

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOMARCADORES CARDÍACOS EM CÃES COM
DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL
SUBMETIDOS A UM PROGRAMA DE
CONDICIONAMENTO FÍSICO**

Ana Paula Pinto Araújo Tristão

Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOMARCADORES CARDÍACOS EM CÃES COM
DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL
SUBMETIDOS A UM PROGRAMA DE
CONDICIONAMENTO FÍSICO**

M.V. Ana Paula Pinto Araújo Tristão

Orientador: Prof.Dr. Marlos Gonçalves Sousa

Co-orientador: Prof.Dr. Aparecido Antônio Camacho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de Clínica Médica Veterinária).

T838b Tristão, Ana Paula Pinto Araújo
Biomarcadores cardíacos em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral submetidos a um programa de condicionamento físico / Ana Paula Pinto Araújo Tristão. – – Jaboticabal, 2015
x, 68 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Marlos Gonçalves Sousa
Coorientador: Aparecido Antônio Camacho
Banca examinadora: Katia Mitsube Tarrága, Wagner Luis Ferreira
Bibliografia

1. Cães 2. Endocardiose. 3. Exercício. 4. Coração. 5. Peptídeos natriuréticos. 6. Troponina I cardíaca. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.126.42:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

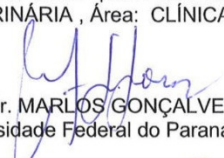
TÍTULO: BIOMARCADORES CARDÍACOS EM CÃES COM DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL SUBMETIDOS A UM PROGRAMA DE CONDICIONAMENTO FÍSICO

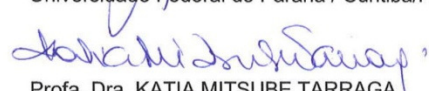
AUTORA: ANA PAULA PINTO ARAUJO TRISTÃO

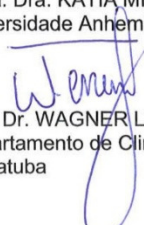
ORIENTADOR: Prof. Dr. MARLOS GONÇALVES SOUSA

COORIENTADOR: Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARLOS GONÇALVES SOUSA
Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR


Profa. Dra. KATIA MITSUBE TARRAGA
Universidade Anhembi Morumbi / São Paulo/SP


Prof. Dr. WAGNER LUÍS FERREIRA
Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Data da realização: 17 de julho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA PINTO ARAÚJO TRISTÃO – nascida em Brasília, Distrito Federal, aos 5 dias do mês de setembro, filha de Paulo César Tristão de Araújo e Jeanne Cristina Sousa Pinto. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade de Brasília em 2010. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Giane Regina Paludo em 2007/2008. Ingressou no programa de residência em clínica médica de pequenos animais na Universidade Estadual Paulista – UNESP-Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. Aparecido Antônio Camacho em fevereiro de 2011 e concluiu em fevereiro de 2013. Em março de 2013 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação do Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa e co-orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho. Durante o período de Mestrado foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

À minha mãe, por acreditar e sempre me apoiar, por seu amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e por me abençoar pela família e amigos maravilhosos que tenho.

Minha gratidão eterna a minha mãe, Dé, Rodrigo, André e Tia Maria pelo apoio e incentivo ao longo desses quatro anos em Jaboticabal. Ao Rodrigo, meu noivo, pela paciência, por me esperar, por me acompanhar diariamente apesar da distância e por me ajudar na elaboração desse trabalho.

Ao Professor Marlos por sua orientação, paciência e ajuda na elaboração desse trabalho, exemplo de pessoa e profissional que tenho como modelo para seguir.

Ao Professor Camacho por me orientar e acompanhar em Jaboticabal, tanto no período da residência e agora no mestrado. Sou muito grata por acreditar em mim e permitir fazer parte do Serviço de Cardiologia, onde aprendi muito e conheci profissionais excelentes e grandes amigos. Muito obrigada por toda ajuda e auxílio para execução desse projeto.

Ao Professor Guilherme Ferraz e aos graduandos, pós-graduandos e funcionários do LAFEQ pela confiança e colaboração na realização da parte experimental desse projeto.

Ao professor Hélio, Lurdinha e ao Laboratório de Imunologia por me ajudarem na realização da mensuração dos biomarcadores. Aos pós-graduandos Fábio Gava e Mariana Rondelli pela ajuda na interpretação dos biomarcadores.

A pós graduanda Letícia, Caxetinha para os íntimos, Professor Aureo, Mateus e ao Laboratório de Patologia Clínica pela execução dos biomarcadores inespecíficos.

A Thayla, Elaine, Diego e Professor Aulus pela paciência e confiança a nós creditada e pelos beagles cedidos para realização desse experimento.

Ao Professor Fábio Gava e Professora Mirela pela disponibilidade de participação na banca de qualificação e por toda colaboração. Ao Prof. Wagner e a Professor Kátia pelo disponibilidade, aceite e todo auxílio que disponibilizarão para conclusão desse trabalho.

Ao meu amigo Felipe, pelo companherismo e amizade, com você foi muito mais fácil essa caminhada e por dividirmos tantos momentos especiais. E pelo trabalho em equipe que trabalhamos muito a paciência e por fim concluirmos esse trabalho.

Ao Alejo por toda ajuda na execução desse trabalho.

Ao Fernando por nos ajudar com a obtenção dos ecos e ao Roberto pela tão temida multivariada.

A Mariana Tiai e ao Professor Canola por nos ajudar com as radiografias sempre no fim do dia, obrigada pela paciência e risadas.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, especialmente a Lidiane e Isaías.

A Rozana Wendler pela ajuda a distância com as entregas de documentos e cooperação nessa reta final.

Ao Evandro e Ferruge por serem meus guias, orientadores e amigos na residência e mestrado. Vocês foram meus exemplos determinantes para querer fazer parte dessa equipe em Jaboticabal.

A todos cardiolegas, muito obrigada pela amizade.

Aos meus queridos amigos Pedro, Ednita, Michelle, Raquel, Rozana, Mari, Kalina, Paulo Jark, Aninha, Thu, Caxetinha, Bombom agradeço pelo carinho e convívio em Jaboticabal.

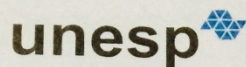
Aos beagles Coca, Rímel, Peri, Onofre, Ondina, Nina, Luizinho, Chico, Sacha, Simba, Scott, Scooby, Noé, Boy, Alfredo, Joaquim, Marley, Bruno e Brad que durante o experimento me alegraram e reforçaram o porquê da escolha em ser médica veterinária.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (processo nº 2013/14058-0) para esse estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1.INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. Degeneração mixomatosa da valva mitral.....	21
2.2. Exercício físico como terapia cardiovascular.....	24
2.3. Biomarcadores.....	29
2.3.1. Peptídeos Natriuréticos.....	30
2.3.2. Troponinas Cardíacas.....	32
2.3.3. Creatinoquinase (CK).....	33
2.3.4. Lactato Desidrogenase (LDH).....	34
2.3.5 Aspartato Aminotransferase (AST).....	35
3. HIPÓTESE.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1.Objetivo geral.....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1. Local de realização da pesquisa.....	39
5.2. Animais.....	39
5.3. Teste de esforço incremental.....	40
5.3.1. Adaptação dos cães.....	40
5.3.2. Protocolo do teste incremental.....	40
5.3.3. Amostra sanguínea.....	42
5.3.4. Limiar de lactato.....	42
5.4. Programa de condicionamento.....	43
5.5. Biomarcadores.....	43
5.5.1. Biomarcadores específicos.....	43
5.5.2. Biomarcadores inespecíficos.....	46
5.6. Ecocardiografia.....	46
5.7. Momentos de avaliação.....	47

5.8. Análise estatística.....	47
6. RESULTADOS.....	49
6.1. Adaptação à esteira.....	49
6.2. Teste de esforço incremental.....	49
6.3 Treinamento.....	50
6.4. Concentração plasmática de lactato e velocidade relacionadas ao teste de esforço.....	51
6.5. Perfil dos Biomarcadores Específicos.....	52
6.6. Perfil dos Biomarcadores Inespecíficos.....	55
6.7. Análise estatística multivariada exploratória	58
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÃO.....	72
9. REFERÊNCIAS.....	73

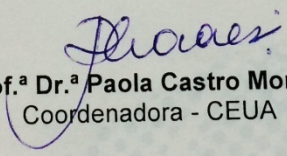
Certificado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio, FCAV-Unesp)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 02288/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeitos do exercício sobre os biomarcadores de função cardíaca em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

BIOMARCADORES CARDÍACOS EM CÃES COM DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL SUBMETIDOS A UM PROGRAMA DE CONDICIONAMENTO FÍSICO

RESUMO – Diferentemente da medicina humana que já utiliza o exercício como ferramenta terapêutica em diversas enfermidades cardíacas, na clínica de pequenos animais essa modalidade de tratamento não é indicada para cães cardiopatas devido à falta de estudos nesse campo. A utilização de biomarcadores cardíacos pode ser indicada como meio para monitorizar respostas a tratamentos e atividade física. Assim, o estudo em questão teve como escopo avaliar os biomarcadores cardíacos em cães com doença mixomatosa da valva mitral (DMVM), submetidos ao exercício físico, correlacionando os valores das concentrações de tais substâncias com os índices ecocardiográficos estudados. Para tanto, 15 cães com DMVM foram selecionados e alocados em três grupos, conforme a severidade da enfermidade (baseada no tamanho da relação átrio esquerdo/aorta). O teste de esforço incremental foi realizado para detecção do limiar de lactato e velocidade correspondente. Na sequência, foram realizadas oito semanas consecutivas de treinamento, com base em 70% da velocidade do limiar de lactato. Foram documentadas as concentrações sanguíneas dos biomarcadores cardíacos (NT-proANP, NT-proBNP, troponina I cardíaca, CK-MB, LDH I e AST) e as variáveis ecocardiográficas nos momentos inicial (M0), 4 (M4) e 8 (M8) semanas após o início do protocolo de exercício. No grupo AE/Ao<1,4 foi identificada diferença significativa no NT-proANP em M8 comparado ao M0. Para os demais biomarcadores não houve diferença entre grupos e momentos ao longo do condicionamento. Por meio de análise estatística multivariada, foram extraídos 8 fatores, sendo que o fator 1, composto por FEC% e FEJ%, representou 17,05% da variância total dos dados. Já os fatores compostos por biomarcadores apresentaram menor representatividade. Os resultados desta pesquisa permitem concluir que o exercício físico sistematizado, da forma como realizado, não promoveu alteração nas concentrações dos biomarcadores de estiramento e lesão de miócitos cardíacos. Além disso, a análise multivariada exploratória mostrou que os fatores onde se inserem os biomarcadores contribuíram com a menor porcentagem na variabilidade total dos dados, ilustrando a pequena participação dessas substâncias nos efeitos atribuídos ao treinamento físico.

Palavras-chave: canino, endocardiose, exercício, coração, peptídeos natriuréticos, troponina I cardíaca

CARDIAC BIOMARKERS IN DOGS WITH DEGENERATIVE MITRAL VALVE DISEASE UNDERGOING A PHYSICAL CONDITIONING PROGRAM

ABSTRACT - As opposed to human medicine, which already uses the exercise as a therapeutic tool in several heart diseases, it is not common sense for small animal practitioners to recommend such treatment for dogs with heart disease owing to an absence of studies. Cardiac biomarkers may be used to monitor response to treatment and physical activity. Therefore, this study had to goal of assessing how these substances perform in dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) undergoing a physical exercise program. For this purpose, 15 dogs were ascribed to three groups (in accordance with the left-atrium-to-aorta ratio). Incremental exercise test was performed to detect the lactate threshold. In the following eight weeks, the animals underwent training exercises based on 70% of the lactate threshold velocity. Echocardiographic parameters and cardiac biomarkers (NT-proANP, NT-proBNP, Cardiac troponin I, CK-MB, LDH I and AST) were evaluated at the starting time (M0), and at 4 (M4) and 8 (M8) weeks after the beginning of the exercise protocol. In the LA/Ao <1.4 group, a significant difference was found in NT-proANP at M8 as compared to M0. No differences were documented for the remaining biomarkers throughout the training. Using multivariate analysis, 8 factors were extracted. Factor 1, which comprises fractional shortening and ejection fraction, represented 17.05% of the data variability, while the factors composed by biomarkers showed lower representativeness. Based on these results, it was concluded that the systematic exercise, at least the way it was performed in this investigation, did not promote changes in the concentrations of both the stretch and myocytes injury biomarkers. In addition, multivariate analysis showed that the factors in which biomarkers were included accounted for the lowest part of the total data variability, indicating the low representativeness of these substances in the effects attributed to physical training.

Keywords: canine, endocardiosis, exercise, heart, natriuretics peptides, cardiac troponin I

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Átrio esquerdo
ALT	Alanina aminotransferase
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AST	Aspartato aminotransferase
Ao	Aorta
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
bpm	Batimentos por minuto
C-ANP	Fragmento C-terminal ativo de peptídeo natriurético atrial
C-BNP	Fragmento C-terminal ativo de peptídeo natriurético tipo B
CK	Creatinoquinase
CK-BB	Isoenzima de CK oriunda de tecido nervoso
CK-MB	Isoenzima de CK oriunda de músculo cardíaco
CK-MM	Isoenzima de CK oriunda de músculo esquelético e cardíaco
cTnC	Troponina C
cTnI	Troponina I
cTnT	Troponina T
DIVE	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
DIVEd	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVEs	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
DMVM	Degeneração mixomatosa da valva mitral
DP	Desvio padrão
E	Velocidade máxima do fluxo mitral
E´	Velocidade máxima do fluxo mitral por Doppler tecidual
E/A	Relação entre as ondas E e A do fluxo mitral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E/E´	Relação entre as ondas E e E´ do fluxo mitral
FC	Frequência cardíaca
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FEC%	Fração de encurtamento
FEJ%	Fração de ejeção
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva

Kg	Quilograma
L	Litro
LAFEQ	Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino
LDH	Lactato desidrogenase
LDH-I	Isoenzima I de LDH
LL	Limiar de lactato
m/s	Metros por segundo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ms	Milissegundos
M0	Avaliação basal antes do início do treinamento
M4	Avaliação quatro semanas após o início do treinamento
M8	Avaliação oito semanas após o início do treinamento
NO	Óxido nítrico
NT-proANP	Fragmento N-terminal inativo de peptídeo natriurético atrial
NT-proBNP	Fragmento N-terminal inativo de peptídeo natriurético tipo B
NR1	N-metil-D-aspartato subtipo 1
PPE	Período de pré ejeção
SID	Uma vez ao dia
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TE	Teste ergométrico
TEVE	Tempo de ejeção ventricular esquerda
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VE	Ventrículo esquerdo
V _{LL}	Velocidade correspondente ao limiar de lactato
VO	Via oral
VO ₂ máx	Volume de oxigênio (O ₂) máximo

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Concentrações plasmáticas de lactato (média e DP) correspondente ao Limiar de Lactato (LL) e velocidade (média e DP) correspondente ao limiar de lactato (V_{LL}) em cães (n=15) submetidos ao teste de esforço inicial (M0) e final, após 8 semanas de treinamento (M8).
Tabela 2	Concentrações plasmáticas de NT-proBNP e NT-pro ANP e séricas de Troponina I cardíaca [mediana (P25-P75)] de cães (n=15) submetidos ao exercício, separados por grupos de acordo com valores da relação AE/Ao, antes da instituição do exercício (M0) e 4 (M4) e 8 (M8) semanas após o treinamento.
Tabela 3	Concentrações séricas de CK-MB, LDH I e AST [mediana (P25-P75)] de cães (n=15) submetidos ao exercício, separados por grupos de acordo com valores da relação AE/Ao, antes da instituição do exercício (M0) e 4 (M4) e 8 (M8) semanas após o treinamento.
Tabela 4	Análise de fatores, segundo critério de Kaiser, com poder discriminatório das variáveis dos fatores considerando-se cargas com valor absoluto acima de 0,5. Os destaques em negrito mostram as variáveis com poder discriminatório.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ilustração esquemática do teste de esforço incremental realizado para obtenção de limiar de lactato em 15 cães com DMVM. UNESP – Jaboticabal (2015).	41
Figura 2	Curva de calibração e respectiva equação de (a) NT-proBNP, (b) NT-proANP e (c) Troponina I cardíaca. UNESP – Jaboticabal (2015).	45
Figura 3	Representação gráfica da curva de lactato plasmático (mmol/L) obtidas após realização de teste de esforço físico incremental inicial (M0) e final (M8) num cão submetido a um programa de treinamento físico de 8 semanas. UNESP – Jaboticabal (2015).	50
Figura 4	Representação gráfica das (a) médias das concentrações plasmáticas de lactato relacionados ao limiar (LL) e (b) médias das velocidades correspondentes ao limiar de lactato em cães (n=15) separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com a realização de teste de esforço inicial e final (M0 e M8 respectivamente).φ: significativamente diferente em relação ao momento M8. UNESP – Jaboticabal (2015).	52
Figura 5	Representação gráfica das medianas dos biomarcadores cardíacos específicos (a) NT-proBNP, (b) NT-proANP e (c) Troponina I cardíaca em cães (n=15), separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com momento antes da instituição do exercício (M0), após 4 e 8 semanas (M4 e M8, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento M8. UNESP – Jaboticabal (2015).	54
Figura 6	Representação gráfica das medianas dos biomarcadores cardíacos inespecíficos (a) CK-MB, (b) LDH-I e (c) AST em cães (n=15), separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com momento antes da instituição do exercício (M0), após 4 e 8 semanas (M4 e M8, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	57

- Figura 7** (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 1, demonstrando a relação entre FEC% (fração de encurtamento) e FEJ% (fração de ejeção); (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados (n=15) com base no fator 1. COCA_G3_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo $AE/Ao > 1,8$. UNESP – Jaboticabal (2015). 61
- Figura 8** (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 2, demonstrando a relação entre E/TRIV (relação entre onda E e tempo de relaxamento isovolumétrico) e TRIV; (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados (n=15) com base no fator 2. PERI_G3_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo $Ae/Ao > 1,8$. UNESP – Jaboticabal (2015). 62
- Figura 9** (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 7, demonstrando a relação entre DIVEd e DIVEs (diâmetro interno de ventrículo esquerdo em sístole e diástole) ; (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados (n=15) com base no fator 7. NOÉ_G1_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo $AE/Ao \ 1,4 - 1,8$. UNESP – Jaboticabal (2015). 63

1. INTRODUÇÃO

A degeneração mixomatosa da valva mitral (DMVM) é a enfermidade relacionada ao sistema cardiovascular mais comum dentre as diversas anormalidades documentadas em cães. Nos últimos tempos, a utilização de biomarcadores cardíacos vem sendo considerada uma importante ferramenta auxiliar para diagnóstico e avaliação da progressão da enfermidade, sendo útil na monitoração de tratamentos em cães com DMVM. Pelo fato da DMVM ser um exemplo de enfermidade crônica cuja progressão do estágio brando ao severo se dá ao longo de anos, as estratégias de tratamento mudam de acordo com sua fase clínica, sendo a restrição ao exercício físico normalmente indicada. Apesar da padronização do tratamento dessa doença, a busca por alternativas de terapias mais eficazes e menos dispendiosas é constante.

Embora o exercício físico no cão desempenhe papel importante como já demonstrado em seres humanos, sua utilização ainda não é senso comum em animais cardiopatas. Portanto, mesmo não sendo alvo das afecções coronarianas isquêmicas, o cão possivelmente será muito favorecido pela atividade física terapêutica. Curiosamente, as investigações científicas envolvendo os efeitos terapêuticos do exercício apenas usufruíram dessa espécie como modelo experimental para as afecções humanas, abrindo, portanto, novas e promissoras fronteiras para terapia e experimentação científica veterinária.

No contexto de pesquisa centrada na espécie canina, o laboratório de cardiologia veterinária da UNESP-Jaboticabal vem, ao longo das últimas décadas, buscando a elucidação dos processos fisiopatológicos e alternativas terapêuticas, fazendo uso de metodologias modernas, as quais se traduzem em dados de elevada credibilidade científica (PEREIRA, 2015; FRANCO, et. al.; 2011; SILVA-FILHO, 2014; CAMACHO, 2013). O exercício físico já foi objetivo de estudos deste grupo de pesquisa, ao avaliar o efeito do treinamento progressivo em esteira rolante, determinado por teste incremental de esforço máximo, sob as funções autonômicas e hemodinâmicas cardíacas de cães saudáveis (PASCON, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Degeneração mixomatosa da valva mitral

A degeneração mixomatosa da valva mitral (DMVM) é a doença cardíaca adquirida mais comum em cães adultos. Também é denominada de endocardiose, doença valvular crônica ou doença degenerativa da valva mitral. Tal enfermidade é de grande importância por apresentar uma alta prevalência na população canina, principalmente em animais idosos. Observa-se maior incidência em cães de pequeno porte, machos, entre a idade adulta e senil (HAGGSTROM et al., 2004; HAGGSTROM et al., 2005; BUCHANAN, 1997).

A etiologia da DMVM permanece parcialmente obscura, embora diferentes mecanismos possam estar envolvidos, como fatores genéticos, dieta, endocardites bacterianas e prolapso valvar (PERDERSEN, 2000; HAGGSTROM et al., 2004). Além disso, o estresse dos folhetos, a degeneração do colágeno e alterações endoteliais estão envolvidos no desenvolvimento dessa afecção valvar (HAGGSTROM et al., 2004; WARE, 2006; MUCHA, 2007). Estudos também já evidenciaram predisposição genética em raças como *Cavalier King Charles Spaniel* e *Dachshund* (WARE, 2006; BORGARELLI et al., 2004; ATKINS; HAGGSTROM, 2012). Pesquisas recentes destacaram o papel das citocinas inflamatórias, serotonina e fator de transformação do crescimento beta, os quais, acredita-se, são importantes contribuintes na fisiopatologia da enfermidade (OYAMA et al., 2006; ARNDT et al., 2009; ZOIS et al., 2012). Arndt et al. (2009), por exemplo, verificou que cães com degeneração valvular naturalmente acometidos e raças predispostas à doença apresentaram maiores concentrações séricas de serotonina do que animais controle.

As lesões iniciam-se nos bordos livres dos folhetos, evoluindo em direção à base, podendo alcançar as cordoalhas tendíneas e músculos papilares (KITTLESON, 1998; BORGARELLI et al., 2004; MUCHA, 2007). Quando os folhetos da valva mitral tornam-se espessados, ocorre falha na oclusão do aparato valvar durante a contração ventricular e nota-se fluxo

retrógrado de sangue dos ventrículos para os átrios. Destarte, a regurgitação valvar promove dilatação atrial, do anel valvar e do ventrículo esquerdo (ABBOT, 2002; WARE, 2006; HAGGSTROM et al., 2004; HAMLIN, 2005).

À medida que a lesão valvar progride, o volume de sangue regurgitante representará uma porção consideravelmente maior do volume de ejeção ventricular esquerdo total. Em decorrência dessa alteração, o débito cardíaco pode ser insuficiente por diminuição do rendimento cardíaco anterógrado, produzindo queda na pressão arterial e ativando os mecanismos compensatórios (ABBOT, 2002; HAGGSTROM et al., 2004; HAMLIN, 2005). Quando o débito cardíaco é insuficiente e a pressão arterial cai, os mecanismos compensatórios, incluindo o sistema nervoso autônomo simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), são ativados e contribuem para a manutenção do débito cardíaco para compensar a deterioração da função cardíaca. No entanto, esses mecanismos provocam efeitos deletérios em longo prazo, como remodelamento ventricular e vascular, e podem desencadear progressão da insuficiência cardíaca (SISSON, 2004; BERNAY et al., 2010; SISSON, 2010).

Inicialmente a ativação do sistema nervoso autônomo simpático resulta na liberação de catecolaminas e, assim, o coração responde aos estímulos inotrópico e cronotrópico acionados, redirecionando o fluxo sanguíneo para os centros vitais. Contudo, em processos crônicos como a insuficiência cardíaca, há evidente elevação da pré-carga, piorando o quadro de congestão venosa (SISSON, 2010). O SRAA é ativado tardiamente a partir do estímulo de receptores β_1 adrenérgicos, diminuição da perfusão renal e pela redução de reabsorção de sódio pelos túbulos renais. Como consequência, ocorre aumento significativo na pré e pós-carga em decorrência da retenção de sódio e água e da vasoconstrição (HAGGSTROM et al., 2004; BERNAY et al., 2010).

Os sinais clínicos iniciam-se geralmente com o remodelamento cardíaco, sendo frequentemente relatados taquipnéia/dispnéia, tosse ou síncope na espécie canina. A tosse é alta e seca, podendo aumentar gradualmente sua frequência. O proprietário pode não notar o gradual declínio da atividade física do paciente (PETRIC, 2015).

Nos últimos anos, numerosos ensaios clínicos, que estudaram uma variedade de medicamentos para terapia e prevenção de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), foram realizados e houve mudança na terapia convencional, dando-se maior ênfase ao bloqueio dos efeitos deletérios da resposta neuro-humoral para redução do débito cardíaco (inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores mineralocorticoides e antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos); à melhora na hemodinâmica (suporte inotrópico) com inodilatadores (pimobendan) e vasodilatadores puros (hidralazina, amlodipina, nitroprussiato de sódio, nitroglicerina); introdução de novos diuréticos (torasemida) e nova modalidade de uso dos diuréticos consagrados (infusão contínua de furosemida) (ATKINS; HAGGSTROM, 2012). Embora menos usual, a correção cirúrgica da válvula mitral constitui uma opção para os animais gravemente enfermos, embora os resultados desse procedimento ainda sejam conflitantes (PETRIC, 2015).

A terapia instituída aos cães afetados visa melhorar a qualidade de vida, com diminuição dos sinais clínicos e aumento no tempo de sobrevivência, pois nenhum tratamento inibe a progressão da doença. Uma vasta gama de opções farmacológicas para o tratamento de DMVM proporciona qualidade de vida razoável e maior expectativa de vida (PETRIC, 2015). Contudo, a busca por alternativas de tratamento mais eficazes e menos dispendiosas é constante (ATKINS; HAGGSTROM, 2012). Atualmente, não se conhece o verdadeiro papel da atividade física na evolução da DMVM, optando-se pelo repouso associado à terapia medicamentosa centrada em diuréticos e vasodilatadores, bem como dieta hipossódica (KANNO et al., 2007; BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010). Em seres humanos, por outro lado, Brum et al. (2004) verificaram que o exercício físico representa uma alternativa extremamente importante no tratamento da insuficiência cardíaca, pois melhora a qualidade de vida do indivíduo com insuficiência cardíaca e corrige a disfunção neurovascular na insuficiência cardíaca.

2.2. Exercício físico como terapia cardiovascular

O exercício físico é amplamente utilizado como ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica na cardiologia humana. Por meio de índices confiáveis obtidos em testes de esforço em esteira ou bicicleta ergométrica, os pacientes são classificados quanto à capacidade cardiovascular e grau de insuficiência cardíaca, o que abre portas para a prescrição terapêutica dessa modalidade (FLETCHER et al., 1990; PIEPOLI et al., 2011; ADAMS; NIEBAUER, 2015).

Já é sabido que a atividade física incorre em uma série de alterações no organismo tanto de humanos quanto de cães. Em pessoas há forte evidência dos efeitos benéficos do exercício em relação à melhora na função endotelial, controle da pressão arterial e da variabilidade da frequência cardíaca, sugerindo que a implementação de atividade física é importante para a população, haja vista seu baixo custo, poucos efeitos colaterais e a gama de benefícios quando comparada à terapia medicamentosa (KITTLESON et al., 1996; FIUZA-LUCES et al., 2013). Segundo Maaik et al. (2007), o treinamento físico é considerado uma terapia complementar importante para os pacientes humanos com ICC que se valem de medicação estável, com efeitos benéficos já documentados em vários níveis funcionais e estruturais. No entanto, o tratamento farmacológico não pode ainda reduzir o desarranjo autonômico e a ativação neuro-humoral nesses pacientes.

As últimas décadas têm experimentado um aumento significativo na expectativa de vida de animais companhia, o que resulta em doenças crônicas semelhantes à população humana, incluindo enfermidades respiratórias, cardiovasculares e locomotoras em cães idosos. Com o avanço no diagnóstico e tratamento dessas condições, o exercício tornou-se um objeto de estudo de vários pesquisadores quanto à sua aplicabilidade na medicina veterinária (KITTLESON et al., 1996; FERRASIN; MARCORA, 2007; CHAUVET et al., 2011; AGUDELO; SCHANILEC, 2013). Já se observa uma série de pesquisas na área de exercício físico e seus efeitos em diversos parâmetros como frequência cardíaca, lactato, glicose,

temperatura retal, entre outros, tanto em cães saudáveis como naqueles portadores de enfermidades cardíacas e obesidade (KITTLESON et al., 1996; ROVIRA et al., 2008; FERRASIN; MARCORA, 2007; FERRASIN; MARCORA, 2009; PICCIONE et al., 2012)

Nos seres humanos saudáveis, diversas formas de atividade física regular já evidenciaram melhoria na qualidade de vida, além de diminuição do risco de morte súbita decorrente de arritmias fatais, infarto do miocárdio por arteriosclerose coronariana, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, obesidade e tromboembolismo. (FLETCHER et al., 1990; SHEPHARD; BALADY, 1999; BUCH et al., 2002). De forma semelhante, pacientes com afecções cardiovasculares também foram beneficiados pelo treinamento físico, vivenciado em diferentes protocolos e triagens clínicas (SULLIVAN et al., 1989; FLETCHER et al., 1990; BALADY et al., 1998; BELARDINELLI et al., 1999; KETHEYIAN; BRAWNER, 1999; IELLAMO et al., 2000; LARSEN et al., 2001; BILLMAN, 2002; HASKELL et al., 2007; PIEPOLI et al., 2011).

Em pacientes humanos com insuficiência cardíaca com redução da fração de ejeção (FEJ%) foram demonstradas melhorias consistentes da função ventricular, com incrementado débito cardíaco, sem piora na FEJ%, uma vez instituídas atividades aeróbias com duração de quatro a seis meses. Também já foi comprovado que o treinamento aeróbio em pacientes com ICC, especialmente aquele cuja duração excede seis meses, pode reverter o remodelamento cardíaco, aumentar a FEJ% e reduzir o diâmetro diastólico final do VE (ventrículo esquerdo). Estudos sugerem que há melhora na função dos cardiomiócitos e na utilização do cálcio intracelular. Outras alterações decorrentes da inclusão do exercício estão relacionadas à homeostase periférica, como otimização da perfusão sanguínea e do metabolismo oxidativo (SULLIVAN et al., 1988; HAYKOWSKY et al., 2007; CONRAADS et al., 2013; PHILLIPS et al., 2015). Ademais, em humanos cardiopatas também se espera melhoria no aporte sanguíneo coronariano, diminuição do consumo de oxigênio pelo miocárdio, atenuação da disfunção miocárdica localizada, mudança da resposta autonômica cardiovascular e incremento do aporte sanguíneo muscular, auxiliando, de modo significativo, no sucesso terapêutico. Soma-se a

isso o fato do aumento da atividade parassimpática ter resultado em menor risco de morte súbita e elevação da sobrevida desses indivíduos (IELAMO et al., 2000; BILLMAN, 2002).

As três principais hipóteses sobre o efeito vagal protetor incluem a diminuição do trabalho cardíaco, atribuída à redução da frequência cardíaca, com subsequente redução do consumo de oxigênio e melhor perfusão miocárdica (BUCH et al., 2002); ação parassimpática direta sobre o nó sinusal e miocárdio, associado à inibição indireta do sistema nervoso autônomo simpático nas vias pré (CASADO et al., 1994) e pós-sinápticas (WATANABE et al., 1978); bem como diminuição da susceptibilidade às arritmias fatais, interferindo, por exemplo, no limiar de fibrilação ventricular (HULL et al., 1994).

O controle do sistema simpático no estado de insuficiência cardíaca congestiva é majoritariamente anormal, haja vista que pacientes apresentam aumento da noradrenalina plasmática e, conseqüentemente, da atividade nervosa simpática. Mecanismos múltiplos e variados estão incluídos na ativação simpática, incluindo depressão dos mecanismos de *feedback* de controles sensoriais e aumento dos reflexos excitatórios, tais como o barorreflexo arterial, reflexos cardíacos, quimiorreflexos arteriais e reflexos aferentes simpáticos cardíacos. Além disso, alterações na sinalização em vias autonômicas centrais têm sido implicadas no processo de estimulação simpática na ICC. Constam desses mecanismos os aumentos na angiotensina II central e do receptor de tipo 1, elevação na tensão de oxigênio reativo, regulação positiva na sinalização glutamato e NR1 (N-metil-D-aspartato subtipo 1) e outros receptores. Além disso, o treinamento físico evidenciou capacidade de reduzir a atividade simpática promovendo aumento da sobrevida e redução dos eventos cardíacos (HAACK; ZUCKER, 2014).

Atualmente, sabe-se que o treinamento em pacientes com ICC desencadeia diminuição das concentrações de angiotensina I, II, renina e aldosterona e das catecolaminas e peptídeo natriurético atrial (LIJNEM et al., 1986; HESPEL et al., 1988, COATS et al., 1992; BRAITH et al., 1999; BRITH; EDWARDS, 2003; HAACK, ZUCKER, 2014), assim como aumento da quantidade e atividade de óxido nítrico (NO) nos endotélios. Essa substância,

por sua vez, é sabidamente causadora de vasodilatação, com redução da resistência periférica e aumento na perfusão, intensificação da resposta neuronal parassimpática e, conseqüentemente, inibição da simpática, pelas vias central e periférica (CONLON; KIDD, 1999; MARKOS et al., 2001). Ademais, reduz o estresse oxidativo em decorrência da menor expressão de subunidades de NADPH-oxidase (HAACK; ZUCKER, 2014). Embora ainda seja foco de muitas pesquisas, os efeitos do NO não são totalmente compreendidos, sendo estudados a função endotelial, regeneração, microRNA e apoptose (COSTA; BIAGGIONI, 1994; SESSA et al., 1994; KINGWELL, 2000; PARKES; MAY, 2000; DIMMELER; ZEIHNER, 2003; BAUER et al., 2005; FORNI; SCHONER, 2005; ZAGO; ZANESCO, 2006; ADAM; NIEBAUER, 2015). Segundo Haack e Zucker (2014), o treinamento físico acarreta efeitos consideráveis na geração central de óxido nítrico e óxido nítrico sintase em áreas simpato-reguladoras do cérebro.

Maaik et al. (2007), revisando 23 estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico no desequilíbrio autonômico e ativação neurohormonal na insuficiência cardíaca crônica, em 849 pacientes humanos, concluíram que o treinamento físico aumenta a sensibilidade do barorreflexo, a variabilidade da frequência cardíaca, e reduz o fluxo simpático, os níveis plasmáticos de catecolaminas, angiotensina II, vasopressina e o peptídeo natriurético tipo B em repouso. O treinamento também já comprovou sua eficácia na redução da pré e pós-cargas, reforçando a possibilidade de utilização dessa terapia em cães com ICC. Contudo, assim como na terapia farmacológica, a correta prescrição da atividade física deve ser ponderada quanto à intensidade, tipo, frequência, duração e possíveis efeitos indesejáveis (FLETCHER et al., 1990; BALADY et al., 1998; SHEPHARD; BALADY, 1999).

No que concerne ao músculo esquelético, com a progressão da insuficiência cardíaca e a ativação de mecanismos compensatórios cronicamente, sabe-se que tais alterações causam hipoperfusão e hipóxia tecidual, o que resulta em adaptações estruturais, metabólicas e funcionais progressivas na musculatura periférica, incluindo atrofia, desuso e perda de massa. Com o exercício, é possível reverter esse quadro na musculatura

esquelética, minimizando sinais como intolerância ao exercício (PHILLIPS et al., 2015). Assim, conclui-se que tanto o coração, músculos esqueléticos e função vascular estão envolvidos na progressão da ICC e na modulação pela atividade física.

Devido aos benefícios da utilização do exercício, em seres humanos hígidos, as diretrizes das Sociedades de Cardiologia, em sua maioria, indicam o exercício com o intuito de prevenir doenças cardiovasculares, recomendando ao menos 30 minutos de atividade aeróbica moderada a intensa por três a sete dias semanalmente (HASKELL et al., 2007; PIEPOLI et al., 2011; FLETCHER et al., 2013). Já em seres humanos cardiopatas, a Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda prescrição de atividade física com intensidade leve a moderada, correspondente a 60-80% do pico de $\dot{V}O_{2max}$ obtida pelo teste de esforço prévio, no mínimo três vezes por semana, com duração de 20 a 40 minutos. O tipo de exercício e a monitorização dependerão da enfermidade envolvida e da capacidade funcional pré-determinada, sendo o acompanhamento dos pacientes fundamental para o sucesso terapêutico (PIEPOLI et al., 2011).

De acordo com as diretrizes das Sociedades Brasileiras de Cardiologia e de Medicina do Esporte (2013), em grupos portadores de doença arterial coronariana, a melhor maneira de se mensurar a intensidade física do exercício é por meio da frequência cardíaca (FC), determinada por teste ergométrico (TE) máximo. A FC de treinamento deve se situar entre 70 e 85% da FC máxima obtida no TE, ou pela FC correspondente entre o limiar anaeróbico e o ponto de compensação respiratória, avaliados pela ergoespirometria.

Pascon et al. (2009), ao estudar um protocolo de quatro semanas de treinamento em cães saudáveis, empregando, respectivamente, 50%, 60%, 70% e 80% da frequência cardíaca máxima obtida em teste de esforço prévio, concluiu que o exercício físico propicia maior ativação parassimpática, documentada por meio da variabilidade da frequência cardíaca. Ademais, evidenciou, pela análise ecocardiográfica, melhoria na função diastólica. Assim, ressaltou a importância de estudar a aplicabilidade do teste progressivo e padronização do treinamento em cães cardiopatas e sua utilidade como terapia

cardiovascular em tal espécie. Em um estudo piloto em cães com insuficiência cardíaca, Ferrasin e Marcona (2007), constataram ser viável o teste de exercício submáximo em esteira para medir a capacidade de atividade física e fornecer informações úteis para avaliação da resposta individual aos medicamentos empregados. Entre todos os parâmetros mensurados, lactato e frequência cardíaca refletiram níveis individuais de tolerância ao exercício e devem ser investigados no desenvolvimento e validação de um teste de exercício confiável e facilmente reproduzível em cães com insuficiência cardíaca. Além disso, valores de troponina I nesses pacientes podem fornecer evidências de lesão miocárdica subclínica induzida pelo exercício.

Embora o exercício físico no cão possa vir a contribuir de maneira importante como observado em seres humanos, sua utilização ainda é ignorada como parte da estratégia terapêutica das cardiopatias. Dessa maneira, antes da instituição de um protocolo de treinamento em cães, é necessária a realização de um teste de esforço máximo, ou submáximo, e o controle de alguns parâmetros para avaliação adequada de cada animal. Ademais, o teste de esforço, quando adequado, é facilmente replicado e permite comparar o progresso dos animais em resposta ao treinamento ou intervenção terapêutica. A realização do teste e do treinamento na esteira é indicada, pois possibilita que o controle da intensidade do exercício e das condições ambientais seja realizado corretamente, facilitando sua padronização (FERRASIN; MARCORA, 2009).

2.3. Biomarcadores

Um biomarcador é uma substância produzida por um tecido específico que pode ser detectada na circulação. Para ter utilidade do ponto de vista clínico, deve ser liberado em uma quantidade proporcional à evolução da enfermidade, de modo a indicar sua presença, severidade e prognóstico, sendo desejáveis, ainda, altas sensibilidade e especificidade. O biomarcador ideal é aquele que se mantém estável, de fácil detecção, apresenta baixo custo e é de execução rápida (REYNOLDS; OYAMA, 2008; ETTINGER; PROSEK, 2010).

Atualmente, os biomarcadores cardíacos como meio de diagnóstico e prognóstico são alvos de pesquisas na Medicina Veterinária. Diversos estudos indicam que sua utilização é valiosa na identificação de doenças cardíacas assintomáticas, insuficiência cardíaca, na monitorização de pacientes e na determinação do prognóstico (BOSWOOD, 2007; REYNOLDS; OYAMA, 2008; MACDONALD, 2010; RIBEIRO, 2010; ERIKSSON et al., 2014). Tais substâncias podem ser úteis em diversas situações, como na distinção entre causas cardíacas e não cardíacas de dispneia e tosse; lesão miocárdica associada à doença cardíaca isquêmica; trauma torácico; miocardite; uso de fármacos cardiotoxicos ou, ainda, no diagnóstico de doença cardíaca assintomática ou minimamente sintomática, permitindo uma intervenção terapêutica mais precoce (ETTINGER; PROSEK, 2010; ERIKSSON et al., 2014).

Na Medicina Veterinária, os biomarcadores cardíacos dividem-se essencialmente em dois grupos, os que indicam lesão das células miocárdicas, liberados quando há ruptura de miócitos, e os de estresse miocárdico, liberados quando ocorre estiramento do tecido muscular cardíaco (BOSWOOD, 2007; RIBEIRO, 2010).

2.3.1. Peptídeos natriuréticos

Os peptídeos natriuréticos pertencem a uma classe de hormônios estruturalmente semelhantes, que funcionam como reguladores da homeostase do volume intravascular e no controle da pressão sistêmica. Tais efeitos decorrem da natriurese, com ação direta nos túbulos renais, além de aumento na taxa de filtração glomerular, vasodilatação e supressão da liberação de norepinefrina (OYAMA, 2013; ETTINGE; PROSEK, 2010). Atualmente são considerados importantes dentro de um contexto clínico os peptídeos natriuréticos atrial (ANP) e tipo B (BNP), produzidos pelos cardiomiócitos atriais e ventriculares, respectivamente, em resposta ao estiramento miocárdico após aumento do volume intravascular ou sobrecarga de pressão. O BNP é encontrado em todo tecido miocárdico, mas principalmente em ventrículos (PROSEK et al., 2007). De acordo com DeAlmeida (2012), a liberação de ANP

é considerada como um mecanismo de proteção contra a sobrecarga de volume ventricular, pois além da liberação atrial, também é produzido em pequenas quantidades pelos ventrículos.

Os dois peptídeos são liberados como moléculas precursoras e as proteases séricas irão degradar essas moléculas para formar quantidades iguais de fragmentos C-terminais ativos (C-ANP e C-BNP) e fragmentos N-terminais inativos (NT-proANP e NT-proBNP). Os C-ANP e C-BNP possuem uma meia-vida muito curta e sua quantificação no sangue pode ser difícil. Já NT-proANP e NT-proBNP apresentam meia-vida maior, mantendo-se estáveis durante a manipulação e coleta das amostras, possibilitando que a determinação de valor seja mais acessível na rotina clínica (REYNOLDS; OYAMA et al., 2008; ETTINGER; PROSEK, 2010).

Além da produção em situações de estiramento do miocárdio, o BNP também pode ser produzido em resposta à isquemia e hipóxia (GOETZE et al., 2004) e, ademais, sua concentração plasmática aumenta na disfunção diastólica, como cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia restritiva, assim como nas associadas com insuficiência do ventrículo direito, como hipertensão pulmonar primária, *cor pulmonale* e embolia pulmonar (MATTOS, 2006; HZU et al., 2009; RIBEIRO, 2010). Resultados de pesquisas sugerem que a determinação do NT-proBNP contribui para o diagnóstico da DMVM em cães (EBISAWA et al., 2012). Em outro estudo, Serres et al. (2009) mostraram ser possível estratificar a severidade da DMVM em cães sintomáticos a partir dos valores de NT-proBNP, bem como determinar o prognóstico nesses animais. Reynolds et al. (2012) verificaram que a avaliação ecocardiográfica do átrio esquerdo e a mensuração de NT-proBNP foram os parâmetros mais correlacionados à ICC, de modo que esse biomarcador parece útil na determinação do início dos sinais clínicos atribuídos à ICC.

De modo semelhante, Ebisawa et al. (2013) evidenciaram que os valores plasmáticos de ANP podem ser empregados para o diagnóstico precoce e determinação da severidade da DMVM em cães, inclusive em cães assintomáticos. De acordo com Eriksson et al. (2014), valores aumentados de NT-proANP, particularmente acima de 1000 pmol/L, sugerem aumento no risco

para insuficiência cardíaca congestiva em cães da raça *Cavalier King Charles Spaniel* com DMVM. Destarte, avaliações pontuais ou seriadas desse biomarcador seriam úteis tanto no diagnóstico quanto no prognóstico de cães em estágios tardios da DMVM.

A avaliação de treinamento padronizado juntamente com o comportamento de biomarcadores cardíacos em humanos com ICC é pouco pesquisado. Em um estudo que avaliou 928 pacientes com insuficiência cardíaca com redução na fração de ejeção, antes e após 3 meses de atividade física controlada, Ahmad et al. (2014) concluiu que o treinamento físico instituído não promoveu mudanças significativas nos biomarcadores de estresse e lesão do miocárdio. Houve, contudo, associação entre NT-proBNP e redução de eventos clínicos. Ikeda et al. (2007) também documentaram que o NT-proANP é um parâmetro útil como guia na prescrição de atividade física focada na reabilitação cardíaca em seres humanos que apresentaram infarto do miocárdio. Ademais, sabe-se que a liberação de ANP induzido pelo exercício em pacientes com ICC apresenta correlação com a diminuição da mortalidade cardiovascular (DEALMEIDA et al., 2012). Em animais, um estudo em equinos hígidos e com regurgitação mitral quantificou ANP antes e imediatamente após exercício e documentou valores aumentados na finalização da atividade física dos animais com regurgitação comparativamente aos saudáveis (TRACHSEL et al., 2013). A influência da atividade física sobre o comportamento dos biomarcadores cardíacos em cães cardiopatas aparentemente nunca foi pesquisada.

2.3.2. Troponinas cardíacas

O complexo troponina é composto por três subunidades (cTnI, cTnT e cTnC), que ajudam na regulação do acoplamento excitação-contração das proteínas dos sarcômeros. Tratam-se de substâncias muito utilizadas como marcadores de lesão miocárdica, pois evidenciam morte celular ou perda da integridade da membrana. A subunidade cTnI, ou Troponina I cardíaca (componente inibidor que impede a interação entre actina e miosina),

especificamente, é um indicador muito sensível e específico de dano celular miocárdio e necrose (OYAMA; SISSON, 2004; OYAMA, 2013).

Cardiopatias que evoluem para insuficiência cardíaca congestiva causam hipóxia-isquemia do músculo cardíaco e, conseqüentemente, induzem a liberação de cTnI na circulação. Ademais, além de detectar o dano miocárdico, a cTnI pode ser utilizada para monitorá-lo cronicamente, servindo como parâmetro prognóstico (OYAMA; SISSON, 2004; FONFARA et al., 2010; HEZZELL et al., 2012; OYAMA, 2013). Em animais com DMVM, pesquisas concluíram que a concentração de troponina I cardíaca encontra-se elevada quando comparada a animais hígidos. Além disso, os valores de cTnI aumentam de acordo com a severidade da DMVM, o que indica dano ao miocárdio no decorrer do processo de remodelamento do coração. Assim, a troponina I cardíaca é um biomarcador útil na detecção de lesão cardíaca em cães com doença valvar e no prognóstico desses animais (BAKIREL; GUNES, 2009; LJUNGVALL et al., 2010; HEZZEL et al., 2012).

Em cavalos submetidos a provas de enduro, verificou-se aumento na concentração de troponina I cardíaca comparado aos valores basais, sugerindo lesão miocárdica (HOLBROOK et al., 2006). De modo semelhante, níveis elevados de troponina após atividades extremas de enduro (maratonas) podem refletir dano miocárdico em atletas saudáveis, assim como CK-MB (OKEEFE et al., 2012).

2.3.3. Creatinoquinase (CK)

A creatinoquinase, também denominada creatina fosfocinase, é uma enzima presente em músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso, cérebro e nervos. A CK é considerada enzima de extravasamento específica de músculo, embora exista em outros órgãos. É encontrada livre no citoplasma das células musculares que, lesadas, a deixam extravasar. Em animais foram encontradas três tipos de isoenzimas de CK, denominadas CK BB (oriunda do tecido nervoso), CK MB (origem principalmente de músculo cardíaco), CK MM (músculo esquelético e cardíaco) (LASSEN, 2006).

A CK-MB foi considerada, por muito tempo, como detentora de grande especificidade no tocante à lesão celular miocárdica em seres humanos. Entretanto, dentre os biomarcadores cardíacos, a CK-MB circulante não é 100% específica para lesão das células miocárdicas, pois, a despeito de sua origem ser principalmente o tecido cardíaco (1-42%), é encontrada também nos pulmões, intestino, rins e musculatura esquelética. Além disso, sua liberação ocorre após lesão aguda do miocárdio e sua inativação é rápida (SCHOBER, 2005; YONEWAZA et al., 2009). Ademais, a magnitude do aumento sérico dessa enzima não necessariamente se correlaciona com a extensão da lesão do músculo cardíaco. Ainda assim, estudos já indicam sua mensuração quando da suspeita de lesão miocárdica em cães, como método auxiliar de diagnóstico e prognóstico (LASSEN, 2006; BAKIREL; GUNES, 2009; CAMPLES et al., 2009; CARRETON et al., 2013).

Bakirel e Gunes (2009) avaliaram o comportamento de CK-MB em cães com DMVM e evidenciaram um aumento significativo em seus valores quando comparado a animais saudáveis, de modo que esse biomarcador pode ser utilizado como parâmetro na detecção de lesão cardíaca e prognóstico nessa enfermidade.

2.3.4. Lactato desidrogenase (LDH)

LDH é a enzima que catalisa a conversão de lactato para piruvato. É encontrada em vários tipos de tecidos (fígado, músculo esquelético, miocárdio, rim e eritócitos) e por isso não é considerada específica como biomarcador cardíaco. É um dos parâmetros utilizados para avaliação de dano muscular em equinos atletas e em humanos para lesão miocárdica. Na medicina humana, a mensuração de LDH foi utilizada juntamente com AST e CK como exames direcionados para detecção de infarto do miocárdio. Porém, o aumento da concentração sérica da mesma constitui achado inespecífico e pode ocorrer por hemólise, exercício, doença hepática, dano muscular e neoplasia (BALARIN et al., 2005; LASSEN, 2006; THOMASSIAN et al., 2007; ALDOUS, 2013).

É possível obter informações de maior significado clínico pela separação da LDH em suas cinco frações isoenzimáticas. Contudo, nos animais domésticos, a mensuração de isoenzimas não é realizada rotineiramente e, por isso, a utilização desse marcador deve ser realizada em conjunto com outros exames. Embora os valores de referência dessa substância, em cães e gatos, estejam publicados, tal análise não é recomendada para o diagnóstico de alterações miocárdicas em cães e gatos, por existirem outros marcadores de lesão celular miocárdica mais específicos (SCHOBER, 2005).

Numa pesquisa com o objetivo de avaliar os valores de LDH em 55 cães com diagnóstico de DMVM comparando-os com 10 cães saudáveis, concluíram que esse marcador encontrou-se elevado no grupo enfermo. Assim, a LDH foi considerada como um biomarcador com utilidade na detecção de lesão de miócitos e no estabelecimento do prognóstico em cães com DMVM (BAKIREL; GUNES, 2009).

2.3.5. Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST é encontrada em maior concentração nos hepatócitos e nas células dos músculos esqueléticos e cardíaco, tanto no citoplasma quanto nas organelas dessas células. Quando é detectada elevação da AST sérica, sugere-se dano a hepatócitos e/ou miócitos. No tocante à lesão miocárdica, recomenda-se sua interpretação conjuntamente à CK-MB e troponina para melhor avaliação (LASSEN, 2006; ALDOUS, 2013).

Em seres humanos com infarto agudo do miocárdio, já foi observado o aumento na concentração de AST, sendo tal substância considerada o primeiro biomarcador cardíaco utilizado na clínica como exame auxiliar. Por não ser específica de lesão miocárdica, a abordagem médica vem recomendando priorizar biomarcadores como troponina, mais atuais e específicos para miocárdio (ALDOUS, 2013).

Goutal et al. (2010) avaliaram a concentração de AST em 90 cães com insuficiência cardíaca congestiva, sendo 54 deles portadores de DMVM. Foi constatado aumento significativo no valor de AST nesses cães, o qual foi atribuído à congestão passiva ou ao baixo débito cardíaco desencadeado pela síndrome em tela.

3. HIPÓTESE

Considerando que a degeneração mixomatosa valvar é a afecção cardiovascular mais frequente em cães, responsável por até 75% da casuística dos cardiopatas (HAGGSTROM et al., 2004) e que 40% da população canina geriátrica (MUCHA, 2007) supostamente apresenta essa condição, a instituição da atividade física, como parte da estratégia terapêutica em pacientes caninos, poderia ser benéfica, conforme já demonstrado em seres humanos. Assim, espera-se que a minimização da progressão ou a estabilização da doença valvar mitral em face do exercício físico influencie as concentrações dos biomarcadores cardíacos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os biomarcadores cardíacos em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral em diferentes fases evolutivas submetidos ao exercício físico.

4.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração dos biomarcadores cardíacos específicos (NT-proANP, NT-proBNP, cTnI) e inespecíficos (CK-MB, LDH-I e AST) em cães com DMVM em diferentes estágios submetidos a um protocolo de condicionamento sistematizado.

Verificar se ocorre lesão miocárdica induzida pelo condicionamento físico instituído através da análise de biomarcadores de lesão de células miocárdicas (cTnI, CK-MB, LDH-I e AST) .

Correlacionar os valores das concentrações dos biomarcadores cardíacos específicos e inespecíficos com os índices ecocardiográficos estudados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de realização da pesquisa

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cardiologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ), ambos localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, SP.

5.2. Animais

Foram utilizados 15 cães adultos, 11 machos e 4 fêmeas (2 castradas) da raça *Beagle*, com idade entre 5 a 12 anos e peso variando entre 11 a 14, 2 kg. Todos animais possuíam diagnóstico prévio de degeneração mixomatosa da valva mitral, baseado em exame ecocardiográfico. Os animais pertenciam ao canil do Laboratório de Nutrição e Doenças Nutricionais da FCAV da UNESP, campus de Jaboticabal, SP. Uma vez selecionados, os cães foram alocados em três grupos, segundo classificação proposta por Ljungvall et al. (2011), a saber:

- Grupo AE/Ao < 1,4: cães com relação átrio esquerdo/aorta inferior a 1,4 (n=5)
- Grupo AE/Ao 1,4 – 1,8: cães com relação átrio esquerdo/aorta entre 1,4 e 1,8 (n=5);
- Grupo AE/Ao > 1,8: cães com relação átrio esquerdo/ aorta superior a 1,8 (n=5).

Previamente à inclusão no estudo, todos os animais passaram por exame físico completo, seguido de avaliação laboratorial composta por perfil hematológico, urinálise e bioquímica sérica (creatinina, uréia, ALT, fosfatase alcalina, albumina e proteína total) e urinária (relação proteína:creatinina),

buscando descartar outras enfermidades que pudessem influenciar os resultados. Dos cães incluídos no grupo AE/Ao>1,8, três animais já faziam uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (enalapril: 0,5 mg/kg, VO, SID).

Os animais foram mantidos em canil coletivo, com no máximo três animais, em local climatizado, recebendo água *ad libitum* e dieta exclusivamente à base de ração (Sabor e Vida Carne e Fígado Cães Adultos, Guabi[®]), calculada pelo Laboratório de Nutrição Animal, em consonância com sua demanda energética individual. Os animais tinham acesso periódico à área coletiva de lazer dos canis.

5.3. Teste de esforço incremental

5.3.1. Adaptação dos cães

Durante dez dias consecutivos, os cães foram adaptados ao local de realização do teste de esforço e treinamento com o objetivo de condicionamento a movimentação na esteira. No primeiro dia, os animais foram incentivados a subir na esteira rolante motorizada (Gallop[®] 5500, Sahinnco, Brasil) desligada com a utilização de coleira peitoral adaptada à esteira, recebendo reforço positivo (petisco Crek, Faro[®]) como recompensa. A esteira foi acionada apenas a partir do segundo dia, já com animal posicionado sobre a mesma, em velocidade inicial de 1,5m/s, sem inclinação, forçando a movimentação do cão, atraído por membros da equipe. Dessa maneira os animais se acostumaram com a movimentação na esteira durante esse período inicial para, posteriormente, permitir a realização do teste de esforço incremental e treinamento de modo seguro e eficaz.

5.3.2. Protocolo do teste incremental

Os testes foram realizados no período da manhã, em sala climatizada a 20°C e umidade relativa do ar mantida entre 50 e 60%. Todos os cães foram

submetidos a jejum alimentar de uma hora, mas permaneceram com acesso livre à água.

O teste de esforço incremental foi realizado para que se estabelecesse o limiar de lactato (LL). Realizou-se o teste em todos os cães deste ensaio antes e após o treinamento de oito semanas. No primeiro momento, o teste foi realizado para determinar a capacidade funcional dos cães e, destarte, instituir individualmente o programa de treinamento. Ao final do período de treinamento, os cães foram submetidos novamente ao teste de esforço progressivo, visando comparar os resultados com aqueles obtidos no momento inicial.

Uma vez adaptados à esteira, o teste incremental teve início com cães colocados sobre a esteira, sem inclinação e velocidade inicial de 1,5 m/s para aquecimento. Posteriormente, a esteira foi posicionada em aclave de 5%, agregando-se força ao teste. Em cada etapa, que se estendeu por 7 minutos, sendo 5 minutos de atividade física e 2 minutos com a esteira parada, incrementou-se a velocidade em 0,5 m/s progressivamente, até que fosse constatada exaustão física. Transcorridos 90 segundos da parada da esteira, coletou-se uma amostra sanguínea e, em 30 segundos, nova etapa foi iniciada. Esse protocolo permitiu a construção da curva exponencial desejada para obtenção do LL . A figura 1 traz a ilustração esquemática do protocolo de teste de esforço incremental empregada em todos os animais deste experimento.

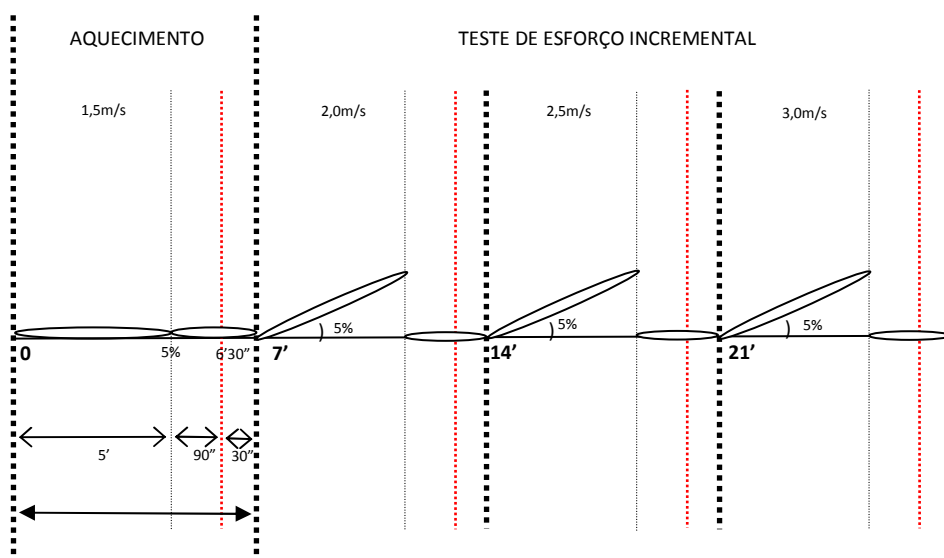


Figura1. Ilustração esquemática do teste de esforço incremental realizado para obtenção de limiar de lactato em 15 cães com DMVM.

5.3.3 Amostra sanguínea

Antes da coleta de sangue foi realizada tricotomia da área sobre a veia jugular esquerda, sobre a qual foi aplicada pomada de pilocarpina e lidocaína (EMLA[®], Astra Zeneca, Brasil) para minimizar o estímulo doloroso. Ato contínuo, um cateter calibre 16 (InsyteTM, Becton Dickinson and Company Belliver Industrial Estate, Reino Unido) para acesso venoso central, de lúmen único, foi introduzido, sendo então fixado com fio Nylon 3-0 em ponto simples (Shalon[®] suturas, Shalon fios cirúrgicos Ltda. Brasil), possibilitando a coleta de amostra sanguínea nos momentos descritos. Solução de heparina, na proporção de um mililitro de heparina sódica (Hemofol[®], Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) para cada litro de solução NaCl 0,9% (Bolsa Flexível Sapp-Flex[®], Laboratório Sanobiol Ltda. Brasil), foi aplicada na quantidade de 0,5 mL para que se mantivesse viável o acesso venoso.

Em cada etapa, transcorridos 90 segundos da parada da esteira, foram coletados dois mililitros de sangue para dosagem de lactato plasmático. No entanto, antes de cada coleta, aproximadamente um mililitro de sangue foi descartado, buscando evitar a diluição da amostra. As amostras obtidas foram depositadas em tubos fluoretados (BD Vacutainer[®] Fluoreto/EDTA, Becton Dickinson and Company Belliver Industrial Estate, Reino Unido), sendo subsequentemente centrifugadas. A concentração de lactato plasmático foi então determinada, valendo-se de equipamento eletro-enzimático (YSI 2300, Yellow Springs Instrument, EUA).

5.3.4 Limiar de lactato

O limiar de lactato foi identificado pela análise visual da curva de lactato sanguíneo *versus* velocidade, obtido no teste de esforço incremental, a partir da observação de três avaliadores. Assim, determinou-se a intensidade em que as concentrações de lactato apresentaram aumento abrupto e exponencial (FERRAZ et al., 2008).

5.4. Programa de treinamento

As oito semanas consecutivas de treinamento foram realizadas com base em 70% da velocidade relacionada ao LL obtido previamente. As velocidades estabelecidas foram calculadas a partir da velocidade correspondente ao limiar de lactato, tomada como 100%.

O programa de treinamento físico foi realizado três dias na semana, perdurando por 30 minutos, sendo os cinco minutos iniciais e finais, correspondentes a 50% da velocidade programada, empregados como aquecimento e desaquecimento.

5.5. Biomarcadores Cardíacos

5.5.1 Biomarcadores específicos

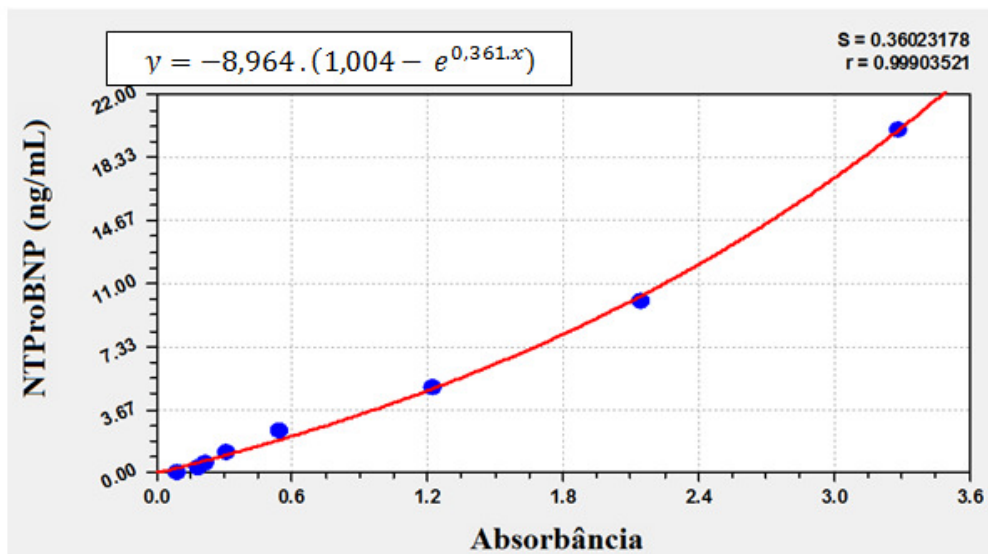
Em cada momento de avaliação foi coletada uma amostra de sangue para sinérese e obtenção de soro, bem como do plasma, para quantificação dos biomarcadores cardíacos específicos. Duas alíquotas foram separadas para cada amostra, as quais foram congeladas a -80°C para análise posterior. Para determinação da fração N-terminal dos peptídeos natriuréticos atrial (NTproANP) e tipo B (NT-proBNP) empregou-se o plasma reservado, sendo o processamento realizado pelo método Elisa direto, empregando-se os *kits* de código CSB-EQ027254DO (Cusabio, Wuhan, China) e CSB-E17577c, (Cusabio, Wuhan, China), específicos para espécie canina, com leitura das amostras em filtros de 550 e 450nm. A mensuração da concentração sérica da troponina I cardíaca também foi realizada pelo método Elisa, empregando-se o *kit* de código CSB-E08772C, específico para espécie canina (Cusabio, Wuhan, China), com leitura das amostras em filtros de 550 e 450 nm.

As amostras foram dosadas no laboratório de Imunologia e Virologia da FCAV-UNESP, campus Jaboticabal, SP. A leitura do comprimento de onda no filtro de 550 nm foi subtraída da leitura obtida no filtro de 450 nm conforme

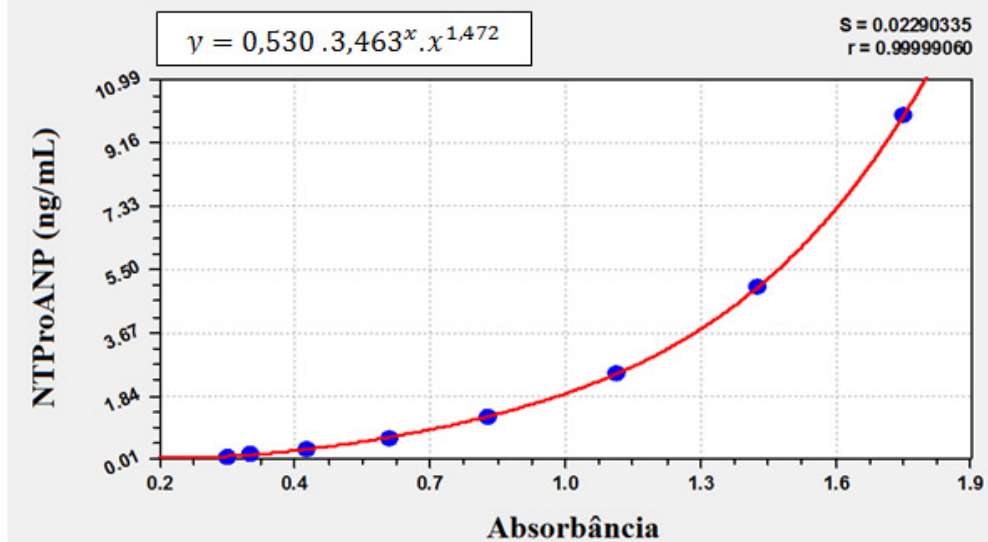
instrução do fabricante para os três biomarcadores para correção de possíveis imperfeições ópticas nas placas avaliadas.

A faixa de detecção de NT-proANP e NT-proBNP informada pelo fabricante foi de 0,312 ng/mL a 20 ng/mL, enquanto a faixa correspondente para troponina cardíaca I foi de 23,5 pg/mL a 1500 pg/mL. O valor mínimo detectável de NT-proANP e NT-proBNP é geralmente inferior a 0,078ng/mL e o valor correspondente à cTn-I é de 5,8 pg/mL. Foram realizadas as curvas de calibração para cada um desses biomarcadores conforme instruções do fornecedor dos kits. A seguir os gráficos e as respectivas equações com seus coeficientes utilizados na conversão dos valores das absorbâncias obtidas em concentrações:

(a)



(b)



(c)

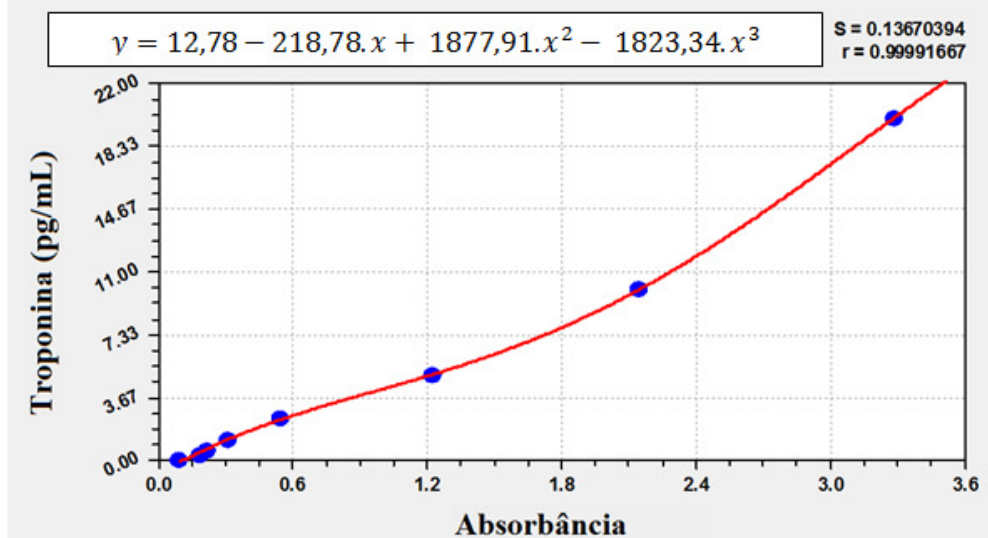


Figura 2. Curva de calibração e respectiva equação de (a) NT-proBNP, (b) NT-proANP e (c) Troponina I cardíaca. UNESP – Jaboticabal (2015).

5.5.2 Biomarcadores inespecíficos

Além dos biomarcadores cardíacos específicos, também foram quantificados os biomarcadores inespecíficos, incluindo aspartatoaminotransferase (AST), desidrogenase láctica (LDH-I) e creatina fosfoquinase fração MB (CK-MB), empregando-se, respectivamente, os *kits* de código CAT.109-4, CAT.86/2 e CAT.118-2 (Labtest Diagnóstico, Brasil). As amostras séricas foram processadas no Laboratório de Patologia Clínica da FCAV- UNESP, campus de Jaboticabal, SP. Os *kits* utilizados são baseados na metodologia de espectrofotometria.

5.6. Ecocardiografia

Para realização da ecocardiografia convencional foi empregado aparelho (Acuson X300 Premium, Siemens, EUA) dotado de transdutor multifrequencial de 5,0-7,5 MHz. O posicionamento dos pacientes, a formação de imagem ecocardiográficas e obtenção dos índices foram realizados de acordo com orientações de BOON (2011), sendo avaliados os seguintes parâmetros:

1. Avaliação morfológica: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole.
2. Índices de função sistólica: fração de encurtamento, fração de ejeção (obtida pelo método de Teichholz), tempo de ejeção ventricular esquerda, tempo de pré-ejeção ventricular esquerda;
3. Índices de função diastólica: tempo de relaxamento isovolumétrico, relação entre as ondas E e A do fluxo mitral; relação entre o pico da onda E e o tempo de relaxamento isovolumétrico;
4. Ecocardiografia doppler tecidual: relação entre ondas E e E´septal e lateral;

5.7. Momentos de avaliação

Uma vez selecionados, os animais foram avaliados segundo o cronograma a seguir. Em cada momento de avaliação foram realizados ecocardiografia e coleta de amostra sanguínea para dosagem de biomarcadores cardíacos específicos e inespecíficos.

- M0: avaliação basal antes do início do treinamento;
- M4: quatro semanas após o início do treinamento;
- M8: oito semanas após o início do treinamento;

5.8. Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros estudados foram comparados entre os momentos de avaliação M0, M4 e M8. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Tukey quando os dados apresentaram distribuição paramétrica ou teste de Friedman e posterior teste de Dunn quando a distribuição apresentada foi não paramétrica, determinada pelo teste de normalidade dos resíduos Shapiro-Wilk. Para a análise entre grupos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio GraphPadPrism® (versão 6, GraphPad Software, 2014), sempre com nível de significância de 5%

Além da análise univariada, os dados também foram estudados em um modelo multivariado, valendo-se do programa Statistic (versão 7, Stat Software, 2008). Dentre as diversas técnicas disponíveis para a extração de fatores, utilizou-se a extração por componentes principais, calculado a partir da matriz de correlação entre variáveis, sendo considerados autovalores maiores que um (>1) para obtenção do número fatores, segundo o critério de Kaiser. O primeiro fator (F1) extraído dessa matriz é a combinação linear das variáveis originais, que representa o máximo de variabilidade possível contida nas amostras. O segundo fator (F2) é a segunda combinação linear das variáveis originais, que responde pela maior parte da variabilidade restante, e assim por diante. Os

fatores são independentes entre si, não têm unidades e são variáveis padronizadas. Os coeficientes das funções lineares que definem os fatores são usados para interpretar o seu significado, utilizando o sinal e o valor relativo dos coeficientes como uma indicação do peso a ser atribuído a cada variável. Para melhor interpretação, os fatores foram rotacionados pelo método Varimax. As cargas dos fatores são as correlações entre cada variável e o respectivo fator. O poder discriminatório das variáveis nos fatores foi medido considerando-se cargas com valor absoluto acima de 0,5. Em segundo lugar, foi feita análise de componentes principais de cada fator, determinado previamente pela análise de fatores, obtendo-se o gráfico das variáveis de cada fator e a distribuição dos casos (cães) por efeito dessas variáveis.

6. RESULTADOS

6.1. Adaptação à esteira

O período de adaptação foi de extrema valia para condicionar o animal à esteira, ao novo ambiente e aos treinadores, sendo a utilização de petiscos como reforço positivo um importante instrumento para esse fim. Nos primeiros dias foi necessário que uma pessoa se mantivesse junto aos animais para a movimentação na esteira e, decorridos três dias, os cães andavam sozinhos somente com a necessidade de uma coleira peitoral adaptada, permitindo alterações na angulação da esteira. Somente um animal não se adaptou à esteira, evidenciando relutância em se movimentar, tornando-se necessária sua exclusão.

6.2. Teste de esforço incremental

O teste de esforço proposto foi passível de execução e repetição com a necessidade de uma equipe treinada e com divisão de tarefas. Foram observadas dificuldades principalmente durante as maiores velocidades na esteira, pois nessa situação alguns animais apresentaram lesões em coxins devido ao contato prolongado com a manta do equipamento. Em outros cães foi observado dor muscular no dia subsequente à atividade executada.

O teste foi finalizado quando os cães apresentavam sinais de incoordenação motora ou relutância abrupta em andar. No período de recuperação, observou-se que os animais apresentavam hiperventilação e tremores musculares transitórios, sugerindo fadiga muscular e exaustão física. Não houve mudanças em relação ao comportamento e à resposta aos estímulos.

A figura 3 representa o gráfico que evidencia a concentração plasmática de lactato obtida em cada velocidade, durante o teste de esforço incremental inicial (M0) e final (M8) num animal avaliado. No estudo em

questão, as velocidades utilizadas foram suficientes para obtenção de limiares e objetivou-se um treino submáximo em decorrência da cardiopatia.

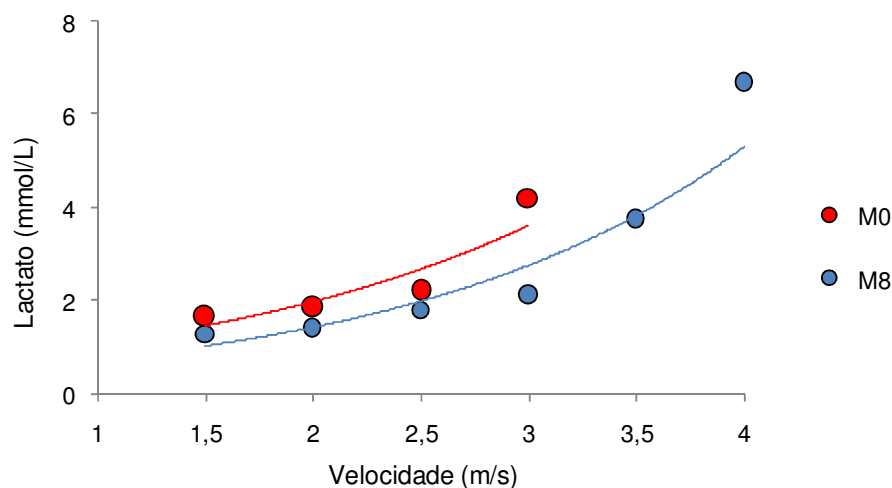


Figura 3. Representação gráfica da curva de lactato plasmático (mmol/L) obtidas após realização de teste de esforço físico incremental inicial (M0) e final (M8) num cão submetido a um programa de treinamento de 8 semanas. UNESP – Jaboticabal (2015).

6.3. Treinamento

Durante o treinamento de oito semanas evidenciou-se adaptação importante em relação à velocidade estipulada. Nesse sentido, os animais inicialmente exibiam cansaço com a atividade de 30 minutos e, decorridas algumas semanas, houve melhora no condicionamento físico de todos os animais, sendo observada visualmente melhor forma física, com torneamento muscular evidente em todos os grupos avaliados. Os animais com DMVM não apresentaram alterações em relação aos sinais clínicos no transcorrer do treinamento.

6.4. Concentração plasmática de lactato e velocidade relacionadas ao teste de Esforço

Todos os cães realizaram o teste de esforço antes ao final do treinamento. Na tabela 1 e na figura 4 estão representados os valores da concentração plasmática do limiar de lactato e as velocidades correspondentes ao teste de esforço inicial e final.

Não houve diferença significativa entre limiar de lactato (LL) inicial (M0) e final (M8) entre os grupos estudados. A velocidade correspondente ao limiar de lactato (V_{LL}) no grupo AE/Ao>1,8 foi significativamente maior no momento M8, correspondente ao teste de esforço realizado após dois meses de treinamento em relação ao momento M0 (teste de esforço inicial) ($p=0,04$).

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de lactato (média e DP) correspondente ao Limiar de Lactato (LL) e velocidade (média e DP) correspondente ao limiar de lactato (V_{LL}) em cães ($n=15$) submetidos ao teste de esforço inicial (M0) e final, após 8 semanas de treinamento (M8).

Parâmetro	Grupo AE/Ao	Momentos de Avaliação		p (ANOVA)
		M0	M8	
[LL] (mmol/L)	< 1,4	1,54 ± 0,29 ^A	1,85 ± 0,28 ^A	0,22
	1,4 - 1,8	2,14 ± 0,36 ^A	1,64 ± 0,28 ^A	0,10
	> 1,8	2,23 ± 0,44 ^A	2,28 ± 0,71 ^A	0,73
V_{LL} (m/s)	< 1,4	3,67 ± 0,25 ^A	4,18 ± 0,37 ^A	0,07
	1,4 - 1,8	3,12 ± 0,67 ^A	3,69 ± 0,93 ^A	0,06
	> 1,8	2,49 ± 0,42 ^A	2,98 ± 0,13 ^B	0,04*

LL: limiar de lactato; V_{LL} : velocidade correspondente ao limiar de lactato; p:valor de p para a ANOVA de médias repetidas ($p<0,05$). Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre momentos.

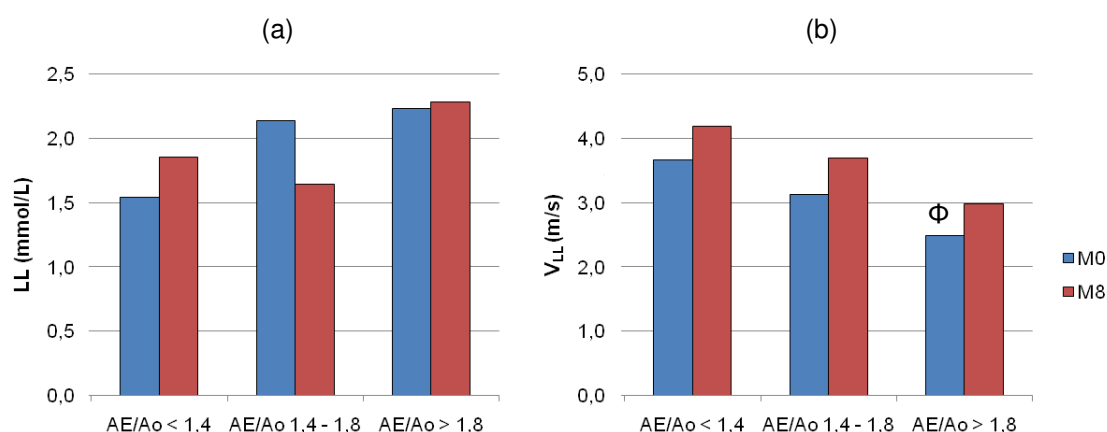


Figura 4. Representação gráfica das (a) médias das concentrações plasmáticas de lactato relacionadas ao limiar (LL) e (b) médias das velocidades correspondentes ao limiar de lactato (V_{LL}) em cães ($n=15$), separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com a realização de teste de esforço inicial e final (M0 e M8 respectivamente). ϕ : significativamente diferente em relação ao momento M8. UNESP – Jaboticabal (2015).

6.5. Perfil dos biomarcadores cardíacos específicos

Os resultados das concentrações plasmáticas dos NT-proBNP, NT-proANP e Troponina I cardíaca encontram-se arrolados na Tabela 2 e plotados na figura 5. O NT-proANP apresentou concentração plasmática significativamente maior no momento M8 em relação ao M0 especificamente no grupo AE/Ao <1,4. Não houve diferença estatística entre grupos nos diversos momentos estudados.

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas de NT-proBNP e NT-pro ANP e séricas de Troponina I cardíaca [mediana (P25-P75)] de cães (n=15) submetidos ao exercício, separados por grupos de acordo com valores da relação AE/Ao, antes da instituição do exercício (M0) e 4 (M4) e 8 (M8) semanas após o treinamento.

Parâmetro	Grupo	Momentos de Avaliação			p
		M0	M4	M8	
NT-proBNP (ng/mL)	<1,4	0,168 (0,158-0,533) ^{Aa}	0,182 (0,139-0,536) ^{Aa}	0,175 (0,162-0,612) ^{Aa}	0,91
	1,4-1,8	0,282 (0,195-0,345) ^{Aa}	0,318 (0,165-0,400) ^{Aa}	0,318 (0,168-0,379) ^{Aa}	0,99
	>1,8	0,339 (0,271-0,529) ^{Aa}	0,302 (0,231-0,457) ^{Aa}	0,389 (0,268-0,444) ^{Aa}	0,91
NT-proANP (ng/mL)	<1,4	0,021 (0,013-0,059) ^{Aa}	0,021 (0,012-0,121) ^{ABa}	0,039 (0,016-0,138) ^{Ba}	0,02*
	1,4-1,8	0,040 (0,033-0,079) ^{Aa}	0,046 (0,037-0,047) ^{Aa}	0,064 (0,029-0,068) ^{Aa}	0,69
	>1,8	0,024 (0,020-0,038) ^{Aa}	0,040 (0,017-0,053) ^{Aa}	0,034 (0,021-0,051) ^{Aa}	0,37
Troponina I (pg/mL)	<1,4	7,520 (6,132-22,194) ^{Aa}	6,360 (6,186-19,254) ^{Aa}	7,520 (6,195-37,427) ^{Aa}	0,99
	1,4-1,8	18,004 (7,916-41,557) ^{Aa}	20,031 (6,935-33,153) ^{Aa}	15,229 (6,342-49,964) ^{Aa}	0,95
	>1,8	7,253 (6,100-52,495) ^{Aa}	7,089 (7,011-24,785) ^{Aa}	9,226 (7,011-49,96) ^{Aa}	0,95

Valor de p para teste de Friedman (p<0,05). Medianas com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças entre momentos; letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças entre grupos.

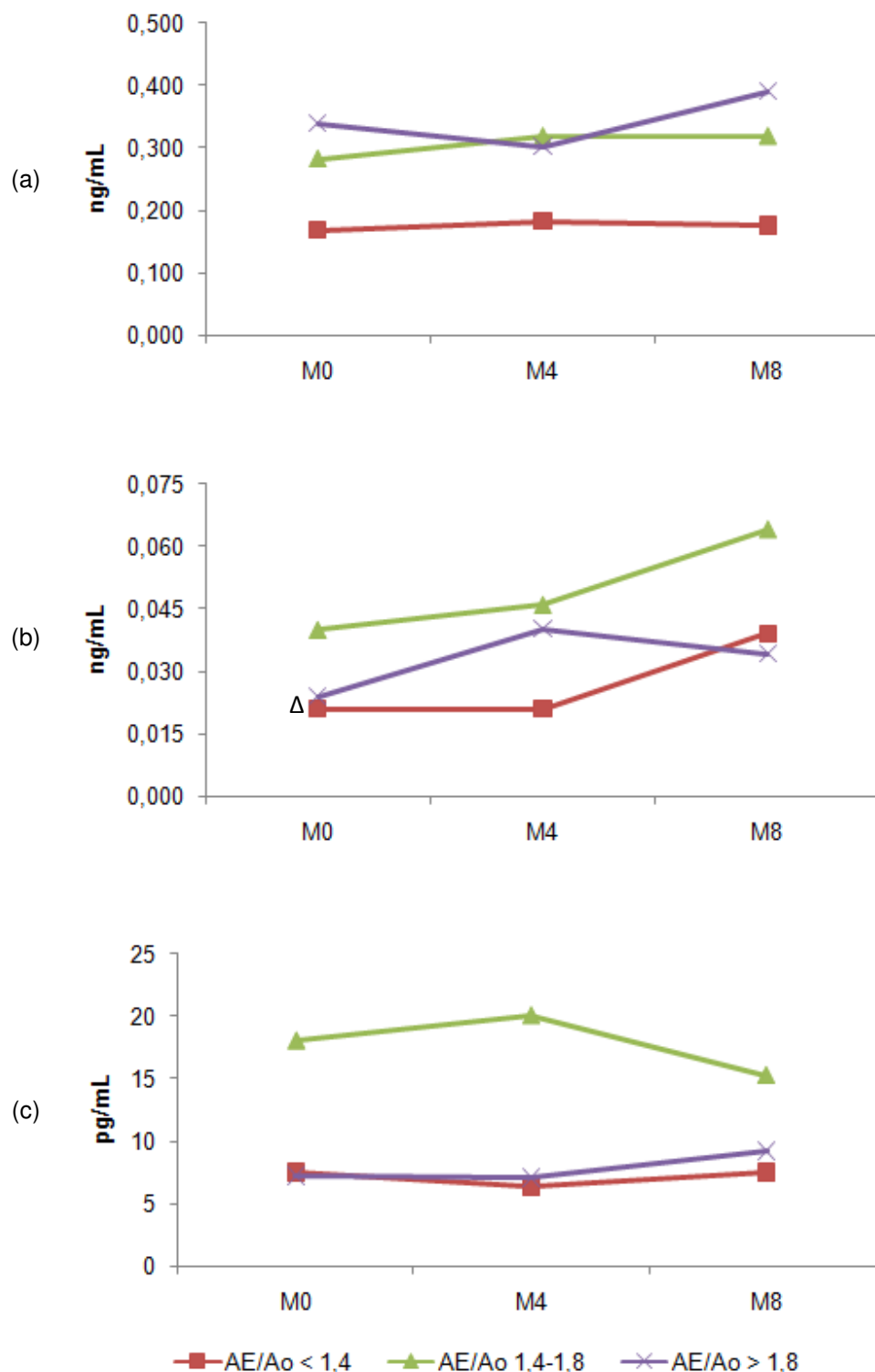


Figura 5. Representação gráfica das medianas dos biomarcadores cardíacos específicos (a) NT-proBNP, (b) NT-proANP e (c) Troponina I cardíaca em cães (n=15), separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com momento antes da instituição do exercício (M0), após 4 e 8 semanas (M4 e M8, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento M8. UNESP – Jaboticabal (2015).

6.6. Perfil dos biomarcadores cardíacos inespecíficos

Os resultados das concentrações séricas de CK-MB, LDH-I e AST encontram-se listados na Tabela 3 e plotados na Figura 6. Não foram documentadas diferenças estatísticas entre momentos e grupos nos grupos estudados.

Tabela 3. Concentrações séricas de CK-MB, LDH-I e AST [mediana (P25-P75)] de cães (n=15) submetidos ao exercício, separados por grupos de acordo com valores da relação AE/Ao, antes da instituição do exercício (M0) e 4 (M4) e 8 (M8) semanas após o treinamento.

Parâmetro	Grupo	Momentos de Avaliação			p
		M0	M4	M8	
CK-MB (U/L)	<1,4	127,0 (121,0-144,0) ^{Aa}	118,0 (105,0-144,0) ^{Aa}	137,0 (133,0-147,0) ^{Aa}	0,69
	1,4-1,8	110,0 (109,0-162,0) ^{Aa}	148,0 (137,0-159,0) ^{Aa}	128,0 (124,0-132,0) ^{Aa}	0,69
	>1,8	121,0 (112,0-152,0) ^{Aa}	166,0 (142,0-170,0) ^{Aa}	135,0 (129,0-135,0) ^{Aa}	0,12
LDH (U/L)	<1,4	72,8 (72,8-89,0) ^{Aa}	64,7 (48,5-105,2) ^{Aa}	83,0 (40,4-105,2) ^{Aa}	0,95
	1,4-1,8	145,7 (121,4-170,0) ^{Aa}	72,8 (40,4-89,0) ^{Aa}	40,4 (28,0-72,8) ^{Aa}	0,06
	>1,8	202,4 (137,6-218,6) ^{Aa}	121,4 (40,4-137,6) ^{Aa}	48,5 (16,1-56,6) ^{Aa}	0,18
AST (U/L)	<1,4	26,0 (20,0-26,0) ^{Aa}	26,0 (26,0-26,0) ^{Aa}	26,0 (20,0-31,0) ^{Aa}	0,69
	1,4-1,8	31,0 (31,0-31,0) ^{Aa}	36,0 (31,0-36,0) ^{Aa}	31,0 (31,0-31,0) ^{Aa}	0,69
	>1,8	26,0 (26,0-31,0) ^{Aa}	31,0 (31,0-36,0) ^{Aa}	26,0 (26,0-31,0) ^{Aa}	0,36

Valor de p para teste de Friedman (P<0,05). Medianas com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças entre momentos; letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças entre grupos.

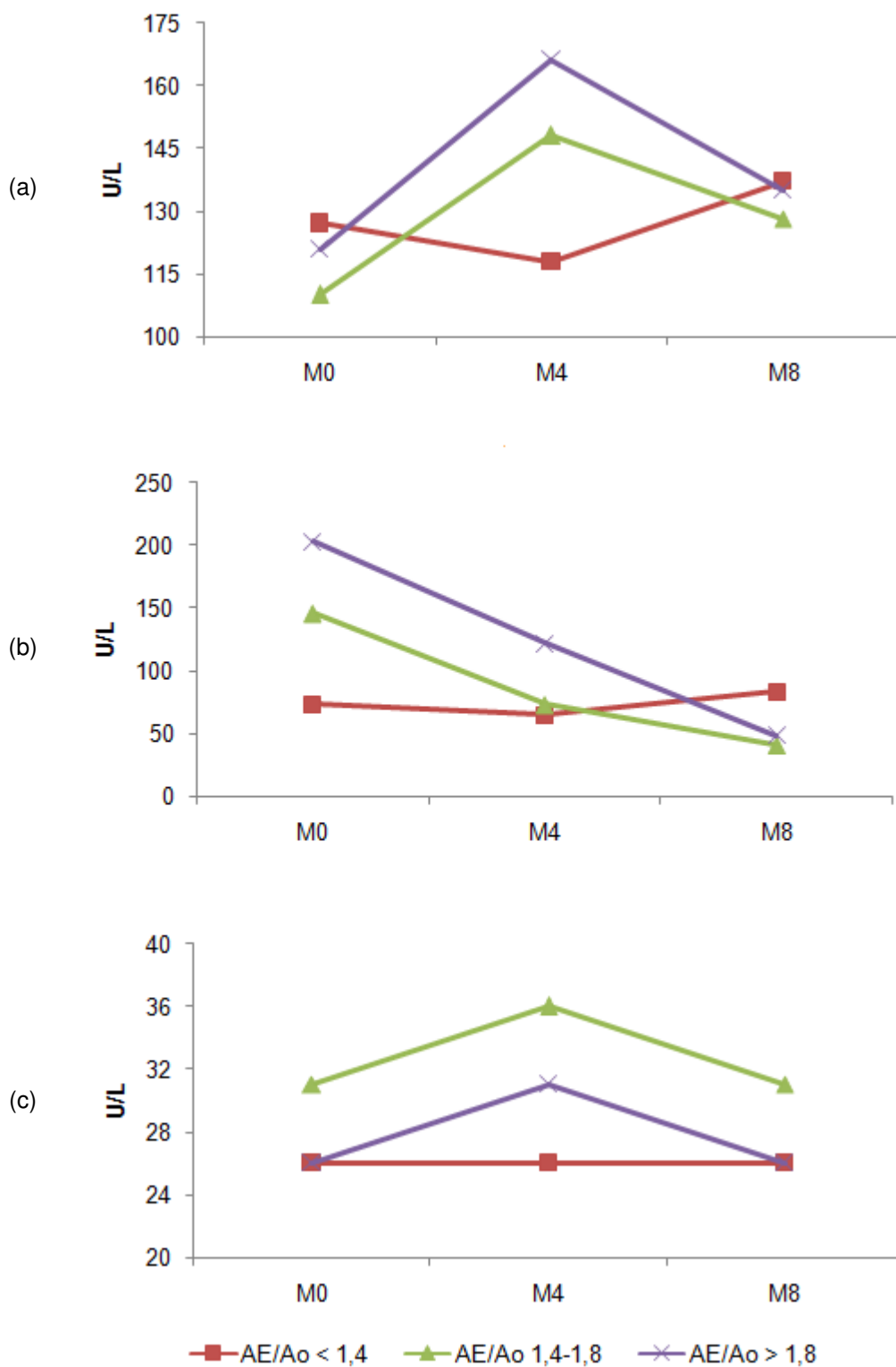


Figura 6. Representação gráfica das medianas dos biomarcadores cardíacos inespecíficos (a) CK-MB, (b) LDH-I e (c) AST em cães (n=15), separados por grupo de acordo com a relação AE/Ao, submetidos a um protocolo de treinamento de 8 semanas, com momento antes da instituição do exercício (M0), após 4 e 8 semanas (M4 e M8, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

6.7. Análise estatística multivariada exploratória

Os animais deste trabalho foram caracterizados pela análise estatística multivariada exploratória de fatores, sendo possível verificar a estrutura de dependência existente entre as variáveis que contribuíram para a caracterização de oito fatores, utilizando o critério Kaiser, que determinou o número de fatores a ser escolhido de modo que o conjunto de fatores comuns atingiu 79,50% da variabilidade global das variáveis (Tabela 4). Os fatores foram compostos da seguinte maneira: Fator 1: Fração de encurtamento e ejeção (FEC% e FEJ%) ; Fator 2: TRIV e E/TRIV; Fator 3: E/E' septal e lateral; Fator 4: LDH e CK-MB; Fator 5: PPE/TEVE e AST; Fator 6: NT-proANP e E/A; Fator 7: DIVEd e DIVEs e Fator 8: NT-proBNP.

O fator 1 composto por FEC% e FEJ%, com representação de 17,05% da variância total dos dados, mostrou correlação positiva entre FEC% e FEJ%, variáveis associadas diretamente a função sistólica. Já o fator 2, formado por TRIV e E/TRIV evidenciou correlação negativa entre ambos os dados associados diretamente à função diastólica e como índice preditivo de ICC, com variabilidade total dos dados de 13,42%. Situação semelhante foi observada entre componentes do fator 3, composto por E/E' lateral e septal, variáveis com correlação positiva, obtidas pela avaliação por *Tissue Doppler Imaging* e também empregadas como indicadores preditivos de ICC (variabilidade de 10,67% do total de dados).

Tabela 4. Análise de fatores, segundo critério de Kaiser, com poder discriminatório das variáveis dos fatores considerando-se cargas com valor absoluto acima de 0,5. Os destaques em negrito mostram as variáveis com poder discriminatório.

Parâmetro	Fatores							
	1	2	3	4	5	6	7	8
FEC%	0,979	0,018	0,030	0,048	0,008	-0,020	-0,080	-0,051
FEJ%	0,972	0,046	0,026	0,033	0,022	-0,031	-0,093	-0,055
TRIV	-0,068	0,892	0,123	0,056	0,022	-0,021	-0,085	-0,002
E/TRIV	-0,143	-0,919	0,105	0,031	0,028	0,068	0,183	0,060
E/E' (S)	0,114	-0,142	0,731	-0,147	-0,016	0,164	-0,203	0,327
E/E' (L)	-0,011	0,083	0,856	0,182	-0,040	-0,114	0,189	-0,137
LDH-I	0,035	0,035	0,087	0,884	0,054	0,211	-0,081	0,042
CK-MB	0,165	0,015	-0,112	0,620	-0,065	-0,301	-0,188	-0,442
PPE/TEVE	0,093	0,115	0,058	-0,016	0,827	0,246	0,251	0,169
AST	-0,070	-0,183	-0,131	0,091	0,752	-0,262	-0,204	-0,319
NT-proANP	0,168	0,076	0,242	-0,163	0,093	-0,784	-0,102	0,007
E/A	0,132	-0,102	0,365	0,037	0,247	0,682	-0,094	-0,134
DIVEd	-0,114	-0,246	0,033	-0,032	0,134	-0,054	0,867	0,016
DIVEs	-0,278	-0,121	0,050	-0,284	-0,098	0,194	0,693	-0,068
NT-proBNP	0,130	0,082	-0,001	-0,011	0,039	0,114	0,033	-0,856
cTnl	0,288	-0,060	-0,238	0,268	-0,179	-0,343	0,354	0,217
AE/Ao	0,037	-0,449	0,349	0,498	0,078	0,004	0,007	0,142
Auto Valor	2,89	2,28	1,81	1,61	1,47	1,23	1,17	1,02
Variância Total	17,05%	13,42%	10,67%	9,50%	8,68%	7,23%	6,88%	6,03%

FEC%: fração de encurtamento; FEJ%: fração de ejeção; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E/TRIV: relação entre onda E e tempo de relaxamento isovolumétrico; E/E' (S): relação entre a onda E e onda E' septal; E/E' (L): relação entre a onda E e onda E' lateral; LDH-I: lactato desidrogenase tipo I; CK-MB: isoenzima de CK oriunda de músculo cardíaco; TEVE: tempo de ejeção; PPE: período de pré ejeção; AST: aspartato aminotransferase; NT-proANP: fragmento N-terminal inativo de peptídeo natriurético atrial; E/A: relação entre o pico das ondas E e A do fluxo transmitral; DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole; DIVEs: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole; NT-proBNP: fragmento N-terminal inativo de peptídeo natriurético tipo B; AE: átrio esquerdo; Ao: aorta.

O fator 4 formado por duas variáveis associados à lesão miocárdica, LDH-I e CK-MB, representou 9,50% da variabilidade total dos dados e associação positiva entre as variáveis citadas. O fator 5 representou 8,68% da variabilidade obtida e apresentou correlação positiva entre PPE/TEVE (indicador inversamente proporcional à contratilidade miocárdica) e AST. O fator 6 (7,23%) apresentou uma correlação negativa entre suas variáveis E/A e NT-proANP. Já o fator 7, formado por índices morfológicos indicativos de remodelamento cardíaco, também apresentaram associação direta, com correlação positiva, correspondendo a 6,88% da variabilidade total dos dados. Finalmente, o fator 8 foi constituído por uma única variável, NT-proBNP com representação de 6,03% da variância total dos dados.

A análise de componentes principais de cada fator analisado em separado permitiu verificar a distribuição individual dos animais de todos os grupos e em todos os momentos. A figura 7 traz como exemplo um animal integrante do grupo $AE/Ao > 1,8$ que apresentou, na análise do fator 1, tendência diferente da maioria dos animais estudados, evidenciando aumento na FEC% e FEJ% ao longo do treinamento.

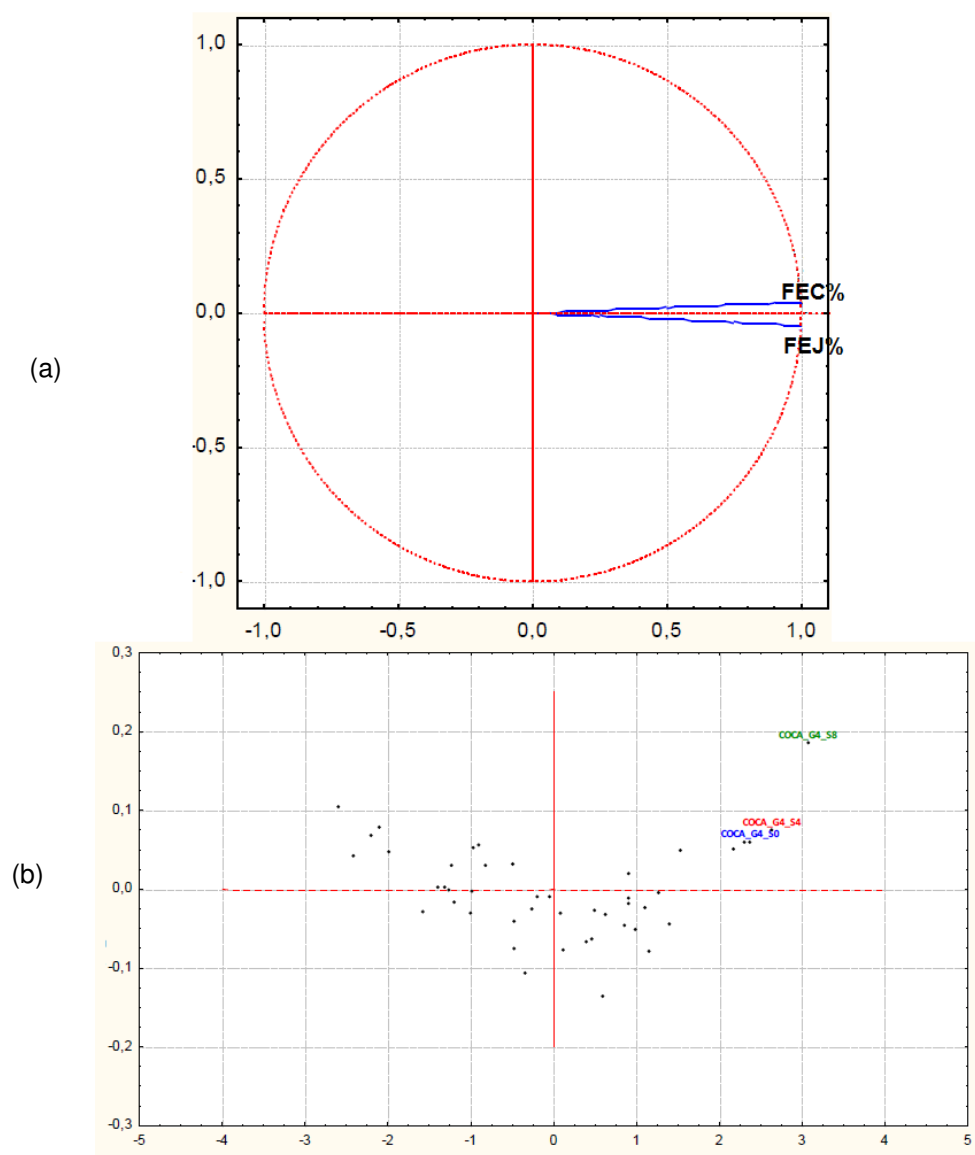


Figura 7. (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 1, demonstrando a relação entre FEC% (fração de encurtamento) e FEJ% (fração de ejeção); (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados ($n=15$) com base no fator 1. COCA_G3_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo $AE/Ao > 1,8$. UNESP – Jaboticabal (2015).

Já na análise do fator 2 foi observado que outro animal, também integrante do grupo $AE/Ao > 1,8$, apresentou comportamento diferente dos demais animais, sugerindo elevação no momento M4 relacionado ao parâmetro E/TRIV e posterior retorno ao restante dos animais no momento M8 (Figura 8).

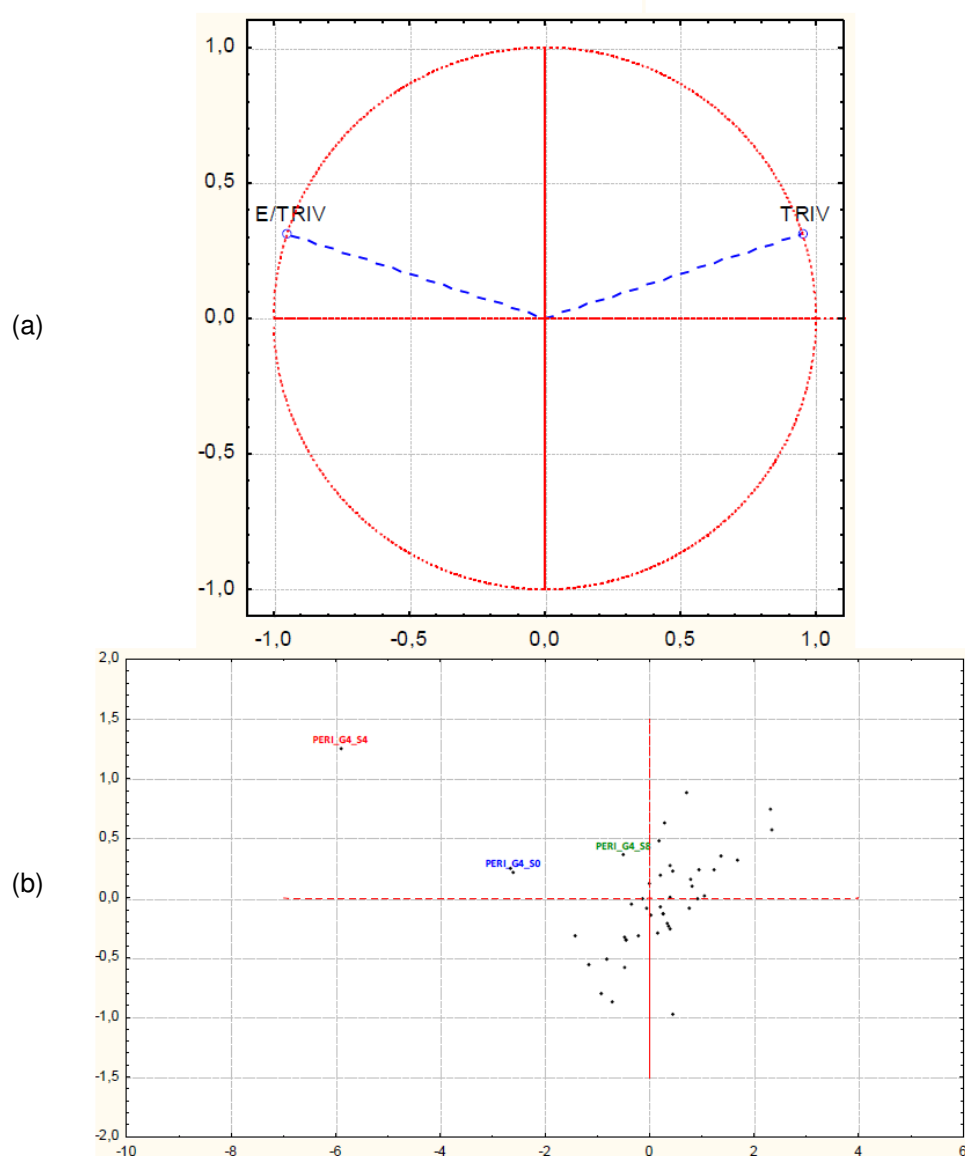


Figura 8. (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 2, demonstrando a relação entre E/TRIV (relação entre onda E e tempo de relaxamento isovolumétrico) e TRIV; (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados (n=15) com base no fator 2. PERI_G3_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo Ae/Ao>1,8. UNESP – Jaboticabal (2015).

A análise do fator 7 evidenciou que um dos cães pertencentes ao grupo AE/Ao 1,4-1,8, finalizado o período de treinamento, divergiu na distribuição normal, evidenciando maior diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole comparativamente aos demais animais (Figura 9).

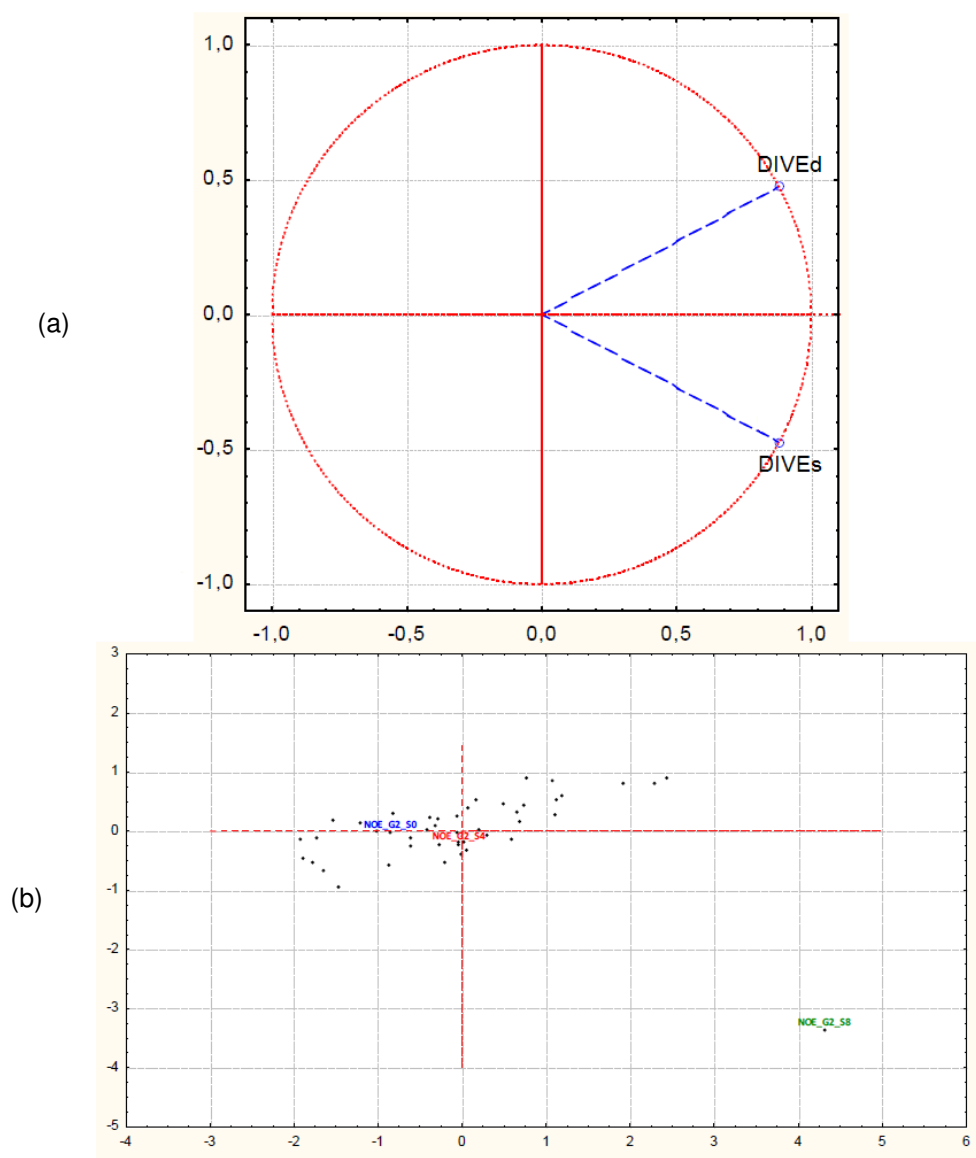


Figura 9. (a) Gráfico das variáveis correspondentes ao Fator 7, demonstrando a relação entre DIVEd e DIVEs (diâmetro interno de ventrículo esquerdo em sístole e diástole) ; (b) Gráfico de casos formado pela distribuição dos animais estudados (n=15) com base no fator 7. NOÉ_G1_S0 (nome do animal-grupo-momento de avaliação), animal pertencente ao grupo AE/Ao 1,4 - 1,8. UNESP – Jaboticabal (2015).

7. DISCUSSÃO

O teste de esforço incremental é utilizado rotineiramente na medicina para determinação da capacidade funcional de cada indivíduo, sendo empregado para delinear um protocolo de treinamento adequado e também para avaliar o sucesso terapêutico (FERRASIN; MARCORA, 2009; PIEPOLI et al., 2011). Na medicina veterinária já existem alguns estudos sobre a aplicabilidade do teste de esforço incremental em esteira, de modo que Kittleson et al. (1996) introduziram o teste submáximo em cães com insuficiência cardíaca induzida por marcapasso e documentaram que a capacidade funcional dos animais estava associada ao aumento da concentração do lactato e diminuição da tensão de oxigênio. O teste submáximo em cães é válido para mensurar a capacidade física e fornecer informações úteis para avaliação da resposta individual aos medicamentos empregados, assim como lactato e frequência cardíaca foram considerados como parâmetros individuais de tolerância ao exercício (FERRASIN; MARCORA, 2007; FERRASIN; MARCORA, 2009; PICCIONE et al., 2012).

O estudo em questão evidenciou utilidade dos limiares de lactato para delinear a velocidade de treinamento para cada animal, sendo indicadores de tolerância ao exercício. O treinamento aeróbico aplicado resultou em aumento da concentração do LL no teste de esforço final (M8) comparado ao teste inicial (M0) em todos grupos, ainda que a elevação significativa só tenha sido constatada no grupo AE/Ao>1,8, indicando aumento na capacidade funcional desses animais e, conseqüentemente, melhora da tolerância ao exercício. De modo similar, Ferrasin e Marcora (2007) observaram que cães com ICC submetidos ao teste incremental antes e após sete dias da administração de medicamentos suportaram mais tempo a atividade física, concluindo ter ocorrido aumento na capacidade física desses pacientes. A melhoria na capacidade física desses animais envolve a compreensão dos supostos benefícios ao coração, musculatura esquelética e função vascular já descritos para o exercício físico (FLETCHER et al., 1990; CONRAADS et al., 2013; PHILLIPS et al., 2015).

Na medicina veterinária, são poucos os estudos que investigaram o exercício físico como forma de terapia em cães cardiopatas. Em cães hígidos, Pascon (2009) estabeleceu um treinamento sistematizado e observou melhoria na variabilidade da frequência cardíaca e função diastólica. Já no estudo em questão, por outro lado, foi o primeiro cujo escopo esteve centrado na avaliação do comportamento de biomarcadores cardíacos específicos e inespecíficos em cães com DMVM submetidos a um programa de treino sistematizado com duração de dois meses.

De acordo com a literatura, a atividade física é de grande utilidade como ferramenta terapêutica em humanos com cardiopatias e, com esse intuito, poderia ser utilizada com o objetivo de reduzir os níveis de peptídeos natriuréticos em cães com DMVM, pois os valores de NT-proBNP e NT-proANP se encontram elevados proporcionalmente à progressão dessa enfermidade, sendo úteis como ferramenta diagnóstica e na avaliação de terapias instituídas (SERRES et al., 2009, OYAMA; SINGLETARY, 2010; FIUZA-LUCES et al., 2013; EBISAWA et al., 2013; ADAMS; NIEBAUER, 2015). Como já verificado em seres humanos, a atividade física diminui a ação de mecanismos compensatórios deletérios, traduzida pela redução na concentração de angiotensina I, II, renina, aldosterona e catecolaminas, resultando em menor pré e pós-carga. Destarte, os peptídeos natriuréticos poderiam ser liberados em menores concentrações (LIJNEM et al., 1986; HESPEL et al., 1988, COATS et al., 1992; BRAITH, et al., 1999; BRITH; EDWARDS, 2003; HAACK; ZUCKER, 2014).

Curiosamente, os achados desse estudo modificam a hipótese de que o treinamento físico melhoraria os valores dos peptídeos natriuréticos e troponina-I cardíaca em cães com DMVM, haja vista não terem sido documentadas modificações nos valores de NT-proBNP, NT-proANP e toponina I cardíaca decorridos dois meses de exercício físico sistematizado. Por outro lado, os dados aqui apresentados corroboram Ahmad et al. (2014), que instituíram um treinamento com duração de três meses em 928 humanos com insuficiência cardíaca congestiva, sendo o exercício realizado três vezes por semana com duração de 30 minutos. Em tal pesquisa, o treinamento físico

padronizado não modificou os valores de NT-proBNP e troponina T na população estudada. Não obstante, Ahmad et al. (2014) ressalta a importância da duração da atividade física como um importante fator para avaliação dos resultados das concentrações obtidas e a caracterização da população envolvida como fatores limitantes.

Os estudos que obtiveram redução nos valores de peptídeos natriuréticos envolveram um treinamento prolongado. Braith et al. (1999), por exemplo, verificaram diminuição na concentração de ANP em um protocolo de 16 semanas de exercício baseado em 40% a 70% do VO_2 máximo em 19 pessoas com ICC. Já Passino et al. (2006) estudaram o efeito do exercício em 95 pessoas baseado em 60% de VO_2 máximo em um treinamento de nove meses e constaram redução nos valores de NT-proBNP associada ao aumento na capacidade física e melhora clínica, sugerindo que esse biomarcador é útil para monitorar o treinamento. Com o objetivo de avaliar o efeito do exercício, Maiike et al. (2007) revisaram 23 estudos, totalizando 849 pacientes humanos com insuficiência cardíaca crônica. O resultado dessa compilação apontou para redução nos níveis plasmáticos de catecolaminas, angiotensina II e BNP em repouso. No entanto, os autores em tela salientaram a diversidade de metodologias empregadas nos estudos compilados, com enorme variação no protocolo de treinamento, que incluiu bicicleta ergométrica, esteira e exercícios de resistência, bem como em sua duração, que variou de 2 a 6 meses.

Este estudo elencou os cães em consonância com a relação AE/Ao. Os animais detentores de relação inferior a 1,4 não apresentavam remodelamento atrial, ao passo que os demais grupos já exibiam dilatação atrial e, destarte, em teoria tenderiam a exibir valores aumentados de NT-proANP comparativamente aos animais sem sobrecarga atrial (DEALMEIDA et al., 2012; EBISAWA et al., 2013), situação não detectada nesta pesquisa.

No grupo AE/Ao < 1,4, houve aumento significativo na concentração de NT-proANP em M8 comparativamente a M0. Pode-se especular sobre a possibilidade de aumento na produção desse peptídeo em face do aumento da tensão atrial induzida pelo exercício. Pesquisas já evidenciam, por exemplo,

que a liberação de ANP induzida pelo exercício correlaciona-se com a diminuição da mortalidade cardiovascular, sugerindo um potencial efeito benéfico da habilidade atrial em aumentar esse peptídeo durante o exercício em pacientes com ICC, retratando função vasodilatadora preservada em resposta ao aumento de pós carga pelo miocárdio atrial (LARSEN et al., 2003; DE ALMEIDA et al., 2012). Especificamente no grupo AE/Ao>1,8, três animais utilizavam inibidores de ECA, de modo que o emprego dessa classe de substâncias ao longo do treinamento pode ter interferido nas concentrações dos biomarcadores, pois é sabido que a instituição de fármacos, como vasodilatadores e diuréticos, promove diminuição da pré e pós-carga, condições conhecidamente importantes para liberação desses hormônios (YOSHIMURA et al., 2002; PROSEK et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2012; OYAMA; SINGLETARY, 2010; OYAMA, 2013;). Dessa forma, pode-se especular que as concentrações desses biomarcadores poderiam ser diferentes caso esses animais não estivessem em tratamento.

Os valores de referência para NT-proBNP e NT-proANP são variáveis de acordo com o tipo de teste aplicado para mensuração, o que dificulta a interpretação dos resultados e comparação com outros estudos. Mudanças no tipo de teste, especificidade para espécie e manuseio das amostras são importantes fatores para delinear os valores de referência para cada pesquisa sobre peptídeos natriuréticos e troponina I cardíaca (NOSTELL; HAGGSTROM, 2008; OYAMA; SINGLETARY, 2010; SHAVE et al., 2010). Também é importante considerar a forma de processamento e armazenamento, pois as amostras coletadas nesta pesquisa foram acondicionadas inicialmente em tubos com EDTA, o que pode ter interferido nas concentrações plasmáticas desses biomarcadores ao longo do armazenamento. Sabe-se que ocorre redução na concentração de NT-proBNP após coleta por degradação através de proteases em cães, sendo indicado armazenar as amostras em tubos apropriados com inibidores de proteases (OYAMA; SINGLETARY, 2010). Também é importante ressaltar que as amostras permaneceram armazenadas a -80°C por períodos variáveis previamente ao processamento laboratorial. Pode-se especular que o discreto aumento dos valores de NT-proBNP e NT-

proANP em M8 comparativamente a M0 podem ser atribuídas ao menor tempo de estocagem das amostras coletadas no momento analítico final (HEZZEL et al., 2015). Além disso, estudos já constataram variação importante na concentração desses peptídeos ao longo de semanas em cães saudáveis, sendo essa característica atribuída às alterações no ritmo circadiano, dieta, ingestão hídrica, exercício, sexo e *clearance* desses biomarcadores, o que pode resultar em resultados falso positivos ou falso negativos. Dessa forma, a variabilidade individual deve ser considerada para interpretar os valores de peptídeos natriuréticos em cães (KELLIHAM et al., 2009; OYAMA; SINGLETARY, 2010; MISBACH et al., 2013).

A avaliação da concentração da troponina I cardíaca ao longo do treinamento não aponta para lesão do miocárdio induzida pela atividade física, já que esse biomarcador de injúria é muito sensível e específico para dano celular miocárdico (FERRASIN; MARCORA, 2007; LJUNGVALL et al., 2009; HEZZEL et al., 2012 ; OYAMA, 2013). Tal achado corrobora Ahmad et al. (2014), que avaliaram 928 pessoas com ICC submetidas ao exercício e não constataram elevação da troponina T ao longo do treinamento.

Já em outros estudos que avaliaram a troponina I cardíaca em repouso e após provas de enduro, tanto em humanos quanto equinos hígidos, foi observado aumento na concentração de tal substância após a atividade física, o que pode sugerir lesão miocárdica (HOLBROOK et al., 2006; NOSTELL; HAGGSTROM, 2008; OKEEFE et al., 2012) . Porém, nesses estudos, as atividades de enduro foram relacionadas a exercícios de alta intensidade, diferente do treinamento avaliado na pesquisa em tela em cães cardiopatas, que trabalhou com exercício submáximo. Ferrasin e Marcora (2007) avaliaram a aplicabilidade de teste de esforço em cães com ICC e verificaram uma discreta elevação de troponina I cardíaca após atividade física, sendo que a amostra sanguínea nesse estudo foi coletada após 20 minutos do término da teste de esforço, o que poderia indicar lesão miocárdica subclínica induzida pelo exercício. É importante que se considere o tempo de coleta da amostra após a atividade física, tipo de treinamento instituído e teste envolvido para avaliar o comportamento desse biomarcador de injúria cardíaca quando

relacionado à sua aplicabilidade em exercícios (NOSTELL; HAGGSTROM, 2008; SHAVE et al., 2010).

Os achados relacionados à CK-MB, LDH-I e AST, juntamente com a troponina I cardíaca apontam para ausência de lesões musculares cardíacas ao longo do treinamento instituído nesses pacientes, sugerindo que o exercício não foi promoveu ou acentuou o dano miocárdico instalado. Chanoit et al. (2002) avaliaram seis Beagles saudáveis, sem treinamento prévio, submetendo-os ao exercício de corrida por 60 minutos e não verificaram alterações significativas em CK, LDH-I e AST. Achado semelhante foi observado por Rovira et al. (2008), que avaliaram nove cães antes e após a realização de exercício com duração de 20 minutos e constataram ausência de lesão muscular subclínica, a partir da quantificação dessas mesmas enzimas.

Ao estudarem 16 cães saudáveis submetidos a um treinamento aeróbico, com duração de nove semanas, realizado cinco vezes por semana, com duração média de 55 minutos, Stuewe et al. (2001) observaram, por cromatografia, aumento significativo na CK-MB no miocárdio do ventrículo esquerdo, atribuindo tal achado à hipertrofia cardíaca compensatória, resultando em resposta adaptativa favorável, com produção mais eficiente de ATP. A elevação de CK-MB não pode ser investigada neste estudo, pois a CK-MB foi quantificada apenas no sangue, não descartando a possibilidade de que sua expressão no tecido tenha se elevado. No entanto, diferindo do estudo de Stuewe et al. (2001), os cães desta pesquisa foram exercitados três vezes na semana, com duração de 30 minutos, por 8 semanas.

A despeito da inexistência de diferenças estatísticas, houve redução na concentração da LDH-I nos três grupos estudados. Tal situação pode ser atribuída ao aumento da capacidade aeróbica dos animais pelo treinamento realizado, já que a LDH é responsável por catalisar lactato a piruvato. É sabido que exercícios de enduro em humanos e cães, como a corrida, podem desencadear alterações no tipo de fibra muscular, levando ao aumento das fibras do tipo I, predominantemente aeróbicas. Além disso, o exercício aeróbico promove aumento da densidade capilar e da vascularização do tecido

muscular, aumentando o envio de oxigênio e nutrientes para a musculatura (MILLARDI, 2014). Esse fato pode ser associado aos valores do V_{LL} , pois os animais suportaram maiores velocidades no teste de esforço final, traduzido pelo aumento da V_{LL} comparativamente ao teste inicial, o que sinaliza aumento da capacidade física.

Embora a análise univariada não tenha evidenciado variações expressivas na concentração dos biomarcadores ao longo do protocolo sistematizado de treinamento, optou-se por submeter os dados à análise estatística multivariada exploratória de fatores para evidenciar a interação entre a concentração dessas substâncias e os demais parâmetros ecocardiográficos estudados (BARROSO; ARTES, 2003; MILSTEIN et al., 2005). Nesse sentido, foi possível resumir os dados em oito fatores, com a análise de componentes principais permitindo estudar cada animal com base no fator e verificar a estrutura de dependência dessas variáveis para cada cão. Ficou evidente a existência de oito conjuntos de variáveis pouco correlacionados entre si, mas com correlação forte entre as variáveis dentro de cada conjunto, sugerindo serem os mesmos heterogêneos (KLEFENS, 2009).

É possível afirmar que as variáveis com poder discriminatório do fator 1, as quais se relacionam com a função sistólica, têm atuação expressiva em pacientes caninos cardiopatas submetidos ao exercício, assim como já descrito em humanos (HAYKOWSKY et al., 2007; CONRAADS et al., 2013). Os outros fatores posteriores ao fator 1 corresponderam à função diastólica, seguida dos índices de avaliação morfológica e dos biomarcadores. Como os últimos fatores relacionados aos biomarcadores apresentaram menor porcentagem na variabilidade total dos dados, torna-se tácita a pequena participação dessas variáveis nos efeitos evidenciados nos animais treinados, situação semelhante observada por Ahmad et al. (2014), que constatou que a realização de atividade física em humanos com ICC não levou a variações em biomarcadores como NT-proBNB e Troponina-T.

Embora os resultados mostrem inexistência de diferença na comparação dos fatores entre grupos e entre momentos analisados ao longo do treinamento, é conveniente ressaltar que alguns animais apresentaram

comportamento divergente quando comparados à maioria dos cães em alguns fatores específicos relacionados à função sistólica e diastólica. Essa característica sugere que, em cães com doença valvar mitral que exibem remodelamento atrial leve a grave, o exercício modificou parâmetros como fração de encurtamento e ejeção e tempo de relaxamento isovolumétrico, os quais já foram relacionados aos efeitos benéficos do exercício em seres humanos e cães (HAYKOWSKY et al., 2007; PASCON, 2009; GIELEN et al., 2015).

As principais limitações deste estudo referem-se ao pequeno número de animais avaliados, assim como o curto período de treinamento ao qual os cães foram submetidos. Ademais, é importante ressaltar o tempo de armazenamento das amostras utilizadas para quantificação dos biomarcadores, bem como a utilização de tubos desprovidos de inibidores de proteases, condições que podem ter interferido com os métodos analíticos empregados. Como o protocolo de treinamento adotado nesta pesquisa não foi validado no tocante à otimização da função e morfologia cardíaca, também é possível que as velocidades e o tempo em esteira empregados não tenham sido suficientes para evidenciar alteração das características cardiovasculares dos cães treinados.

Na avaliação individual dos pacientes, os resultados desta pesquisa sugerem que qualquer mudança nos valores de NT-proBNP, NT-proANP e troponina I cardíaca em treinamento físico seria mínima e que estudos direcionados à variabilidade da frequência cardíaca, dinâmica miocárdica, avaliação da função vascular e da musculatura esquelética seriam interessantes para complementar tais achados e avaliar como o cão cardiopata responde ao exercício.

8. CONCLUSÃO

- 1) O condicionamento físico realizado resultou em melhora da capacidade física dos cães com degeneração mixomatosa da valva mitral.
- 2) O exercício físico sistematizado, da forma como realizado, não promoveu alteração nas concentrações dos biomarcadores de estresse e lesão de miócitos cardíacos.
- 3) A análise multivariada exploratória mostrou que os fatores onde se inserem os biomarcadores contribuíram com a menor porcentagem na variabilidade total dos dados, ilustrando a pequena participação dessas substâncias nos efeitos atribuídos ao treinamento físico.
- 4) Estudos direcionados à variabilidade da frequência cardíaca, dinâmica miocárdica, avaliação da função vascular e da musculatura esquelética seriam interessantes para complementar tais achados e avaliar o porquê da melhora da capacidade física desses animais após os dois meses de condicionamento físico.

9. REFÊRENCIAS

ABBOT, J. A. Doença valvular adquirida. In: TILLEY, L. P.; GOODWIN, J. K. **Manual de cardiologia para cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 109-132.

ADAMS, V.; NIEBAUER J.; Reversing heart failure – associated pathophysiology with exercise, what actually improves and by how much? **Heart failure clinics**, v.11, n.1 p.17-28, 2015.

AGUDELO, C.F.; SCHANILEC, P.; Evaluation of the functional capacity in dogs with naturally acquired heart disease. **Veterinarni Medicina**, v.58, n. 5, p. 264-270, 2013.

AHAMD, T.; FIUZAT, M.; MARK, D.B.; NEELY, B.; NEELY, M.; KRAUS, W.E.; KITZMAN, D.W. The effects of exercise on cardiovascular biomarkers in patients with chronic heart failure. **American Heart Journal**, v.167, n.2, p.193-202, 2014.

ALDOUS, S. J .Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 164, n. 3, p. 282-294, 2013.

ARNDT, J.W.; REYNOLDS, C.A.; SINGLETARY, G.E.; CONNOLLY, J.M.; LEVY, R.J.; OYAMA, M.A. Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.6, p.1208-1213, 2009.

ATKINS, C.E.; HAGGSTROM, J. Pharmacologic management of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.14, n.1,p. 165-184, 2012.

BAKIREL, U.;GUNES, S. Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. **Acta Veterinaria**, v.59, n.2-3, p.223-229, 2009.

BALADY, G. J.; CHAIR, B. C.; DRISCOLL, D.; FOSTER, C.; FROELICHER, E. GORDON, N.; PATE, R.; RIPPE, J.; BAZZARRE, T. Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities. **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 97, n.22, p.2283-2293, 1998.

BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FOTEQUE, J.H. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamyltransferase e lactato desidrogenase em eqüinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Semina: Ciências agrárias**, v.26, n.2, p.211-218, 2005.

BARROSO, L. P.; ARTES, R. Análise Multivariada. SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA E REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 2003. Lavras. **Anais...** São Paulo: IBMEC, 2003. p. 71-103.

BAUER, N.; MULLER-EHMSSEN, J.; KRAMER, W.; HAMBARCHIAN, N.; ZOBEL, C.; SCHWINGER, R. H.; NEU, H. KIRCH, U.; GRUNBAUM, E. G.; SCHONER, W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of β -blockade and angiotensin-converting inhibition. **Hypertension**, Dallas, v. 45, n. 5, p. 1024-1028, 2005.

BELARDINELLI, R.; GEORGIOU, D.; PURCARO, A. Randomized controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. **Circulation Journal of American Heart Association**, Baltimore, v. 99, n. 9, p. 1173-1182, 1999.

BERNAY, F.; BLAND, J.M.; HAGSSTROM, J.; BADUEL, L.; COMBES, B.; LOPEZ, A.; KALTSATOS, V. Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.2, p.1-11, 2010.

BILLMAN, G.E. Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, p. 446-454, 2002.

BOON, J. A.; Evaluation of size, function and hemodynamics. In:_____. **Veterinary echocardiography**, 2ed. New Jersey: J. Willey, 2011, p.151-260.

BORGARELLI, M., ZINI, E., DAGNOLO, G. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.6, n.2, p.27-34, 2004.

BORGARELLI, M.; HAGGSTROM, J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: Natural history, clinical presentation and therapy. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.40, n.4, p.651–663, 2010.

BOSWOOD, A. Laboratory tests for the diagnosis of heart disease and failure in dogs and cats. In: The World Small Animal Veterinary Association, **Proceedings WSAVA**, 2007.

BRAITH, R.; WELSCH, M.; FEIGENBAUM, M., KLUSS, H.A.; PEPINE, C.J. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance training. **Journal of the American College Cardiology**, v.34, n.4, p.1170–1175, 1999.

BRITH R.W., EDWARDS D.G. Neurohormonal abnormalities in heart failure: impact of exercise training. **Congestive Heart Failure**, v.9, n.2, p.70–76, 2003.

BRUM, P.C.; FORJAZ, C.L.M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C.E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Revista Paulista de Educação Física**, v.18, n.8., p.21-31, 2004.

BUCH, N.A. et al. Mortality, cardiac vagal control and physical training- what's the link? **Experimental physiology**, v. 87, n. 4, p. 423-435, 2002.

BUCHANAN, J. W. Chronic valvular disease (endocardiose) in dogs. **Advances in Veterinary Science and Comparative**, v.21, p.75-106, 1997.

CAMACHO, R. R. **Indicadores ecodopplercardiográficos de função cardíaca em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral e suas correlações com valores séricos das interleucinas 1 β e 4**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

CAMPLESI, A. C.; SAKATE, M.; SIMAO, N. M. B.; MOYA, C. F. Dosagem de marcadores cardíacos CK-MB e Tnlc e eletrólitos no envenenamento experimental por veneno de sapo em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.632-636, 2009.

CARRETON, E.; MORCHON, R.; GONZALES-MIGUEL, J.; JUSTE, M.C.; SIMON, F.; MONTOYA-ALONSO, J.A. Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.197, n. 1-2, p.244-250, 2013.

CASADO, M. A.; SEVILLA M. A.; ALONSO, M. J.; MARIN, J.; SALAICES, M. Muscarinic receptors involved in modulation of norepinephrine release and vasodilatation in guinea pig carotid arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 271, n. 3, p. 1638-1646, 1994.

CHAINOT, G.P.; CONCORDET, D.; LEFEBVRE, H.P.; ORCEL, K.; BRAUN, J.P. Exercise does not induce major changes in plasma muscle enzymes, creatinine, glucose and total proteins concentrations in untrained beagle dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n.4, p. 222-224, 2002.

CHAUVET, A.; LACLAIR, J.; ELLIOTT, D.A.; GERMAN, J. Incorporation of exercise, using an underwater treadmill, and active client education into a weight management program for obese dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n.5, p.491-496, 2011.

COATS, A. J.; ADAMOPOULOS, S.; RADAELLI, A.; MCCANCE, A.; MEYER, T. E.; BERNARDI, L.; SOLDA, P. L.; DAVEY, P.; ORMEROD, O.; FORFAR, C. Controlled trial of physical training in chronic heart failure: exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. **Circulation Journal of American heart Association**, v.85, n.6, p.2119–2131, 1992.

CONLON, K.; KIDD, C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic actions on the heart. **Journal of Autonomic Nervous System**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 136-146, 1999.

CONRAADS, V.M.; VAN CRAENENCROECK, E.N.; MAEYER, C.; VAN BERENDONCK, A.M.; BECKERS, J.; VRINTS, C.J.; Unraveling new mechanisms of exercise intolerance in chronic heart failure. Role of exercise training. **Heart failure review**, v.18, n.1, p.65-77, 2013.

COSTA, F.; BIAGGIONE, I. Role of adenosine used in the sympathetic activation produced by isometric exercise in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 4, p. 1654-1660, 1994.

DEALMEIDA, J.C.; ALVES, C.L.; ABREU, L.C.; SATO, M.A.; FONSECA, F.L.; MONTEIRO, C.B.M.; VANDERLEI, L.C.M.; MACEDO JR, H.; TAVARES, C.M.; HERRERO, D.; RODRIGUES, M.M.R.; VALENTI, V.E. Involvement of the atrial natriuretic peptide in cardiovascular pathophysiology and its relationship with exercise. **International Archives of Medicine**, v. 5, n.4, p.1-4, 2012.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Exercise and cardiovascular health: get active to "AKTivate" your endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3118-3120, 2003.

EBISAWA, T.; OHTA, Y.; FUNAYAMA, M.; YAMANO, S.; MIZUNO, M.; MIZUNO, T.; KASUYA, A.; SAWADA, T.; LEE, J.; MIZUKOSHI, T.; UECHI, M. Plasma atrial natriuretic peptide is an early diagnosis and disease severity marker of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.94, n.3, p.717-721, 2013.

EBISAWA, T.; OHTA, Y.; FUNAYAMA, M.; MORITA, K.; UECHI, M. Clinical use of N – Terminal Pro – Brain Natriuretic peptide concentrations for assessing the severity and prognosis of myxomatous mitral disease in dogs. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.10, n. 3, p.234-242, 2012.

ERIKSSON, A.S.; HAGGSTROM, J.; PEDERSEN, H.D.; HANSSON, K.; JARVINEN, A.K.; HAUKKA, J.; KVART, C. Increased NT-proANP predicts risk of congestive heart failure in cavalier king Charles spaniels with mitral regurgitation caused by myxomatous valve disease. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.16, n.3, p. 141-154, 2014.

ETTINGER, S.J.; PROSEK, R. Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010, p. 1143-1159.

FERRASIN, L.; MARCORA, S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. **Journal of Comparative Physiology**. Volume 179, n.7, p.839 – 845, 2009.

FERRASIN, L.; MARCORA, S. A pilot study to assess the feasibility of a submaximal exercise test to measure individual response to cardiac medication in dogs with acquired heart failure. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 6, p. 725-737, 2007.

FERRAZ, G.C.; DANGELIS, F.H.F.; TEIXEIRA-NETO, A.R.; FREITAS, E.V.V.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.1, p. 256-259, 2008.

FIUZA-LUCES, C.; GARATACHEA, N.; BERGER, N.A.; LUCIA, A. Exercise is the real polypill. **Int. Union Physiology Science/ America Physiology Society**, v. 28, n.5, p.333-357, 2013.

FLETCHER, G. F.; CHAIR, G. B.; FROELICHER, V. F.; HARTLEY, L. H.; HASKELL, W. L.; POLLOCK, M. L. Exercise standards a statement for health professionals from the American Heart Association. **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 82, n. 6, p. 2286-2322, 1990.

FLETCHER, G.F.; ADES, P.A.; KLIGFIELD, P.; ARENA, R.; BALADY, G.J.; BITTNER, V.A.; COKE, L.A.; FLEG, J.L.; FORMAN, D.E.; GERBER, T.C.; GULATIM, M.; MADAN, K.; RHODES, J.; THOMPSON, P.D.; WILLIAMS, M.A. Exercise Standards for testing and training – A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 128, p.873-934, 2013.

FONFARA, S.; LOUREIRO, J.; SWIFT, S.; JAMES, R.; CRIPPS, P.; DUKES-MCEWAN, J. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. **The Veterinary Journal**, v.184, n.3, p.334-339, 2010.

FORNI, L.G.; SCHONER, W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 13, 2005.

FRANCO, R.P.; CHAMPION, T.; PASCON, P.P.E.; NETO, G.B.P.; JUNIOR, D.P.; CAMACHO, A.A. Utilização do maleato de enalapril, furosemida, espironolactona e suas associações em cães com doença degenerativa mixomatosa da válvula mitral. **ARS Veterinária**, v.27, n.2, p.98-93, 2011.

GIELEN, S.; LAUGHLIN, M.H.; OCONNER, C.; DUNCKER, D.J. Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations. **Progress in cardiovascular Diseases**, v.57, n.4, p.347-355, 2015.

GOETZE, J.P.; GORE, A.; MOLLER, C.H., STEINBRUCHEL, D.A.; REHFELD, J.F.; NIELSEN, L.B.; Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. **The FASEB Journal**, v.18, n.15, p.1928-30, 2004.

GOUTAL, C.M.; KEIR, I.; KENNEY, S.; RUSH, J.E.; FREEMAN, L.M. Evaluation of acute congestive heart failure in dogs and cats: 145 cases (2007-2008). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.20, n.3, p.330-337, 2010.

HAACK, K.K.V.; ZUCKER, H. Central mechanisms for exercise training-induced reduction in sympatho-excitation in chronic heart failure. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.126, n.10, p.1-7, 2014.

HAGGSTROM, J.; DUELUND, P. H.; KVART, C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 34, n. 5, p. 1209-1226, 2004.

HAGGSTROM, J., KVART, C., PEDERSEN, H. D. Acquired Valvular Heart Disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, volume 2. 6th ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2005, p. 1022-1035.

HAMLIN, R. L. Geriatric heart diseases in dogs. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 35, n.3, p. 597-615, 2005.

HASKELL, W.L.; LEE, I.M.; .; PATE, R. R.; POWELL, K. E.; BLARI, S. N.; FRANKLIN, B. A.; MACERA, C. A.; HEATH, G. W.; THOMPSON, P. D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the american college of sports medicine and the american heart association; **Medicine and Science in sports and exercise**, v.39, n.8, p.1423–1434, 2007.

HAYKOWSKY, M.J.; LIANG, Y.; PECHTER, D. A meta-analysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed. **Journal of American College Cardiology**, v. 49, n.24, p. 2329-2336, 2007.

HESPEL, P.; LIJNEN, P.; VAN HOOFF, R.; FAGARD, R.; GOOSSEENS, W.; LISSENS, W.; MOERMAN, E.; AMERY, A. Effects of physical endurance training on the plasma reninangiotensin-aldosterone system in normal man. **The Journal of Endocrinology**, v. 116, n. 3, p. 443-449, 1988.

HEZZEL, M.J.; BOSWOOD, A.; CHANG, Y.M.; MOONARMART, W.; SOUTTAR, K.; ELLIOT, J. The Combined Prognostic Potential of Serum High-Sensitivity Cardiac Troponin I and N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentrations in Dogs with Degenerative Mitral Valve Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 302–311, 2012.

HEZZEL, M.J.; BOSWOOD, A.; LOTTER, N.; ELLIOTT, J. The effects of storage conditions on measurements of canine N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.17, p.34 – 41, 2015.

HOLBROOK, T.C.; BIRKS, E.K.; SLEEPER, M.M.; DURANDO, M. Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. **Equine Exercise Physiology**, v.38, n.36, p.27-31, 2006.

HZU, A.; KITTLESON, M.D.; PALING, A. Investigation into the use of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.11, n.1, p. 563-570, 2009.

HULL, S.S.; VANOLI, E.; ADAMSON, P. B.; VERRIER, R. L.; FOREMAN R. D.; SCHWARTZ, P. J. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. **Circulation Journal of American Heart Association**, Baltimore, v. 90, n. 3, p. 548-552, 1994.

IELLAMO, F.; LEGRAMENTE, J. M.; MASSARO, M.; RAIMONDI, G.; GALANTE, A. Effects of residential exercise training on baroreflex sensitivity and heart rate variability in patients with coronary artery disease: A randomized, controlled study. **Circulation Journal of American Heart Association**, Baltimore, v. 102, n. 21, p. 2588-2592, 2000.

IKEDA, N.; YASU, T.; NISHIKIMI, T.; NAKAMURA, T.; KUBO, N.; KAWAKAM, M.; MOMOMURA, S.; SAITO, M. N-terminal pro-atrial natriuretic peptide and exercise prescription in patients with myocardial infarction. **Regulatory Peptides**, v.141, n.1-3, p.154-158, 2007.

KANNO, N.; KUSE, H.; KAWASAKI, M.; HARA, A.; KANO, R.; SASAKI, Y. Effects of pimobendan for mitral regurgitation in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v.69, n.4, p.373-377, 2007.

KELLIHAM, H.B.; OYAMA, M.A.; REYNOLDS, C.A.; STEPIEN, R.L. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.11, p.93-97, 2009.

KETHEYIAN, S.J.; BRAWNER, C. Exercise training in patients with chronic heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 3, n. 4, p. 273-281, 1999.

KINGWELL, B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 14, n. 12, p.1685-1696, 2000.

KITTLESON, M. D. Myxomatous atrioventricular valvular degeneration. In: KITTLESON, M. D.; KIENLE, R. D. **Small animal cardiovascular medicine**. St Louis: Mosby, 1998, p. 297-318.

KITTLESON, M.D.; JOHNSON, L. E.; PION, P. D. Submaximal exercise testing using lactate threshold and venous oxygen tension as endpoints in normal dogs and dogs with heart failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 21-27, 1996.

KLEFENS, P. C. O. **O biplot na análise fatorial multivariada**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

LARSEN, A. I.; AARSLAND, T.; KRISTIANSEN, M.; HAUGLAND, A.; DICKSTEIN, K. Assessing the effect of exercise training in men with heart failure: Comparison of maximal, submaximal and endurance exercise protocols. **European Heart Journal**, v. 22, n. 8, p. 684-692, 2001.

LARSEN, A.L.; HALL, C.; AUKRUST, P.; AARSLAND, T.; FARIS, P.; DICKSTEIN, K. Prognostic usefulness of an increase of N-terminal proatrial natriuretic peptide during exercise in patients with chronic heart failure. **The American Journal of Cardiology**, v.92, p.91-94, 2003.

LASSEN, E.D. Diagnóstico Laboratorial da Lesão Muscular. In: THRALL, M.A.; **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. 1ª edição, 2006, São Paulo, Roca.

LIJNEM, P.; HESPEL, P.; VAN OPPES, S.; FIOCCHI, R.; GOOSSENS, W.; VANDEN, E. E.; AMERY, A. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate and serum enzyme concentrations in trained and sedentary men . **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 1986.

LJUNGVALL I., HOGLUND K., TIDHOLM A., OLSEN, L.H.; BORGARELLI, M.; VENGE, P.; HAGGSTROM, J. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.1, p.153–159, 2010.

LJUNGVALL, I.; HOGLUND, K.; CARNABUCI, C.; TIDHOLM, A.; HAGGSTROM, J. Assessment of Global and Regional Left Ventricular Volume and Shape by Real -Time 3-Dimensional Echocardiography in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, n.6, p.1036-1043, 2011.

MAAIKE, G.J.G.; CEES, A.S.; HARRIETTE, F.V.; ARNOUD, V.D.L.; ARIE, C.M. et. al.; Effect of exercise training on autonomic derangement and neurohumoral activation in chronic heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v.13, n.4, p. 294-303, 2007.

MACDONALD, K. Myocardial disease: Feline. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, volume 2. 7th ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2010, p. 1328-1335.

MARKOS, F.; SNOW, H. M.; KIDD, C.; CONLON, K. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces heart rate variability in the anesthetized dog. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 539-541, 2001.

MATTOS, S.L.L. Marcadores Biomoleculares da Insuficiência Cardíaca e Coronariana. In: CAVALCANTI, I.L., CANTINHO, F.A.F., ASSAD, A. **Medicina Perioperatória**, Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p.57 - 62, 2006.

MILLARDI, R. Exercise physiology of the canine athlete. In: MILLIS, D.; LEVINE, D. **Canine Rehabilitation and Physical Therapy**, 2ed.lugar, Philadelphia: Saunders, 2014, p. 162-176.

MISBACH, C.; CHETBOUL, V.; CONCORDET, D.; GRUET, P.; SPERANZA, C.; HOFFMANN, A.C.; ROCHA, A.; BALOUKA, D.; PETIT, A.M.P.; TREHIOU-SECHI, E.; POUCHELON, J.L.; LEFEBVRE, H.P. Basal plasma concentrations of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in clinically healthy adult small size dogs: effect of body weight, age, gender and breed, and reference intervals. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.879-885, 2013.

MILSTEIN A.; ISLAM, M. S.; WAHAB, M. A.; KAMAL, A. H. M.; DEWAN, S. Characterization of water quality in shrimp ponds of different sizes and with different management regimes using multivariate statistical analysis. **Aquaculture International**, v. 13, p. 501-518, 2005.

MUCHA, C.J. Insuficiência valvular mitral. In: BELENERIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A.; GRAU, J.M. **Afecciones cardiovasculares en pequeños animales**. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007, p.261-274.

NOSTELL, K.; HAGGSTROM, J. Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of Racing. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 10, p. 105 – 109, 2008.

OKEEFE, J.H.; PATIL, H.R.; LAVIE, C.J.; MAGALSKI, A.; VOGEL, R.A.; MCCULLOUGH, P.A. Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. **Mayo Clinic Proceedings**, v.87, n.6, p.587-595, 2012.

OYAMA, M.A.; CHITTUR, S.V. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.8, 1307–1318, 2006.

OYAMA, M.A., SISSON D.D. Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 831-839, 2004.

OYAMA, M.A.; SINGLETARY, G.E. The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, p.545-558, 2010.

OYAMA, M. A. Using cardiac biomarkers in veterinary practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.43, n.6, p.1261-1272, 2013.

PASCON, J. P. E. **Estudo da Variabilidade da frequência cardíaca em cães**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

PASSINO, C.; SEVERINO, S.; POLETI, R.; PIEPOLI, M.F.; MAMMINI, C.; CLERICO, A.; GABUTTI, A.; NASSI, G.; EMDIN, M. Aerobic training decreases B-type natriuretic peptide expression and adrenergic activation in patients with heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v.47, n.9,p.1835-1839, 2006.

PARKES, D.G.; MAY, C.N. Urocortin: a novel player in cardiac control. **News in Physiological Sciences**, v. 15, n.5, p.264-268, 2000.

PERDERSEN, H. D. Diagnostico de la enfermedad de la valvula mixomatosa canina. **Waltham Focus**, v.10, n.1, p.3-9, 2000.

PEREIRA, E. Z. **Parâmetros ecocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca em fêmeas caninas com sepse de ocorrência natural devido à piometra e suas correlações com valores séricos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e proteína C reativa** . 2015. 83 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

PETRIC, A. D. Myxomatous mitral valve disease in dogs – an update and perspectives. **Macedonian Veterinary Review**, v.38, n.1, p. 1-8, 2015.

PHILLIPS, S.A.; VUCKOVIC, K.; CAHALIN, L.P.; BAYNARD, T. Defining the System: Contributors to Exercise Limitations in Heart Failure. **Heart failure clinics**, v. 11, n.1, p. 1-16, 2015.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PANZERA, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. **Experimental Animals**, v. 61. n. 5, p.511-515, 2012.

PIEPOLI, M.F.; CONRAADS, V.; CORAA, U.; DICKSTEIN, K.; FRANCIS, D.P.; JAARSMA, T.; MCMURRAY, J.; POIESKE, B.; PIOTROWICZ, E.; SCHMID, JP.; ANKER, S.D.; SOLAL, A.C.; FILIPPATOS, G.S.; HOES, A.W.; GIELEN, S.; GIANUZZI, P.; PONIKOWSKI, P.P. Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the heart failure association and the European association for cardiovascular prevention and rehabilitation. **European Journal Heart Failure Volume**, v.13, n.4, p. 347–357, 2011.

PROSEK, R.; SISSON, D.D.; OYAMA, M.A.; SOLTER, P.F. Distinguishing Cardiac and Noncardiac Dyspnea in 48 Dogs Using Plasma Atrial Natriuretic Factor, B-Type Natriuretic Factor, Endothelin, and Cardiac Troponin-I. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 238–242, 2007.

REYNOLDS, C.A.; BROWN, D.C.; RUSH, J.E.; FOX, P.R.; NGUYENBA, T.P.; LEHMKUHL, L.B.; GORDON, S.G.; KELLIHAN, H.B.; STEPIEN, R.L.; LEFBOM, B.K.; MEIER, C.K.; OYAMA, M.A. Prediction of first onset of congestive heart failure in dogs with degenerative mitral valve disease: the predict cohort study. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.14, n.1, p.193-202, 2012.

REYNOLDS, C.; OYAMA, M. Interés de lós biomarcadores em cardiologia. **Veterinary Focus**, v. 18, n.3, p. 2-6, 2008.

RIBEIRO, J.C.G. **Biomarcadores cardíacos em medicina veterinária – utilidade do Nt-proBNP na detecção de cardiomiopatia hipertrófica felina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

ROVIRA, S.; MUNOZ, A.; BENITO, M. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **Veterinari Medicina**. v.53, n.6, p. 333-346, 2008.

SCHOBBER, K.E. Biochemical markers of cardiovascular disease. In ETTINGER, J.; FIELDMAN (Eds). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2005, p. 940-947.

SERRES, F.; POUCHOLON, J.L.; POUJOL, L.; LEFEBVRE, H.P.; TRUMEL, C.; DASTE, T.; SAMPEDRANO, C.C.; GOUNI, V.; TISSIER, R.; HAWA, G.; CHETBOUL, V. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.11, n.2, p.103 -121, 2009.

SESSA, W. C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N.; WANG, J.; HINTZE, T. H. Chronic exercise in dogs increase coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circulation Research**, v. 74, n. 2, p. 349-353, 1994.

SILVA-FILHO, J. C. **Lactato sanguíneo em cães com insuficiência cardíaca congestiva decorrente de degeneração valvular mitral**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

SHAVE, R.; BAGGISH, A.; GEORGE, K.; WOOD, M.; SCHARHAG, J.; WHYTE, G.; GAZE, D.; THOMPSON, P.D. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms and implications. **Journal of the American College of Cardiology**, v.56, n.3, p. 169 – 176, 2010.

SHEPHARD, R.J.; BALADY, G.J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 99, n. 7, p. 963-972, 1999.

SISSON, D.D. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 34, n. 5, p. 1105-1126, 2004.

SISSON, D.D. Pathophysiology of Heart Failure. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. Volume 2 **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010, p. 1143-1159.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes em Cardiologia do Esporte e do Exercício da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.1, n.2, p.1-41, 2013.

SULLIVAN, M. J.; HIGGINBOTHAM, M. B.; COBB, R. R. Exercise training in patients with chronic heart failure delays ventilatory anaerobic threshold and improves submaximal exercise performance. **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 79, n. 2, p. 324-329, 1989.

STUEWE, S.R.; GWIRTZ, P.A.; MALLET, R.T. Exercise training increases creatine kinase capacity in canine myocardium. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**, v. 33, n.1, p. 92-98, 2001.