation in Diabetic Hearts. *J Proteome Res*. 2016;15(7):2254–64.
73. Karthik D, Vijayakumar R, Pazhanichamy K, Ravikumar S. A proteomics approach to identify the differential protein level in cardiac muscle of diabetic rat. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(2):285–93.
74. G N, BP C, I. I. Red raspberry decreases heart biomarkers of cardiac remodeling associated

- with oxidative and inflammatory stress in obese diabetic db/db mice. *Food Funct.* 2016;7(12):4944–55.
75. Vileigas DF, Harman VM, Freire PP, Marciano CLC, Sant'Ana PG, de Souza SLB, et al. Landscape of heart proteome changes in a diet-induced obesity model. *Sci Rep.* 2019;9(1):18050.
76. Li L, Zhang H, Wang W, Hong Y, Wang J, Zhang S, et al. Comparative proteomics reveals abnormal binding of ATGL and dysferlin on lipid droplets from pressure overload-induced dysfunctional rat hearts. *Sci Rep.* 2016;6:19782.
77. Guan D, Zhao Y, Zhang Y, Tang D, Wu Q. Proteomics Analysis Revealed an Altered Left Ventricle Protein Profile in a Mouse Model of Transverse Aortic Constriction. *Protein Pept Lett.* 2016;23(2):125–31.
78. Hollander JM, Baseler WA, Dabkowski ER. Proteomic remodeling of mitochondria in heart failure. *Congest Heart Fail.* 2011;17(6):262–8.
79. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010;85(2):376–84.
80. Kararigas G, Fliegner D, Forler S, Klein O, Schubert C, Gustafsson J-Å, et al. Comparative proteomic analysis reveals sex and estrogen receptor β effects in the pressure overloaded heart. *J Proteome Res.* 2014;13(12):5829–36.
81. Chang Y-W, Chang Y-T, Wang Q, Lin JJ-C, Chen Y-J, Chen C-C. Quantitative phosphoproteomic study of pressure-overloaded mouse heart reveals dynamin-related protein 1 as a modulator of cardiac hypertrophy. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(11):3094–107.
82. Dai D-F, Hsieh EJ, Liu Y, Chen T, Beyer RP, Chin MT, et al. Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress. *Cardiovasc Res.* 2012;93(1):79–88.
83. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics.* 2009;9(1):106–15.
84. Ferreira R, Vitorino R, Padrão AI, Espadas G, Mancuso FM, Moreira-Gonçalves D, et al. Lifelong exercise training modulates cardiac mitochondrial phosphoproteome in rats. *J Proteome Res.* 2014;13(4):2045–55.
85. Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics.* 2006;6(10):3154–69.
86. Kavazis AN, Alvarez S, Talbert E, Lee Y, Powers SK. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(1):144–52.
87. Dantas PS, Sakata MM, Perez JD, Watanabe RLH, Bizerra FC, Neves VJ das, et al. Unraveling the role of high-intensity resistance training on left ventricle proteome: Is there a shift towards maladaptation? *Life Sci.* 2016;152:156–64.
88. Petriz BA, Cunha VN, Vileth GRC, Mehta A, Rocha LAO, Silva ON, et al. Effects of acute exercise over heart proteome from monogenic obese (ob/ob) mice. *J Cell Physiol.* 2013;228(4):824–34.
89. Bansal A, Dai Q, Chiao YA, Hakala KW, Zhang JQ, Weintraub ST, et al. Proteomic analysis reveals late exercise effects on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Proteomics.* 2010;73(10):2041–9.
90. Petriz BA, Franco OL. Effects of Hypertension and Exercise on Cardiac Proteome Remodelling. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–14.
91. Petriz BA, Almeida JA, Gomes CPC, Pereira RW, Murad AM, Franco OL. NanoUPLC/MS(E) proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training. *J Proteomics.* 2015;113:351–65.

92. Cox EJ, Marsh SA. Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:101.
93. 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;6:38.
94. Mendes OC, Sugizaki MM, Campos DS, Damatto RL, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, et al. Exercise Tolerance in Rats with Aortic Stenosis and Ventricular Diastolic and/or Systolic Dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1):44–51.
95. Svedahl K, MacIntosh BR. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. *Can J Appl Physiol*. 2003;28(2):299–323.
96. Freckmann G, Schmid C, Pleus S, Baumstark A, Link M, Stolberg E, et al. System accuracy evaluation of systems for point-of-care testing of blood glucose: a comparison of a patient-use system with six professional-use systems. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(7):1079–86.
97. 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.
98. 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;279(4):H1534-9.
99. Bregagnollo, EA; Okoshi, K; Bregagnollo, IF; Padovani, CR; Okoshi, MP; Cicogna A. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84(3):225–32.
100. 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;15(2):109–17.
101. 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.
102. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19–50.
103. Barallobre-Barreiro J, Chung Y-L, Mayr M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013;66(8):657–61.
104. Yi Z, Bowen BP, Hwang H, Jenkinson CP, Coletta DK, Lefort N, et al. Global relationship between the proteome and transcriptome of human skeletal muscle. *J Proteome Res*. 2008;7(8):3230–41.
105. Brewis IA, Brennan P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2010;80:1–44.
106. Latosinska A, Vougas K, Makridakis M, Klein J, Mullen W, Abbas M, et al. Comparative Analysis of Label-Free and 8-Plex iTRAQ Approach for Quantitative Tissue Proteomic Analysis. *PLoS One*. 2015;10(9):1–25.
107. Huang Q, Xi G, Alamdar A, Zhang J, Shen H. Comparative proteomic analysis reveals heart toxicity induced by chronic arsenic exposure in rats. *Environ Pollut*. 2017;229:210–8.
108. Yates JR. The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *J Am Chem Soc*. 2013;135(5):1629–40.
109. Ouistorff B, Pedersen E. A new device for the freeze-clamping of tissue samples. *Anal Biochem*. 1976;73(1):236–9.

110. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:5–8.
111. Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(suppl_2):W316–22.
112. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607–13.
113. Gross EM, Maddipati SS, Snyder SM. A review of electrogenerated chemiluminescent biosensors for assays in biological matrices. *Bioanalysis.* 2016;8(19):2071–89.
114. Johnson RA WD. Applied multivariate statistical analysis. 6 edition. Prentice-Hall, editor. New Jersey; 2007. 773 p.
115. Goodman LA. On Simultaneous Confidence Intervals for Multinomial Proportions. *Technometrics;* 1965. 247–254 p.
116. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6(7):e21800.
117. Pelliccia A, Sharma S, Gati S, Bäck M, Börjesson M, Caselli S, et al. 2020 ESC Guidelines on sports cardiology and exercise in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2021;42(1):17–96.
118. Suppan M, Barcelos G, Luise S, Diaper J, Frei A, Ellenberger C, et al. Improved Exercise Tolerance, Oxygen Delivery, and Oxygen Utilization After Transcatheter Aortic Valve Implantation for Severe Aortic Stenosis. *CJC open.* 2020;2(6):490–6.
119. Pazzianotto-Forti EM, Moreno MA, Plater E, Baruki SBS, Rasera-Junior I, Reid WD. Impact of Physical Training Programs on Physical Fitness in People With Class II and III Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Phys Ther.* 2020;100(6):963–78.
120. Sjölin I, Bäck M, Nilsson L, Schiopu A, Leosdottir M. Association between attending exercise-based cardiac rehabilitation and cardiovascular risk factors at one-year post myocardial infarction. *PLoS One.* 2020;15(5):e0232772.
121. Saco-Ledo G, Valenzuela PL, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Lucia A. Exercise Reduces Ambulatory Blood Pressure in Patients With Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(24):e018487.
122. Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab.* 2018;27(4):757–85.
123. Kadkhodayan A, Coggan AR, Peterson LR. A “PET” area of interest: myocardial metabolism in human systolic heart failure. *Heart Fail Rev.* 2013;18(5):567–74.
124. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113(5):603–16.
125. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):457–70.
126. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest.* 2018;128(9):3716–26.
127. Schugar RC, Moll AR, André d’Avignon D, Weinheimer CJ, Kovacs A, Crawford PA. Cardiomyocyte-specific deficiency of ketone body metabolism promotes accelerated pathological remodeling. *Mol Metab.* 2014;3(7):754–69.
128. Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, et al. The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel. *Circulation.* 2016;133(8):698–705.
129. Byrne NJ, Soni S, Takahara S, Ferdaoussi M, Al Batran R, Darwesh AM, et al. Chronically Elevating Circulating Ketones Can Reduce Cardiac Inflammation and Blunt the Development of Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2020;13(6):e006573.
130. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(4):425–35.

131. Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27(5):494–510.
132. Fisher AB. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:68–83.
133. Tsoporis JN, Drosatos I-A, Gupta S, Amatullah H, Izhar S, Dos Santos CC, et al. Cytoprotective Mechanisms of DJ-1: Implications in Cardiac Pathophysiology. *Molecules.* 2021;26(13).
134. Billia F, Hauck L, Grothe D, Konecny F, Rao V, Kim RH, et al. Parkinson-susceptibility gene DJ-1/PARK7 protects the murine heart from oxidative damage in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):6085–90.
135. Dongworth RK, Mukherjee UA, Hall AR, Astin R, Ong S-B, Yao Z, et al. DJ-1 protects against cell death following acute cardiac ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1082.
136. Fan J, Ren H, Jia N, Fei E, Zhou T, Jiang P, et al. DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2008;283(7):4022–30.
137. van der Brug MP, Blackinton J, Chandran J, Hao L-Y, Lal A, Mazan-Mamczarz K, et al. RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10244–9.
138. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, et al. DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* 2003;24(3):159–60.
139. Lu H-S, Chen H-P, Wang S, Yu H-H, Huang X-S, Huang Q-R, et al. Hypoxic preconditioning up-regulates DJ-1 protein expression in rat heart-derived H9c2 cells through the activation of extracellular-regulated kinase 1/2 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2012;370(1–2):231–40.
140. Yan Y-F, Chen H-P, Huang X-S, Qiu L-Y, Liao Z-P, Huang Q-R. DJ-1 Mediates the Delayed Cardioprotection of Hypoxic Preconditioning Through Activation of Nrf2 and Subsequent Upregulation of Antioxidative Enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;66(2):148–58.
141. Xin L-H, Liu W-J, Song T, Zhang L. Overexpression of DJ-1 expression protects cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(23):11988.
142. Shimizu Y, Nicholson CK, Polavarapu R, Pantner Y, Husain A, Naqvi N, et al. Role of DJ-1 in Modulating Glycative Stress in Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(4):e014691.
143. Lee J, Song J, Kwon K, Jang S, Kim C, Baek K, et al. Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Hum Mol Genet.* 2012;21(14):3215–25.
144. Sousa Silva M, Gomes RA, Ferreira AEN, Ponces Freire A, Cordeiro C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem J.* 2013;453(1):1–15.
145. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(4):H1823–32.
146. Liu Y, Qu Y, Wang R, Ma Y, Xia C, Gao C, et al. The alternative crosstalk between RAGE and nitrative thioredoxin inactivation during diabetic myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(7):E841–52.
147. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114(6):597–605.
148. Koyama Y, Takeishi Y, Arimoto T, Niizeki T, Shishido T, Takahashi H, et al. High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure. *J Card Fail.* 2007;13(3):199–206.
149. Wang LJ, Lu L, Zhang FR, Chen QJ, De Caterina R, Shen WF. Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in

- diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(4):440–9.
150. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181–90.
151. Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(12):1315–47.
152. Perrucci GL, Gowran A, Zanobini M, Capogrossi MC, Pompilio G, Nigro P. Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2015;106(3):353–64.
153. Galat A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*. 1993;216(3):689–707.
154. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*. 2013;4:e888.
155. Satoh K, Nigro P, Zeidan A, Soe NN, Jaffré F, Oikawa M, et al. Cyclophilin A promotes cardiac hypertrophy in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):1116–23.
156. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, et al. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med*. 2009;15(6):649–56.
157. Xu J, Fang J, Cheng Z, Fan L, Hu W, Zhou F, et al. Overexpression of the Kininogen-1 inhibits proliferation and induces apoptosis of glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):180.
158. Cheng X, Liu D, Song H, Tian X, Yan C, Han Y. Overexpression of Kininogen-1 aggravates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in DOX-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;550:142–50.
159. Alvarado G, Tóth A, Csősz É, Kalló G, Dankó K, Csernátóy Z, et al. Heme-Induced Oxidation of Cysteine Groups of Myofilament Proteins Leads to Contractile Dysfunction of Permeabilized Human Skeletal Muscle Fibres. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
160. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377–90.
161. Sequeira V, Nijenkamp LLAM, Regan JA, van der Velden J. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):700–22.
162. Pernier J, Shekhar S, Jegou A, Guichard B, Carlier M-F. Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility. *Dev Cell*. 2016;36(2):201–14.
163. Li Z, Zhong Q, Yang T, Xie X, Chen M. The role of profilin-1 in endothelial cell injury induced by advanced glycation end products (AGEs). *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:141.
164. Jin H-Y, Song B, Oudit GY, Davidge ST, Yu H-M, Jiang Y-Y, et al. ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production. *PLoS One*. 2012;7(6):e38502.
165. Cheng J-F, Ni G-H, Chen M-F, Li Y-J, Wang Y-J, Wang C-L, et al. Involvement of profilin-1 in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Vascul Pharmacol*. 55(1–3):34–41.
166. Sheikh F, Raskin A, Chu P-H, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, et al. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3870–80.
167. Chu PH, Ruiz-Lozano P, Zhou Q, Cai C, Chen J. Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev*. 2000;95(1–2):259–65.
168. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):273–8.

169. Zhao S, Gao H, Ji X, Wang Y, Liu X, You B, et al. Effect of ouabain on myocardial ultrastructure and cytoskeleton during the development of ventricular hypertrophy. *Heart Vessels*. 2013;28(1):101–13.
170. González A, López B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Díez J, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2002;39(1):75–80.
171. Garg S, Narula J, Chandrashekar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(1):73–9.
172. Reutelingsperger CP, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(6):527–32.
173. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*. 1998;5(7):551–62.
174. Maloberti A, Meani P, Vallerio P, Varrenti M, Casadei F, Musca F, et al. Annexin A5 in treated hypertensive patients and its association with target organ damage. *J Hypertens*. 2017;35(1):154–61.
175. de Jong RCM, Pluijmert NJ, de Vries MR, Pettersson K, Atsma DE, Jukema JW, et al. Annexin A5 reduces infarct size and improves cardiac function after myocardial ischemia-reperfusion injury by suppression of the cardiac inflammatory response. *Sci Rep*. 2018;8(1):6753.
176. Camors E, Monceau V, Charlemagne D. Annexins and Ca²⁺ handling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2005;65(4):793–802.
177. Benevolensky D, Belikova Y, Mohammadzadeh R, Trouvé P, Marotte F, Russo-Marie F, et al. Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Lab Invest*. 2000;80(2):123–33.
178. Ravassa S, González A, López B, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, et al. Upregulation of myocardial Annexin A5 in hypertensive heart disease: association with systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2007;28(22):2785–91.
179. Anderson EJ, Efrid JT, Davies SW, O'Neal WT, Darden TM, Thayne KA, et al. Monoamine oxidase is a major determinant of redox balance in human atrial myocardium and is associated with postoperative atrial fibrillation. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000713.
180. Kaludercic N, Mialet-Perez J, Paolocci N, Parini A, Di Lisa F. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:34–42.
181. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, Lairez O, Ordener C, Duparc T, et al. p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(1):5–18.
182. Manni ME, Zazzeri M, Musilli C, Bigagli E, Lodovici M, Raimondi L. Exposure of cardiomyocytes to angiotensin II induces over-activation of monoamine oxidase type A: implications in heart failure. *Eur J Pharmacol*. 2013;718(1–3):271–6.
183. Santin Y, Sicard P, Vigneron F, Guilbeau-Frugier C, Dutaur M, Lairez O, et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase-A Impairs Transcription Factor EB Activation and Autophagosome Clearance, Leading to Cardiomyocyte Necrosis and Heart Failure. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(1):10–27.
184. Morimoto RI. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev*. 2008;22(11):1427–38.
185. Ranek MJ, Stachowski MJ, Kirk JA, Willis MS. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1738).
186. Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, et al. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol*. 2012;113(3):498–506.
187. Lee YI, Cho JY, Kim MH, Kim KB, Lee DJ, Lee KS. Effects of exercise training on pathological

- cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *Eur J Appl Physiol.* 2006;97(2):216–24.
188. Cheng S-M, Ho T-J, Yang A-L, Chen I-J, Kao C-L, Wu F-N, et al. Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol.* 2013;167(2):478–85.
189. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:39–56.
190. Fukuda R, Zhang H, Kim J, Shimoda L, Dang C V, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007;129(1):111–22.
191. Tran DH, Wang Z V. Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(12):e012673.
192. Cardoso AM, Martins CC, Fiorin F da S, Schmatz R, Abdalla FH, Gutierrez J, et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct.* 2013;31(2):136–51.
193. Bozi LHM, Jannig PR, Rolim N, Voltarelli VA, Dourado PMM, Wisløff U, et al. Aerobic exercise training rescues cardiac protein quality control and blunts endoplasmic reticulum stress in heart failure rats. *J Cell Mol Med.* 2016;20(11):2208–12.
194. Liao Z, Li D, Chen Y, Li Y, Huang R, Zhu K, et al. Early moderate exercise benefits myocardial infarction healing via improvement of inflammation and ventricular remodelling in rats. *J Cell Mol Med.* 2019;23(12):8328–42.
195. Yanatori I, Richardson DR, Toyokuni S, Kishi F. How iron is handled in the course of heme catabolism: Integration of heme oxygenase with intracellular iron transport mechanisms mediated by poly (rC)-binding protein-2. *Arch Biochem Biophys.* 2019;672:108071.
196. Khechaduri A, Bayeva M, Chang H-C, Ardehali H. Heme levels are increased in human failing hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(18):1884–93.
197. Bhoite-Solomon V, Kessler-Icekson G, Shaklai N. Myocyte injury by hemin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993;29A(8):636–42.
198. Liao P-H, Hsieh DJ-Y, Kuo C-H, Day C-H, Shen C-Y, Lai C-H, et al. Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget.* 2015;6(34):35383–94.
199. Miyachi M, Yazawa H, Furukawa M, Tsuboi K, Ohtake M, Nishizawa T, et al. Exercise training alters left ventricular geometry and attenuates heart failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2009;53(4):701–7.
200. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol cell.* 1990;68(2):139–46.

Material Supplementar

Tabela suplementar 1. Lista de proteínas significativamente alteradas no ventrículo esquerdo dos quatro grupos de ratos estudados identificadas por nLC-MS / MS livre de marcação.

Acesso	Gene	Proteínas	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Fold change
B2GV06	Oxct1	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial	16	12	108,7203	0	1,8468338
P14668	Anxa5	Annexin A5	8	5	54,0354	0	1,91954424
P08503	Acadm	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	7	4	40,1395	0	1,54664578
P38652	Pgm1	Phosphoglucomutase-1	6	3	31,242	0	2,0076146
Q60587	Hadhb	Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial	6	3	34,7132	0	2,24596264
P97541	Hspb6	Heat shock protein beta-6	4	2	30,8315	0	2,23344065
P25113	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	8	2	49,6059	0	2,28239556
Q9WUH4	Fhl1	Four and a half LIM domains 1	3	2	17,6263	0	4,01104148
P42930	Hspb1	Heat shock 27 kDa protein	9	2	62,0171	0	1,76248095
Q9WVJ6	Tgm2	Tissue-type transglutaminase	7	5	40,3391	3,3307E-16	25,7243253
P21396	Maoa	Amine oxidase	10	7	61,2467	1,41E-14	2,49629489
P08934	Kng1	Kininogen-1	8	4	60,1788	5,7176E-14	1,66154325
Q05962	Slc25a4	ADP/ATP translocase 1	16	3	118,226	1,1846E-13	2,1354716
P23928	Cryab	Alpha-crystallin B chain	9	5	66,4839	1,7664E-13	1,78438145
Q9WVK7	Hadh	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase_ mitochondrial	14	7	80,0869	2,377E-13	1,93868313
P17764	Acat1	Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	8	4	45,705	4,2486E-12	1,43219504
P20059	Hpx	Hemopexin	16	7	97,5956	9,4136E-12	1,68302402
Q8VHF5	Cs	Citrate synthase	16	12	106,1257	1,6847E-11	1,35831874
P31000	Vim	Vimentin	2	2	10,414	2,0462E-11	4,4765551
O35244	Prdx6	Peroxiredoxin-6	6	5	41,9563	3,3731E-10	2,21996915
P10860	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	2	2	10,3705	1,9911E-09	1,48907262
P62963	Pfn1	Profilin-1	4	2	31,9036	3,7168E-09	2,06801362
P60711	Actb	Actin_ cytoplasmic 1	16	4	90,3406	3,967E-09	1,56759866
Q80X08	Washc2c	WASH complex subunit 2C	3	2	14,6616	8,1583E-09	1,62467985
P09605	Ckmt2	Creatine kinase S-type_ mitochondrial	17	3	130,6163	3,4397E-08	4,76313255
P12928	Pklr	Pyruvate kinase	9	6	53,368	3,627E-08	1,51839638

Q06647	Atp5po	ATP synthase subunit O_ mitochondrial	9	3	75,0336	6,221E-08	1,59080685
O88767	Park7	Maillard deglycase	6	2	40,2108	3,4109E-07	1,63950639
Q64428	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	7	5	42,6908	1,2863E-06	2,10042909
P11884	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial	18	12	126,8921	1,7567E-06	1,36655255
P48500	Tpi1	Triosephosphate isomerase	15	4	145,1201	4,6312E-06	1,39552263
P07483	Fabp3	Fatty acid-binding protein_ heart	15	10	106,7126	4,7241E-06	1,46899052
P04642	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain	23	9	176,1558	6,3395E-06	1,35920312
P15651	Acads	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase_ short chain_ isoform CRA_a	13	7	92,3665	9,8011E-06	1,7052484
P07335	Ckb	Creatine kinase B-type	8	4	53,5509	1,0087E-05	1,55683913
P02091	Hbb	Globin a4	12	2	102,0245	1,7409E-05	1,54471342
P19511	Atp5pb	ATP synthase F(0) complex subunit B1_ mitochondrial	13	6	82,7801	1,7928E-05	1,44309635
P13437	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase_ mitochondrial	16	2	98,3943	2,1562E-05	1,53453231
Q68FU3	Etfb	Electron transfer flavoprotein subunit beta	14	11	103,439	4,3603E-05	1,746159
P00564	Ckb	Creatine kinase	21	11	175,3452	8,6259E-05	1,48194276
P35704	Prdx2	Peroxiredoxin-2	6	4	39,4749	8,8954E-05	1,18890804
Q920L2	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial	11	5	66,9386	0,0001247	1,26843316
Q6UPE1	Etfdh	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	9	6	52,159	0,00013281	1,32965991
P26284	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	10	4	66,2299	0,00014066	1,70819197
Q6P6V0	Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase	8	4	54,075	0,00014286	2,59714979
P10888	Cox4i1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial	10	4	58,038	0,00017771	1,36133458
P35171	Cox7a2	Cytochrome c oxidase subunit 7A2_ mitochondrial	2	2	12,7214	0,00054313	1,41850943
Q6TQE1	Zc3h13	Zinc finger CCCH type-containing 13	31	11	151,1769	0,00113087	1,26059113
Q1JU68	Eif3a	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	7	2	30,3207	0,00127554	1,33838549
P18163	Acs1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	4	3	21,2283	0,00130396	1,30557109
P85834	Tufm	Elongation factor Tu_ mitochondrial	14	4	87,0189	0,00228071	1,26001675
Q3B7T9	Rab11fip1	Rab11 family-interacting protein 1	9	3	46,3672	0,0023289	4,59046005
P20788	Uqcrrf1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial	8	7	60,9855	0,00277727	1,37672197
P06866	Hp	Haptoglobin	8	3	42,0109	0,01514054	1,39036009
P10111	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4	2	19,6262	0,01839108	1,48152377

Q6P6R2	Dld	Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial	7	5	43,0429	0,0335166	1,3525604
P97700	Slc25a11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	4	2	21,2324	0,03891878	1,36454258

Tabela suplementar 2. Lista de proteínas diferencialmente expressas no ventrículo esquerdo dos quatro grupos de ratos estudados.

<i>EAoTF vs EAo Upregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial	5126 ± 1078	5720 ± 1430	4003 ± 474 p=0,07	5502 ± 1747#
<i>EAoTF vs EAo Downregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial	1549 ± 274	1692 ± 396	2862 ± 335*	2418 ± 404#&
Phosphoglycerate mutase 1	391 ± 73	394 ± 103	894 ± 243*	685 ± 101#&
Amine oxidase	681 ± 165	696 ± 358	1700 ± 445*	1261 ± 367#&
Kininogen-1	870 ± 76	804 ± 79	1336 ± 364*	973 ± 177#
Hemopexin	1149 ± 191	1054 ± 226	1774 ± 515*	1350 ± 346#
Vimentin	59 ± 30	70 ± 34	263 ± 131*	139 ± 79#
Peroxiredoxin-6	193 ± 40	229 ± 78	476 ± 169*	324 ± 121#
Profilin-1	435 ± 111	403 ± 47	901 ± 244*	705 ± 159#&
Haptoglobin	416 ± 143	370 ± 99	440 ± 160	316 ± 79#

<i>Eao vs Sham Upregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial	1549 ± 274	1692 ± 396	2862 ± 335*	2418 ± 404#&
Annexin A5	399 ± 67	493 ± 122	766 ± 166*	744 ± 132&
Phosphoglucomutase-1	301 ± 67	404 ± 88§	610 ± 97*	573 ± 101&
Heat shock protein beta-6	1036 ± 321	1247 ± 434	1951 ± 531*	2315 ± 741&
Phosphoglycerate mutase 1	391 ± 73	394 ± 103	894 ± 243*	685 ± 101#&
Four and a half LIM domains 1	153 ± 59	145 ± 28	582 ± 126*	505 ± 209&
Heat shock 27 kDa protein	1141 ± 158	1144 ± 295	1828 ± 381*	2010 ± 412&
Tissue-type transglutaminase	33 ± 31	12 ± 14	274 ± 230*	201 ± 160&
Amine oxidase	681 ± 165	696 ± 358	1700 ± 445*	1261 ± 367#&
Kininogen-1	870 ± 76	804 ± 79	1336 ± 364*	973 ± 177#
Alpha-crystallin B chain	1948 ± 357	2359 ± 501	3475 ± 1077*	3437 ± 782&
Hemopexin	1149 ± 191	1054 ± 226	1774 ± 515*	1350 ± 346#
Vimentin	59 ± 30	70 ± 34	263 ± 131*	139 ± 79#
Peroxiredoxin-6	193 ± 40	229 ± 78	476 ± 169*	324 ± 121#
Profilin-1	435 ± 111	403 ± 47	901 ± 244*	705 ± 159#&
Pyruvate kinase expressao	1217 ± 336	1318 ± 486	1788 ± 309*	1848 ± 433&
Maillard deglycase	391 ± 111	438 ± 175	641 ± 124*	548 ± 112
Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial	3521 ± 886	3447 ± 1061	4711 ± 782*	3854 ± 793

Triosephosphate isomerase	3592 ± 1199	3959 ± 1560	5013 ± 1029*	4816 ± 1256
L-lactate dehydrogenase A chain atividade	3732 ± 584	3962 ± 1555	5073 ± 1054*	4658 ± 890
Creatine kinase B-type	3228 ± 1131	2763 ± 634	4302 ± 958*	4051 ± 1749&
Peroxiredoxin-2	1124 ± 123	1134 ± 249	1337 ± 178*	1293 ± 187
Glucose-6-phosphate isomerase	76 (59; 698)	226 (42; 528)	662 (501; 1235)*	322 (94; 691)
Zinc finger CCCH type-containing 13	2791 ± 467	3019 ± 669	3518 ± 609*	3163 ± 639
Elongation factor Tu_ mitochondrial	259 ± 61	261 ± 60	327 ± 35*	290 ± 76
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	205 ± 47	194 ± 57	288 ± 86*	264 ± 128
<i>EAO vs Sham Downregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial - mcad	476 ± 66	492 ± 83	318 ± 61*	344 ± 53&
Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial	1158 ± 334	1115 ± 378	515 ± 110*	715 ± 251&
ADP/ATP translocase 1	3994 ± 1490	3611 ± 1145	1702 ± 302*	2339 ± 1187&
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase_ mitochondrial - bhad	3781 (3530; 4822)	3811 (3010; 4735)	2243 (2054; 2449)*	2327 (1844; 3269)
Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	432 ± 57	383 ± 38§	321 ± 43*	301 ± 55&
Citrate synthase	2536 ± 289	2616 ± 521	1926 ± 165*	2132 ± 271&
Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	571 ± 137	595 ± 189	400 ± 45*	441 ± 51&
Actin_ cytoplasmic 1	482 ± 128	436 ± 86	351 ± 51*	307 ± 52,3&
WASH complex subunit 2C	563 ± 86	544 ± 139	346 ± 71*	393 ± 43&
Creatine kinase S-type_ mitochondrial	357 ± 172	267 ± 100	75 ± 40*	92 ± 44&

ATP synthase subunit O_ mitochondrial	6507 ± 2121	6560 ± 1901	4124 ± 891*	5210 ± 2061
Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	1205 ± 346	1089 ± 258	573 ± 146*	706 ± 302&
Fatty acid-binding protein_ heart	7848 ± 1757	7015 ± 2624	5342 ± 1130*	6413 ± 1417
Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase_ short chain_ isoform CRA_a	2207 ± 616	2323 ± 1028	1512 ± 315*	1773 ± 970
Globin a4	1674 ± 645	1486 ± 456	1084 ± 357*	1152 ± 337
ATP synthase F(0) complex subunit B1_ mitochondrial	1597 ± 546	1371 ± 290	1126 ± 247*	1107 ± 299
Electron transfer flavoprotein subunit beta	5134 ± 1173	5234 ± 2184	3518 ± 711*	4459 ± 1264
Creatine kinase	15556 ± 4161	16836 ± 6825	11360 ± 1572*	13844 ± 4327
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial	1077 ± 204	1027 ± 190	849 ± 172*	912 ± 136
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	694 ± 121	663 ± 138	521 ± 114*	547 ± 125&
Cytochrome c oxidase subunit 7A2_ mitochondrial	1956 ± 648	1911 ± 684	1312 ± 147*	1541 ± 534
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1577 ± 238	1487 ± 422	1209 ± 93*	1151 ± 106&
Rab11 family-interacting protein 1	1364 ± 1193	1551 ± 1414	165 ± 68*	913 ± 954
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial	798 ± 210	688 ± 125	580 ± 192*	582 ± 235
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10_ mitochondrial	1543 ± 572	1305 ± 213	1185 ± 331*	1042 ± 257
Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial	1016 ± 394	985 ± 298	680 ± 92*	822 ± 266

<i>EAoTF vs ShamTF Upregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial	1549 ± 274	1692 ± 396	2862 ± 335*	2418 ± 404#&
Annexin A5	399 ± 67	493 ± 122	766 ± 166*	744 ± 132&
Heat shock protein beta-6	1036 ± 321	1247 ± 434	1951 ± 531*	2315 ± 741&
Phosphoglycerate mutase 1	391 ± 73	394 ± 103	894 ± 243*	685 ± 101#&
Four and a half LIM domains 1	153 ± 59	145 ± 28	582 ± 126*	505 ± 209&
Heat shock 27 kDa protein	1141 ± 158	1144 ± 295	1828 ± 381*	2010 ± 412&
Tissue-type transglutaminase	33 ± 31	12 ± 14	274 ± 230*	201 ± 160&
Amine oxidase	681 ± 165	696 ± 358	1700 ± 445*	1261 ± 367#&
Alpha-crystallin B chain	1948 ± 357	2359 ± 501	3475 ± 1077*	3437 ± 782&
Profilin-1	435 ± 111	403 ± 47	901 ± 244*	705 ± 159#&
Pyruvate kinase	1217 ± 336	1318 ± 486	1788 ± 309*	1848 ± 433&
Creatine kinase B-type	3228 ± 1131	2763 ± 634	4302 ± 958*	4051 ± 1749&
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	494 ± 187	447 ± 169	539 ± 96	598 ± 188&
<i>EAoTF vs ShamTF Downregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	476 ± 66	492 ± 83	318 ± 61*	344 ± 53&
Phosphoglucosmutase-1	301 ± 67	404 ± 88§	610 ± 97*	573 ± 101&
Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial	1158 ± 334	1115 ± 378	515 ± 110*	715 ± 251&

ADP/ATP translocase 1	3994 ± 1490	3611 ± 1145	1702 ± 302*	2339 ± 1187&
Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	432 ± 57	383 ± 38§	321 ± 43*	301 ± 55&
Citrate synthase	2536 ± 289	2616 ± 521	1926 ± 165*	2132 ± 271&
Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	571 ± 137	595 ± 189	400 ± 45*	441 ± 51&
Actin_ cytoplasmic 1	482 ± 128	436 ± 86	351 ± 51*	307 ± 52,3&
WASH complex subunit 2C	563 ± 86	544 ± 139	346 ± 71*	393 ± 43&
Creatine kinase S-type_ mitochondrial	357 ± 172	267 ± 100	75 ± 40*	92 ± 44&
Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	1205 ± 346	1089 ± 258	573 ± 146*	706 ± 302&
3-ketoacyl-CoA thiolase_ mitochondrial	976 ± 283	1215 ± 463	792 ± 219	872 ± 307&
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	694 ± 121	663 ± 138	521 ± 114*	547 ± 125&
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	227 ± 50	193 ± 73	184 ± 51	133 ± 60&
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1577 ± 238	1487 ± 422	1209 ± 93*	1151 ± 106&
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	396 ± 57	413 ± 133	351 ± 110	313 ± 90&
<i>ShamTF vs Sham Upregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
Phosphoglucumutase-1	301 ± 67	404 ± 88§	610 ± 97*	573 ± 101&
<i>ShamTF vs Sham Downregulated</i>				
Proteínas	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	432 ± 57	383 ± 38§	321 ± 43*	301 ± 55&

Sham: controle sedentário; ShamTF: controle exercitado; EAo: estenose aórtica sedentário; EAoTF: estenose aórtica exercitado (n= 10 por grupo). ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni (paramétrico) ou Kruskal-Wallis complementado com Dunn (não paramétrico). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75. $p < 0,05$. *: EAo vs Sham; #: EAoTF vs EAo; &: EAoTF vs ShamTF. §: ShamTF vs Sham.

Tabela suplementar 3. Termos Ontológicos *Up-regulados* no coração de ratos do grupo **EAO vs Sham**

ID GO	Processos biológicos
GO:0015886	Heme transport
GO:0033864	Positive regulation of NAD(P)H oxidase activity
GO:1901671	<i>Positive regulation of superoxide dismutase activity</i>
GO:0043403	Skeletal muscle tissue regeneration
GO:0045103	Intermediate filament-based process
GO:0045730	Respiratory burst
GO:0032060	Bleb assembly
GO:0042098	T cell proliferation
GO:0071480	Cellular response to gamma radiation
GO:0035994	<i>Response to muscle stretch</i>
GO:0051707	<i>Response to other organism</i>
GO:0007584	<i>Response to nutrient</i>
GO:0001666	<i>Response to hypoxia</i>
GO:0033280	<i>Response to vitamin D</i>
GO:0071222	<i>Cellular response to lipopolysaccharide</i>
GO:0031668	<i>Cellular response to extracellular stimulus</i>
GO:0001963	Cynaptic transmission, dopaminergic
GO:0061077	Chaperone-mediated protein folding
GO:0020027	Hemoglobin metabolic process
GO:0019674	NAD metabolic process
GO:0006094	Gluconeogenesis
GO:0005975	Carbohydrate metabolic process
GO:0042168	Heme metabolic process
GO:0045069	Regulation of viral genome replication
GO:0050434	<i>Positive regulation of viral transcription</i>
GO:0030644	Cellular chloride ion homeostasis
GO:1905516	Positive regulation of fertilization
GO:0006110	Regulation of glycolytic process
GO:0042177	<i>Negative regulation of protein catabolic process</i>
GO:0032435	<i>Negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>
GO:0060765	Regulation of androgen receptor signaling pathway
GO:0046314	Phosphocreatine biosynthetic process
GO:0000413	Protein peptidyl-prolyl isomerization
GO:0071284	Cellular response to lead ion
GO:0010941	Regulation of cell death
GO:0006937	Regulation of muscle contraction
GO:0060252	<i>Positive regulation of glial cell proliferation</i>
GO:0050819	<i>Negative regulation of coagulation</i>
GO:0010634	<i>Positive regulation of epithelial cell migration</i>
GO:0045581	<i>Negative regulation of T cell differentiation</i>
GO:0030194	<i>Positive regulation of blood coagulation</i>
GO:0030195	<i>Negative regulation of blood coagulation</i>
GO:2000134	Negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle
GO:0010629	<i>Negative regulation of gene expression</i>
GO:0010972	<i>Negative regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle</i>
GO:0050770	Regulation of axonogenesis
GO:0032233	<i>Positive regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0035065	<i>Regulation of histone acetylation</i>
GO:0030308	<i>Negative regulation of cell growth</i>
GO:0033234	<i>Negative regulation of protein sumoylation</i>
GO:0031333	<i>Negative regulation of protein-containing complex assembly</i>

GO:1900029	<i>Positive regulation of ruffle assembly</i>
GO:0051444	<i>Negative regulation of ubiquitin-protein transferase activity</i>
GO:0051497	<i>Negative regulation of stress fiber assembly</i>
GO:0030833	<i>Regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0032232	<i>Negative regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0030837	<i>Negative regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0098885	Modification of postsynaptic actin cytoskeleton
GO:0060074	<i>Synapse maturation</i>
GO:0045109	Intermediate filament organization
GO:0008154	Actin polymerization or depolymerization
GO:0006979	Response to oxidative stress
GO:0033554	<i>Cellular response to stress</i>
GO:0097066	Response to thyroid hormone
GO:0051246	Regulation of protein metabolic process
GO:0046475	Glycerophospholipid catabolic process
GO:0006414	Translational elongation
GO:0060081	Membrane hyperpolarization
GO:0051899	<i>Membrane depolarization</i>
GO:0051881	<i>Regulation of mitochondrial membrane potential</i>
GO:0003254	<i>Regulation of membrane depolarization</i>
GO:0006517	Protein deglycosylation
GO:0042866	Pyruvate biosynthetic process
GO:0051156	Glucose 6-phosphate metabolic process
GO:0032967	Positive regulation of collagen biosynthetic process
GO:0021762	Substantia nigra development
GO:0060020	<i>Bergmann glial cell differentiation</i>
GO:0014002	<i>Astrocyte development</i>
GO:1901016	Regulation of potassium ion transmembrane transporter activity
GO:1900182	<i>Positive regulation of protein localization to nucleus</i>
GO:0046826	<i>Negative regulation of protein export from nucleus</i>
GO:0032387	<i>Negative regulation of intracellular transport</i>
GO:0043268	<i>Positive regulation of potassium ion transport</i>
GO:0042493	Response to drug
GO:0010033	<i>Response to organic substance</i>
GO:0034599	<i>Cellular response to oxidative stress</i>
GO:0000302	<i>Response to reactive oxygen species</i>
GO:0019430	<i>Removal of superoxide radicals</i>
GO:0007021	Tubulin complex assembly
GO:0050821	Protein stabilization
GO:0042744	Hydrogen peroxide catabolic process
GO:0042743	<i>Hydrogen peroxide metabolic process</i>
GO:0010667	Negative regulation of cardiac muscle cell apoptotic process
GO:1902236	Negative regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway
GO:0043524	Negative regulation of neuron apoptotic process
GO:1903202	<i>Negative regulation of oxidative stress-induced cell death</i>
GO:0043154	<i>Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process</i>
GO:2001237	<i>Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway</i>
GO:2001268	<i>Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity in apoptotic signaling pathway</i>
GO:2001240	<i>Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand</i>
GO:1903206	<i>Negative regulation of hydrogen peroxide-induced cell death</i>
GO:1903204	<i>Negative regulation of oxidative stress-induced neuron death</i>
GO:0043523	<i>Regulation of neuron apoptotic process</i>
GO:1903208	<i>Negative regulation of hydrogen peroxide-induced neuron death</i>

GO:0060561	Apoptotic process involved in morphogenesis
GO:0006089	Lactate metabolic process
GO:0019563	<i>Glycerol catabolic process</i>
GO:0042311	Vasodilation
GO:0048026	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome
GO:0051054	<i>Positive regulation of DNA metabolic process</i>
GO:0002639	<i>Positive regulation of immunoglobulin production</i>
GO:0060335	<i>Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway</i>
GO:0031665	<i>Negative regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway</i>
GO:0002925	<i>Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin</i>
GO:0043488	<i>Regulation of mRNA stability</i>
GO:0051403	Stress-activated MAPK cascade
GO:0046697	Decidualization
GO:0070307	<i>Lens fiber cell development</i>
GO:0060612	<i>Adipose tissue development</i>
GO:0001707	<i>Mesoderm formation</i>
GO:0007517	<i>Muscle organ development</i>
GO:0007568	Aging
GO:0006754	ATP biosynthetic process
GO:0006096	<i>Glycolytic process</i>
GO:1903428	Positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
GO:2000378	<i>negative regulation of reactive oxygen species metabolic process</i>
GO:1903427	<i>negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process</i>
GO:0007596	Blood coagulation
GO:0010269	Response to selenium ion
GO:0010038	<i>Response to metal ion</i>
GO:0010273	<i>Detoxification of copper ion</i>
GO:0010226	<i>Response to lithium ion</i>
GO:0042542	<i>Response to hydrogen peroxide</i>
GO:0010259	Multicellular organism aging
GO:0071872	Cellular response to epinephrine stimulus
GO:0071225	<i>Cellular response to muramyl dipeptide</i>
GO:0032355	<i>Response to estradiol</i>
GO:0051591	<i>Response to cAMP</i>
GO:0097211	<i>Cellular response to gonadotropin-releasing hormone</i>
GO:0033198	<i>Response to ATP</i>
GO:0048872	Homeostasis of number of cells
GO:0034101	<i>Erythrocyte homeostasis</i>
GO:0042593	<i>Glucose homeostasis</i>
GO:0045454	<i>Cell redox homeostasis</i>
GO:2000679	Positive regulation of transcription regulatory region DNA binding
GO:0045471	Response to ethanol
GO:0009749	<i>Response to glucose</i>
GO:0110095	<i>Cellular detoxification of aldehyde</i>
GO:0098869	<i>Cellular oxidant detoxification</i>

ID GO	Função molecular
GO:0005198	Structural molecule activity
GO:0005212	Structural constituent of eye lens
GO:0005388	P-type calcium transporter activity
GO:0015232	<i>Heme transmembrane transporter activity</i>
GO:0016853	Isomerase activity
GO:1903136	Cuprous ion binding
GO:0016209	Antioxidant activity

GO:0008379	<i>Thioredoxin peroxidase activity</i>
GO:0004602	<i>Glutathione peroxidase activity</i>
GO:0004601	<i>Peroxidase activity</i>
GO:0047499	Calcium-independent phospholipase A2 activity
GO:0102568	<i>Phospholipase A2 activity consuming 1,2-dioleoylphosphatidylethanolamine)</i>
GO:0102567	<i>Phospholipase A2 activity (consuming 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine)</i>
GO:0000774	Adenyl-nucleotide exchange factor activity
GO:0070064	Proline-rich region binding
GO:0003755	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity
GO:0016684	Oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor
GO:0004111	Creatine kinase activity
GO:0005515	Protein binding
GO:0030955	Potassium ion binding
GO:0048029	Monosaccharide binding
GO:0000287	Magnesium ion binding
GO:0044388	Small protein activating enzyme binding
GO:0003746	Translation elongation factor activity
GO:0050681	Androgen receptor binding
GO:0042169	SH2 domain binding
GO:0097110	Scaffold protein binding
GO:0001784	Phosphotyrosine residue binding
GO:0004707	MAP kinase activity
GO:0003785	Actin monomer binding
GO:0019955	Cytokine binding
GO:0042802	Identical protein binding
GO:0051082	<i>Unfolded protein binding</i>
GO:0016301	Kinase activity
GO:1990381	Ubiquitin-specific protease binding
GO:0044390	<i>Ubiquitin-like protein conjugating enzyme binding</i>
GO:0031625	<i>Ubiquitin protein ligase binding</i>
GO:0019900	<i>Kinase binding</i>
GO:0031267	<i>Small GTPase binding</i>
GO:0042803	Protein homodimerization activity

ID GO	Componente celular
GO:0005844	Polysome
GO:0061827	Sperm head
GO:0044297	Cell body
GO:0043204	Perikaryon
GO:0042995	Cell projection
GO:0043005	<i>Neuron projection</i>
GO:0035686	<i>Sperm fibrous sheath</i>
GO:0060170	<i>Ciliary membrane</i>
GO:0030424	Axon
GO:0045202	<i>Synapse</i>
GO:0098688	<i>Parallel fiber to Purkinje cell synapse</i>
GO:0098793	Presynapse
GO:0005829	Cytosol
GO:0005737	Cytoplasm
GO:0005739	Mitochondrion
GO:0005856	Cytoskeleton
GO:0005759	Mitochondrial matrix
GO:0032432	Actin filament bundle

GO:0045098	Type III intermediate filament
GO:0043292	<i>Contractile fiber</i>
GO:0097512	Cardiac myofibril
GO:0031430	<i>M band</i>
GO:0030018	<i>Z disc</i>
GO:0031674	<i>I band</i>
GO:0005634	Nucleus

Tabela suplementar 3. Termos Ontológicos *Down-regulados* no coração de ratos do grupo EAO vs Sham

ID GO	Processos biológicos
GO:0001738	Morphogenesis of a polarized epithelium
GO:0007369	<i>Gastrulation</i>
GO:0060612	<i>Adipose tissue development</i>
GO:0055007	<i>Cardiac muscle cell differentiation</i>
GO:0002082	Regulation of oxidative phosphorylation
GO:0015671	Oxygen transport
GO:0070293	Renal absorption
GO:0106077	Histone succinylation
GO:0071257	Cellular response to electrical stimulus
GO:0097250	Mitochondrial respirasome assembly
GO:0008637	<i>Apoptotic mitochondrial changes</i>
GO:0042744	Hydrogen peroxide catabolic process
GO:0035965	Cardiolipin acyl-chain remodeling
GO:0006101	Citrate metabolic process
GO:0022900	Electron transport chain
GO:0006120	<i>Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone</i>
GO:0005978	<i>Glycogen biosynthetic process</i>
GO:0015986	<i>ATP synthesis coupled proton transport</i>
GO:0022904	<i>Respiratory electron transport chain</i>
GO:0042776	<i>Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport</i>
GO:0006099	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
GO:0006122	<i>Mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c</i>
GO:0006119	<i>Oxidative phosphorylation</i>
GO:0006754	<i>ATP biosynthetic process</i>
GO:0009437	Carnitine metabolic process
GO:0045329	<i>Carnitine biosynthetic process</i>
GO:0050434	Positive regulation of viral transcription
GO:0055091	Phospholipid homeostasis
GO:0010667	Negative regulation of cardiac muscle cell apoptotic process
GO:0060546	<i>Negative regulation of necroptotic process</i>
GO:1900024	Regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading
GO:1903076	Regulation of protein localization to plasma membrane
GO:0022898	<i>Regulation of transmembrane transporter activity</i>
GO:0034201	Response to oleic acid
GO:0045176	Apical protein localization
GO:0045055	Regulated exocytosis
GO:0032456	<i>Endocytic recycling</i>
GO:0015867	ATP transport
GO:0006111	Regulation of gluconeogenesis
GO:0042594	Response to starvation
GO:0007584	<i>Response to nutrient</i>
GO:0098885	Modification of postsynaptic actin cytoskeleton

GO:0034333	<i>Adherens junction assembly</i>
GO:0098974	<i>Postsynaptic actin cytoskeleton organization</i>
GO:0048870	Cell motility
GO:0000079	Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity
GO:0006105	Succinate metabolic process
GO:0035338	Long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process
GO:0006084	<i>Acetyl-CoA metabolic process</i>
GO:0015937	<i>Coenzyme A biosynthetic process</i>
GO:0006086	<i>Acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate</i>
GO:0006085	<i>Acetyl-CoA biosynthetic process</i>
GO:0010044	Response to aluminum ion
GO:0046688	<i>Response to copper ion</i>
GO:0051791	Medium-chain fatty acid metabolic process
GO:0006541	Glutamine metabolic process
GO:0008154	Actin polymerization or depolymerization
GO:0036010	Protein localization to endosome
GO:0070527	Platelet aggregation
GO:0015909	Long-chain fatty acid transport
GO:0015908	<i>Fatty acid transport</i>
GO:0044539	<i>Long-chain fatty acid import into cell</i>
GO:0042493	Response to drug
GO:0010033	<i>Response to organic substance</i>
GO:0009725	<i>Response to hormone</i>
GO:0051384	<i>Response to glucocorticoid</i>
GO:0032868	<i>Response to insulin</i>
GO:0021762	Substantia nigra development
GO:0033211	Adiponectin-activated signaling pathway
GO:0051054	Positive regulation of DNA metabolic process
GO:0051793	Medium-chain fatty acid catabolic process
GO:0006635	<i>Fatty acid beta-oxidation</i>
GO:0033539	<i>Fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase</i>
GO:0061051	Positive regulation of cell growth involved in cardiac muscle cell development
GO:0120162	<i>Positive regulation of cold-induced thermogenesis</i>
GO:1900029	Positive regulation of ruffle assembly
GO:0051497	<i>Negative regulation of stress fiber assembly</i>
GO:0030833	<i>Regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0032232	<i>Negative regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0032233	<i>Positive regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0030837	<i>Negative regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0008610	Lipid biosynthetic process
GO:0019432	<i>Triglyceride biosynthetic process</i>
GO:0006631	<i>Fatty acid metabolic process</i>
GO:0048240	Sperm capacitation
GO:0060074	<i>Synapse maturation</i>
GO:0042178	Xenobiotic catabolic process
GO:0001889	Liver development
GO:0048821	<i>Erythrocyte development</i>
GO:0001895	Retina homeostasis
GO:0046314	Phosphocreatine biosynthetic process
GO:0006107	Oxaloacetate metabolic process
GO:0006103	<i>2-oxoglutarate metabolic process</i>
GO:0000038	Very long-chain fatty acid metabolic process
GO:0001676	<i>Long-chain fatty acid metabolic process</i>

ID GO	Função molecular
GO:0004300	Enoyl-CoA hydratase activity
GO:0005344	Oxygen carrier activity
GO:0098973	Structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton
GO:1905394	Retromer complex binding
GO:0102391	Decanoate-CoA ligase activity
GO:0004467	<i>Long-chain fatty acid-CoA ligase activity</i>
GO:0047676	<i>Arachidonate-CoA ligase activity</i>
GO:0003857	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity
GO:0003988	Acetyl-CoA C-acyltransferase activity
GO:0031720	Haptoglobin binding
GO:0016853	Isomerase activity
GO:0051537	2 iron, 2 sulfur cluster binding
GO:0010314	Phosphatidylinositol-5-phosphate binding
GO:0070273	<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate binding</i>
GO:0080025	<i>Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate binding</i>
GO:0005546	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding</i>
GO:0030955	Potassium ion binding
GO:0019825	Oxygen binding
GO:0044877	Protein-containing complex binding
GO:0016491	Oxidoreductase activity
GO:0043325	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binding
GO:0070728	Leucine binding
GO:0036041	<i>Long-chain fatty acid binding</i>
GO:0004111	Creatine kinase activity
GO:0000062	Fatty-acyl-CoA binding
GO:0005324	Long-chain fatty acid transporter activity
GO:0034604	Pyruvate dehydrogenase (NAD ⁺) activity
GO:0043177	Organic acid binding
GO:0000774	Adenyl-nucleotide exchange factor activity
GO:0051287	NAD binding
GO:0070403	NAD ⁺ binding
GO:0003995	Acyl-CoA dehydrogenase activity
GO:0030957	Tat protein binding
GO:0030492	Hemoglobin binding
GO:0070064	Proline-rich region binding
GO:0050998	Nitric-oxide synthase binding
GO:0031267	<i>Small GTPase binding</i>
GO:0050660	Flavin adenine dinucleotide binding
GO:0004601	Peroxidase activity
GO:0003785	Actin monomer binding
GO:0005347	ATP transmembrane transporter activity
GO:0009055	Electron transfer activity
GO:0008137	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity</i>
GO:0004129	<i>Cytochrome-c oxidase activity</i>
GO:0019899	Enzyme binding
GO:0046933	Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism
ID GO	Componente celular
GO:0031838	Haptoglobin-hemoglobin complex
GO:0097433	Dense body
GO:0044305	Calyx of Held

GO:0043159	Acrosomal matrix
GO:0002102	Podosome
GO:0098871	<i>Postsynaptic actin cytoskeleton</i>
GO:0016528	Sarcoplasm
GO:0005833	Hemoglobin complex
GO:0005739	Mitochondrion
GO:0071203	WASH complex
GO:0045254	Pyruvate dehydrogenase complex
GO:0045252	<i>Oxoglutarate dehydrogenase complex</i>
GO:0045261	Proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
GO:0000276	<i>Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)</i>
GO:0005753	<i>Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex</i>
GO:0030670	Phagocytic vesicle membrane
GO:0035267	NuA4 histone acetyltransferase complex
GO:0005759	<i>Mitochondrial matrix</i>
GO:0032592	<i>Integral component of mitochondrial membrane</i>
GO:0005741	<i>Mitochondrial outer membrane</i>
GO:0005746	<i>Mitochondrial respirasome</i>
GO:0005751	<i>Mitochondrial respiratory chain complex IV</i>
GO:0005743	<i>Mitochondrial inner membrane</i>
GO:0005750	<i>Mitochondrial respiratory chain complex III</i>
GO:0031966	<i>Mitochondrial membrane</i>
GO:0042645	Mitochondrial nucleoid
GO:0030863	Cortical cytoskeleton
GO:0098688	Parallel fiber to Purkinje cell synapse
GO:0098685	<i>Schaffer collateral - CA1 synapse</i>
GO:0070160	<i>Tight junction</i>
GO:0043296	<i>Apical junction complex</i>

Tabela suplementar 3. Termos Ontológicos *Up-regulados* no coração de ratos do grupo **EAoTF vs EAo**

ID GO	Processos biológicos
GO:0007584	Response to nutrient
GO:1902600	Proton transmembrane transport
GO:0006123	Mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen
Função molecular	
GO:0005751	Mitochondrial respiratory chain complex IV
GO:0031966	Mitochondrial membrane
GO:0005743	Mitochondrial inner membrane
Componente celular	
GO:0004129	Cytochrome-c oxidase activity

Tabela suplementar 3. Termos Ontológicos *Down-regulados* no coração de ratos do grupo **EAoTF vs EAo**.

ID GO	Processos biológicos
GO:0002376	Immune system process
GO:0007568	Aging
GO:0014823	Response to activity
GO:0015886	Heme transport
GO:0045103	Intermediate filament-based process
GO:0045730	Respiratory burst
GO:0051354	Negative regulation of oxidoreductase activity
GO:0032060	Bleb assembly
GO:0031638	Zymogen activation
GO:0046475	Glycerophospholipid catabolic process
GO:0050434	Positive regulation of viral transcription
GO:0042168	Heme metabolic process
GO:0006110	Regulation of glycolytic process
GO:0042531	Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein
GO:0045727	Positive regulation of translation
GO:0043488	Regulation of mRNA stability
GO:0048026	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome
GO:0020027	Hemoglobin metabolic process
GO:0006879	Cellular iron ion homeostasis
GO:0045454	Cell redox homeostasis
GO:0050770	Regulation of axonogenesis
GO:1900029	Positive regulation of ruffle assembly
GO:0010977	Negative regulation of neuron projection development
GO:0010269	Response to selenium ion
GO:0051602	Response to electrical stimulus
GO:0009314	Response to radiation
GO:0010165	Response to X-ray
GO:0009408	Response to heat
GO:0002526	Acute inflammatory response
GO:0071346	Cellular response to interferon-gamma
GO:0071363	Cellular response to growth factor stimulus
GO:0009725	Response to hormone
GO:0006953	Acute-phase response

GO:0044344	<i>Cellular response to fibroblast growth factor stimulus</i>
GO:0060395	SMAD protein signal transduction
GO:0007219	<i>Notch signaling pathway</i>
GO:0098885	Modification of postsynaptic actin cytoskeleton
GO:0060074	<i>Synapse maturation</i>
GO:0045109	Intermediate filament organization
GO:0008154	<i>Actin polymerization or depolymerization</i>
GO:0033590	Response to cobalamin
GO:0042594	<i>Response to starvation</i>
GO:0033591	<i>Response to L-ascorbic acid</i>
GO:0033280	<i>Response to vitamin D</i>
GO:0051246	Regulation of protein metabolic process
GO:0002925	Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin
GO:0060335	<i>Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway</i>
GO:0002639	<i>Positive regulation of immunoglobulin production</i>
GO:0042493	Response to drug
GO:0010033	<i>Response to organic substance</i>
GO:0098869	<i>Cellular oxidant detoxification</i>
GO:0032967	Positive regulation of collagen biosynthetic process
GO:0032781	Positive regulation of ATPase activity
GO:0042744	Hydrogen peroxide catabolic process
GO:0010634	Positive regulation of epithelial cell migration
GO:0010942	<i>Positive regulation of cell death</i>
GO:0051054	<i>Positive regulation of DNA metabolic process</i>
GO:0035774	<i>Positive regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus</i>
GO:0060252	<i>Positive regulation of glial cell proliferation</i>
GO:0042311	Vasodilation
GO:0046697	Decidualization
GO:0070307	<i>Lens fiber cell development</i>
GO:0060612	<i>Adipose tissue development</i>
GO:0001843	<i>Neural tube closure</i>
GO:0043403	Skeletal muscle tissue regeneration
GO:0031100	<i>Animal organ regeneration</i>
GO:0006096	Glycolytic process
GO:0045444	Fat cell differentiation
GO:0060020	Bergmann glial cell differentiation
GO:0014002	<i>Astrocyte development</i>
GO:0007596	Blood coagulation
GO:0071225	Cellular response to muramyl dipeptide
GO:0000302	<i>Response to reactive oxygen species</i>
GO:0042542	<i>Response to hydrogen peroxide</i>
GO:0060416	<i>Response to growth hormone</i>
GO:0010288	Response to lead ion
GO:0032026	Response to magnesium ion
GO:0010043	Response to zinc ion
GO:0051497	Negative regulation of stress fiber assembly
GO:0030833	<i>Regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0032232	<i>Negative regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0032233	<i>Positive regulation of actin filament bundle assembly</i>
GO:0051496	<i>Positive regulation of stress fiber assembly</i>
GO:0030837	<i>Negative regulation of actin filament polymerization</i>
GO:0030838	<i>Positive regulation of actin filament polymerization</i>

ID GO	Função molecular
GO:0005212	Structural constituent of eye lens
GO:0005546	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding
GO:0015232	Heme transmembrane transporter activity
GO:0047499	Calcium-independent phospholipase A2 activity
GO:0102568	<i>Phospholipase A2 activity consuming 1,2-dioleoylphosphatidylethanolamine)</i>
GO:0102567	<i>Phospholipase A2 activity (consuming 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine)</i>
GO:0016209	Antioxidant activity
GO:0004602	<i>Glutathione peroxidase activity</i>
GO:0004601	<i>Peroxidase activity</i>
GO:0016787	Hydrolase activity
GO:0030492	Hemoglobin binding
GO:0000774	Adenyl-nucleotide exchange factor activity
GO:0005515	Protein binding
GO:0003725	Double-stranded RNA binding
GO:0070064	Proline-rich region binding
GO:0097110	Scaffold protein binding
GO:0051721	Protein phosphatase 2A binding
GO:0019901	<i>Protein kinase binding</i>
GO:0019900	<i>Kinase binding</i>
GO:0031267	<i>Small GTPase binding</i>
GO:0001784	Phosphotyrosine residue binding
GO:0003785	Actin monomer binding
GO:0042802	Identical protein binding
GO:0005200	Structural constituent of cytoskeleton

ID GO	Componente celular
GO:0031838	Haptoglobin-hemoglobin complex
GO:0072562	Blood microparticle
GO:0098688	Parallel fiber to Purkinje cell synapse
GO:0031252	Cell leading edge
GO:0043005	Neuron projection
GO:0048471	Perinuclear region of cytoplasm
GO:0016363	Nuclear matrix
GO:0045335	Phagocytic vesicle
GO:0005856	Cytoskeleton
GO:0005844	Polysome
GO:0005882	Intermediate filament
GO:0045111	<i>Intermediate filament cytoskeleton</i>
GO:0045098	<i>Type III intermediate filament</i>

9. ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp



Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº1308/2019-CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Análise Protômica do miocárdio de ratos com disfunção ventricular atenuada pelo treinamento físico precoce,"** conduzido pelo Pesquisador: **Gustavo Augusto Ferreira Mota** – Orientador: Prof. Emérito, Antônio Carlos Cicogna – colaboradores: Dylon Henrique Salomé de Campos, Sérgio Luiz Borges de Souza, Silmêia Garcia Zanati Bazan e Marília Atônso Rabelo Buzalaf, registrada com o nº **1308/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 19 de junho de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09 de janeiro de 2022
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	ZERO (Utilizado material armazenado)
Idade/Peso	21 – 70 a 90 gr
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central



Sara Rosa
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Prof. Assisete Bertolotto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Deserto Rubião Junior, s/nº – Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail: Secretaria: cqua@fmb.unesp.br

ANEXO B – Artigos publicados durante o doutorado.

- Da Silva, V.L, de Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, Melo, A.B, Vileigas, D.F, Coelho, P.M, Sant'Ana, P.G, Campo, D.H.S, Bazan, S.G.Z, Leopoldo, A.S, Cicogna, A.C. The dysfunctional scenario of the major components responsible for myocardial calcium balance in heart failure by aortic stenosis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia JCR*, 2021. (In press).
- Gatto, M, **Mota, G.A.F**. Influence of doxorubicin treatment on heme metabolism in cardiomyoblasts: an in vitro study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia JCR*, v. 116, p. 323-324, 2021.
- Mazeto, I.F.S, Okoshi, K, Silveira, C.F.S.M.P, Sant'Ana, P.G, Silva, V.L, **Mota, G.A.F**, de Souza, S.L.B, Vileigas, D.F, Padovani, C.R, Cicogna, A.C. Calcium homeostasis behavior and cardiac function on left ventricular remodeling by pressure overload. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research JCR*, v. 54, p. e10138, 2021.
- Silva-Bertani, D.C.T, Vileigas, D.F, **Mota, G.A.F**, de Souza, S.L.B, Tomazi, L.C, Campos, D.H.S, Deus, A.F, Freire, P.P, Alves, C.A.B, Padovani, C.R, Cicogna, A.C. Decreased collagen type I is associated with increased metalloproteinase-2 activity and protein expression of leptin in myocardium of obese rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia JCR*, v. 115, p.61-70, 2020.
- Gatto, M, Borim, P.A, Wolf, I.R, Cruz, F.T, **Mota, G.A.F**, Braz, A.M.M, Casella Amorim, B.C, Valente, G.T, Golim, M.A, Venturini, J, Junior, J.P.A, Pontillo, A, Sartori, A. Transcriptional analysis of THP-1 cells infected with Leishmania infantum indicates no activation of the inflammasome platform. *PLoS Neglected Tropical Diseases JCR*, v. 14, p. e0007949, 2020.
- Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, Gregolin, C.S, do Nascimento, M, Luvizotto, R.A.M, Bazan, S.G.Z, Sugizaki, M.M, Barbisan, L.F, Cicogna, A.C, Nascimento, A.F. Exercise Training Attenuates Cirrhotic Cardiomyopathy. Exercise Training Attenuates Cirrhotic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Translational Research JCR*, v.1, p.1-11, 2020.
- Silva-Bertani, D.C.T, Vileigas, D.F, **Mota, G.A.F**, de Souza, S.L.B, Sant'Ana, P.G, Freire, P.P, de Tomasi, L.C, Corrêa, C.R, Padovani, C.R, Fernandes, T, de Oliveira, E.M, Cicogna, A.C. Increased angiotensin II from adipose tissue modulates myocardial collagen I and III in obese rats. *Life Sciences JCR*, v. 252, p. 117650, 2020.

- Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, da Silva, V.L, Sant'Ana, P.G, Vileigas, D.F, Campos, D.H.S, Padovani, C.R, Rodrigues, M.A.M, Nascimento, A.F, Sugizaki, M.M, Brum, P.C, Cicogna, A.C. Adjustments in β -Adrenergic Signaling Contribute to the Amelioration of Cardiac Dysfunction by Exercise Training in Supravalvular Aortic Stenosis. *Cellular Physiology And Biochemistry* **JCR**, v. 54, p. 665-681, 2020.
- Zucchi, J.W, Franco, E.A.T, Schreck, T, Silva, M.H.C.E, Migliorini, S.R.S, **Mota, G.A.F**, Garcia, T, Morais, B.E.B, Machado, L.H.S, Paiva, S.A.R, Godoy, I, Tanni, S.E. Different Clusters in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Two-Center Study in Brazil. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **JCR**, v. 15, p. 2847-2856, 2020.
- **Mota, G.A.F**, de Souza, S.L.B, da Silva, V.L, Gatto, M, de Campos, D.H.S, Sant'Ana, P.G, Vileigas, D.F, Padovani, C.R, Casarine, D.E, Oliveira, E.M, Bazan, S.G.Z, Fernandes, T, Sugizaki, M.M, Gomes, E.R.M, Cicogna, A.C.. Cardioprotection Generated by Aerobic Exercise Training is Not Related to the Proliferation of Cardiomyocytes and Angiotensin-(1-7) Levels in the Hearts of Rats with Supravalvar Aortic Stenosis. *Cellular physiology and biochemistry* **JCR**, v. 54, p. 719-735, 2020.
- Gregolin, C.S, do Nascimento, M, Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, Bonfim, G.F, Luvizoto, R.A.M, Sugizaki, M.M, Bazan, S.G.Z, de Campos, D.H.S, Dias, M.C, Corrêa, C.R, Cicogna, A.C, Nascimento, A.F.. Myocardial Dysfunction in Cirrhotic Cardiomyopathy is Associated with Alterations of Phospholamban Phosphorylation and IL-6 Levels. *Archives of Medical Research* **JCR**, v. 15, p. 01-13, 2020.
- Gatto, M, Pagan, L.U, **Mota, G.A.F**. Influence of Atorvastatin on Intimal Hyperplasia in the Experimental Model. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **JCR**, v. 115, p. 637-638, 2020.
- Deus, A.F, da Silva, V.L, Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, Sant'Ana, P.G, Vileigas, D.F, Lima-Leopoldo, A.P, Leopoldo, A.S, Campos, D.H.S, de Tomasi, L.C, Padovani, C.R, Kolwics, S.C, Cicogna, A.C. Myocardial Dysfunction after Severe Food Restriction Is Linked to Changes in the Calcium-Handling Properties in Rats. *Nutrients* **JCR**, v. 11, p. 1985, 2019.
- Vileigas, D.F, Marciano, C.L.C, **Mota, G.A.F**, Souza, S.L.B, Sant'Ana, P.G, Okoshi, K, Padovani, C.R, Cicogna, A.C Temporal Measures in Cardiac Structure and Function During the Development of Obesity Induced by Different Types of Western Diet in a Rat Model. *Nutrients* **JCR**, v. 12, p. 68, 2019.
- Vileigas, D.F, Harman, V, M, Freire, P.P, Marciano, C.L.C, Sant'Ana, P.G, Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, da Silva, V.L, Campos, D.H.S, Padovani, C.R, Okoshi, K, Beynon, R.J, Santos, L.D, Cicogna, A.C.. Landscape of heart proteome changes in a diet-induced obesity model. *Scientific Reports* **JCR**, v. 9, p. 18050, 2019.

- Sant'Ana, P.G, Padovani, C.R, Batah, S.S, Leão, p.S, Teodoro, W.R, Souza, S.L.B, **Mota, G.A.F**, Vileigas, D.F, da Silva, V.L, Campos, D.H.S, Okoshi, K, Capelozzi, V.L, Cicogna, A.C, Fabro, A.T.. Heart remodeling produced by aortic stenosis promotes cardiomyocyte apoptosis mediated by collagen V imbalance. *Pathophysiology*, v. 25, p. 373-379, 2018.
- Neves, C, Tibana, R, Prestes, j, Voltarelli, F, Aguiar, A, **Mota G.A.F**, Sousa, S.L.B, Leopoldo, A, Leopoldo, A.P, Mueller, A, Aguiar, D, Navalta, J, Sugizaki, M.M. Digoxin Induces Cardiac Hypertrophy Without Negative Effects on Cardiac Function and Physical Performance in Trained Normotensive Rats. *International Journal of Sports Medicine JCR*, v. 38, p. 263-269, 2017.

Prêmios obtidos durante o doutorado.

- Prêmio Melhor Tema Livre Oral - Pesquisa Básica "Análise proteômica do miocárdio de ratos com disfunção cardíaca atenuada pelo treinamento físico aeróbio" de Mota et al., XIX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca da SBC - DEIC 2021.
- Prêmio Mérito Interdisciplinar "Cardioproteção gerada pelo treinamento físico aeróbio não está relacionada com a proliferação de cardiomiócitos e os níveis de angiotensina-(1-7) no miocárdio de ratos" de Mota et al., XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, SOCESP 2018.

Menção honrosa obtida durante o doutorado

- Tema Livre Destaque do Departamento de Educação Física "Cardioproteção gerada pelo treinamento físico aeróbio não está relacionada com a proliferação de cardiomiócitos e os níveis de angiotensina-(1-7) no miocárdio de ratos" de Mota et al., XIX Simpósio de Educação Física do XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP 2018.

Prêmios concorridos durante o doutorado

- Concorrente ao Prêmio de Melhor Tema Livre Oral - Jovem Pesquisador "Proteoma miocárdico de ratos com atenuação da disfunção ventricular pelo treinamento físico aeróbio" de Mota et al., 75º Congresso Brasileiro de Cardiologia - SBC 2020.
- Concorrente ao Prêmio de Melhor Tema Livre Oral - Jovem Pesquisador "Treinamento físico melhora a função cardíaca e não estimula a proliferação de cardiomiócitos e a expressão do receptor Mas em ratos" de Mota et al., 72º Congresso Brasileiro de Cardiologia - SBC 2017.