

ASPECTOS ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO MÚSCULO CARDÍACO DURANTE A TRANSIÇÃO ENTRE A DISFUNÇÃO E A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Warlen Pereira Piedade

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração de Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Prof^a Dr^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO MÚSCULO
CARDÍACO DURANTE A TRANSIÇÃO ENTRE A DISFUNÇÃO
E A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Warlen Pereira Piedade

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Maeli Dal Pai

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular,
Estrutural e Funcional.

Prof^ª Dr^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Piedade, Warlen Pereira.

Aspectos estruturais e moleculares do músculo cardíaco durante a transição entre a disfunção e a insuficiência cardíaca / Warlen Pereira Piedade. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20603002

1. Coração - Doenças. 2. Coração - Ventrículo esquerdo. 3. Miocárdio - Aspectos moleculares. 4. Insuficiência cardíaca. 5. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Disfunção cardíaca; Exercício aeróbico; Insuficiência cardíaca; Ventrículo esquerdo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Glória e Valdir por terem permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar minhas angústias e dúvidas, estendendo a mão sempre que não encontrava chão firme a seguro para me apoiar. Vocês são meus verdadeiros mestres e mentores, e agradeço muito por terem dedicado suas vidas, amores e trabalho para me possibilitarem a oportunidade de realizar meus sonhos e conquistas.

A vitória desta conquista dedico com todo o meu amor, unicamente, a vocês.

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente ao meus pais e incondicionais companheiros e aos meus irmãos Lucas e Beatriz que, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio, amor e carinho.

A minha orientadora Maeli, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão, competência, puxões de orelha, e pelo cuidado e carinho, por ter sido uma segunda mãe e amiga.

Ao Rodrigo, à Luana e à Paula por terem sido meus parceiros em todas as empreitadas, me dado a oportunidade de crescer sempre e nunca terem duvidado do meu potencial, além de sempre me fazerem rir muito, mesmo dentro de um container cheio de ratos.

Às Fernandas (Carani e Losi), ao Bruno e à Raquel por terem me ensinado tudo o que sei (ate revelar western no escuro dançando single ladies), por terem me ajudado sempre que precisei, independente do motive e por serem meus grandes amigos.

Aos meus grandes amigos e cegonhas André (Dói), Mayara (Coli), Thiago (Sobrinho), André (Qualy) e Fernando (Cupido) por terem me ajudado a enfrentar os momentos mais difíceis, minhas frustrações e decepções, além de estarem sempre perto nos meus momentos mais felizes, adorei ser cegonha com vocês.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (Tatá, Ivan, Jason, Léo, Edson, Rondi, Paulinha, Aninha, Joarez, Rafa e Carlos), por fazerem eu me sentir tão bem no laboratório. pelos momentos de alegria compartilhados, pelo companheirismo, pelos agradáveis e inesquecíveis momentos de convivência.

Ao professor Dr. Robson Carvalho, pelo incentivo, profissionalismo e boa vontade em ajudar em todas as vezes que eu o procurei para sanar alguma dúvida.

Às minhas queridas amigas de IC, Jéssica e Francielle, por terem me ajudado nos momentos de correria, por terem dado a oportunidade de participar do crescimento de vocês e poder ensinar como não se deve fazer as coisas, e por terem muita paciência comigo.

À minha segunda família, a Palacete, especialmente à Dianne (Fexa), Daiany (D-vis), Bruno (Miss), Anderson (Sensor), Monique (Alfa), Mayaras (Macedao e Yoko), Jeanne e Camille por ter sempre feito a Palacete ser meu lar estarem sempre presentes quando precisava rir ou chorar.

Às minhas amigas do sucesso, Naiara, Mayara e Jamile, por me recuperarem em momentos de estresse e me feito ser uma pessoa muito feliz e completa.

Aos meus amigos do departamento, Pei, Pejô, Dofa, Joyce, Bia, Lesma, Jaque, Esponja, Sopotão, Bruno e Brenda pela oportunidade de convivência e pelos ótimos e hilários almoços e corridas.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, torceram por mim e contribuíram para a realização desta dissertação.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

Geroge Bernard Shaw

Sumário

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO.....	1
O músculo cardíaco	1
Insuficiência cardíaca	6
Remodelação cardíaca	7
Hipertrofia cardíaca	8
Fibrose miocárdica	11
MicroRNAs e a IC	13
Exercício Físico Aeróbico	15
OBJETIVO GERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
METODOLOGIA.....	17
Animais e grupos experimentais.....	17
Protocolo Experimental	18
Determinação do limiar de lactato	20
Treinamento aeróbico	21
Ecocardiograma	22
Dados Anatômicos.....	23
Análise Morfológica	23
Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	24
a) Extração de RNA com RNasy (Quiagen).....	24
b) <u>Análise da integridade do RNAm</u>	25
c) Tratamento do RNA com DNase	25
d) Reação de Transcrição Reversa e PCR quantitativo em Tempo Real de miRNA (RT-qPCR):	25
e) Reação de Transcrição Reversa (RT) mRNA	26
f) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) mRNA dos grupos de 28 semanas.....	26
g) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) mRNA dos grupos de 18 semanas.....	27
Forma de análise dos resultados	28
RESULTADOS	29
Ecocardiograma 18 Semanas e 28 Semanas.....	29
Desempenho do treinamento	30

Sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca	31
Dados Anatômicos.....	32
Análise morfológica	32
Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	33
<i>Micro-RNAs relacionados à fibrose cardíaca</i>	33
<i>Genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica</i>	34
<i>Genes relacionados à degradação proteica e hipertrofia fisiológica</i>	36
<i>Genes relacionados à fibrose cardíaca</i>	38
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	55
Anexo 1.....	55
Anexo 2.....	57

RESUMO

A remodelação cardíaca (RC) é um processo tempo dependente que promove alterações celulares e moleculares que se manifestam clinicamente através de alterações no tamanho, forma e função do coração após a agressão, sendo a insuficiência cardíaca (IC) o estágio final deste processo. A IC caracteriza-se por uma incapacidade do coração de bombear sangue de acordo com as necessidades metabólicas teciduais, ou pode fazê-lo adequadamente à custa da elevação da pressão de enchimento ventricular. Isso é decorrente, em parte, pela presença da hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose, que diminuem a atividade propulsora do coração.

O treinamento físico aeróbico é considerado uma conduta proposta e aceita para minimizar as alterações cardíacas na IC. No entanto, pouco é sabido sobre os efeitos do treinamento sobre os aspectos morfológicos e moleculares no músculo cardíaco durante a transição entre a disfunção cardíaca e a IC. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações morfológicas e moleculares do coração e o efeito do treinamento aeróbico durante a transição da disfunção cardíaca para a IC no modelo de estenose aórtica em ratos. Foram utilizados 52 ratos *Wistar* machos (90 a 100g) com 21 dias de vida. Os animais foram divididos em 6 grupos (Sham 18, EAo 18, Sham 28, ShamTR, EAo 28 e EAoTR) e após 18 semanas da cirurgia de indução da estenose aórtica (EAo) supralvar, quando os animais apresentavam disfunção cardíaca, diagnosticada por ecocardiograma, parte dos animais de dois grupos (Sham 18 e EAo 18) foram eutanasiados e o ventrículo esquerdo coletado para as análises histoquímica e molecular.

O restante foram submetidos a uma programa de treinamento aeróbico em esteira com intensidade relativa ao limiar de lactato e tempo progressivo (EAoTR e ShamTR) ou não (Sham 28 e EAo 28). Após 28 semanas, os animais dos grupos EAo 28, Sham 28, ShamTR e EAoTR foram submetidos à análise ecocardiográfica, eutanasiados e o ventrículo esquerdo coletado para as análises histoquímica e molecular. A coloração do Picrosirius red foi utilizada para a análise da morfologia e quantificação do colágeno da matriz extracelular. A análise da expressão gênica e dos miRNAs foi realizada através do RT-qPCR. Os animais do grupo EAo 18 apresentaram deterioração da estrutura cardíaca sem apresentar os sinais de IC, aumento da expressão gênica dos componentes colágeno e elástico da matriz, aumento da expressão dos miR-21 e miR-29b, dos marcadores da hipertrofia patológica, da citocina inflamatória TNF-alfa, mas sem alteração no marcador de hipertrofia fisiológica. Já os animais do grupo EAo 28 apresentaram sinais de IC, deterioração da estrutura e comprometimento da função cardíaca,

aumento da fibrose no ventrículo, aumento da expressão do miR-21 e diminuição do miR-29b, aumento dos marcadores da hipertrofia patológica e dos marcadores de degradação proteica. No grupo submetido ao treinamento aeróbico (EAoTR), a deterioração da estrutura e função cardíaca foi prevenida em associação com a fibrose.

Nossos dados mostraram que durante a transição entre a disfunção cardíaca e a IC ocorre o aumento do catabolismo, diminuição do anabolismo celular, aumento da inflamação e a fibrose. O treinamento aeróbico realizado durante a transição entre a disfunção cardíaca e a IC teve efeitos benéficos sobre a estrutura e função cardíaca, diminuiu a inflamação, favoreceu a fibrose cardíaca sem atenuar a ação de genes relacionados com o catabolismo e anabolismo celular.

ABSTRACT

Cardiac remodeling (CR) is a time-dependent process that promotes cellular and molecular changes manifested clinically by changes in size, shape and function after injury, and heart failure (HF), the final stage of the process. HF is characterized by an inability of the heart to pump blood tissue in accordance with the metabolic needs, or to do so at the expense of adequately elevated ventricular filling pressure. This is due, in part, by the presence of cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, which decrease the driving activity of the heart.

Aerobic exercise training is considered a conduct proposed and accepted to minimize cardiac changes in HF. However, little is known about the effects of training on morphological and molecular aspects in the heart muscle from cardiac dysfunction to HF. The objective of this study was to evaluate the morphological and molecular changes of the heart and the effect of aerobic training from cardiac dysfunction to HF in aortic stenosis model in rats. Fifty two male Wistar rats were used (90 to 100 g) with 21 days of life. The animals were divided into 6 groups (Sham 18, AS 18, Sham 28, Sham-ET, AS 28 and AS-ET) and after 18 weeks of induction of aortic stenosis surgery (AS) supraaortic, when the animals had cardiac dysfunction diagnosed by echocardiogram the animals of both groups (Sham 18 and AS 18) were euthanized and the left ventricle collected for immunohistochemistry and molecular analysis.

The remaining animals were subjected to an aerobic training program on a treadmill with relative intensity to the lactate threshold and progressive time (AS-ET and Sham-ET) or not (Sham 28 and AS 28). After 28 weeks, the animals of the AS 28, Sham 28, Sham-ET and AS-ET underwent echocardiography, euthanized and the left ventricle collected for immunohistochemistry and molecular analysis. The picrosirius red staining was used to analyze the morphology and quantification of extracellular matrix collagen. The analysis of gene expression and of miRNAs was performed by RT-qPCR. The animals of group 18 SVAS showed deterioration of cardiac structure without showing signs of HF, increased gene expression of collagen and elastic components of the matrix, increased expression of miR-21 and miR-29b of pathological hypertrophy markers, a inflammatory, but no change in physiological hypertrophy marker cytokine. The animals of the AS 28 showed deterioration of the structure and impaired cardiac function with signs of HF, increased fibrosis in the ventricle, increased expression of miR-21 and decreased of miR-29b, increase in pathological hypertrophy markers and protein degradation markers. The group submitted to aerobic

training (AS-ET), the deterioration of cardiac structure and function was prevented in association with fibrosis.

Our data showed that during the transition from cardiac dysfunction and HF increased the cardiac catabolism, inflammation and fibrosis and the anabolism decreased. Aerobic training conducted during the transition from cardiac dysfunction to HF had beneficial effects on cardiac structure and function, decreased inflammation, favored cardiac fibrosis without attenuating the action of genes related to cell anabolism and catabolism.

INTRODUÇÃO

O músculo cardíaco

O músculo cardíaco é constituído por células alongadas e ramificadas, chamadas de fibras, interligadas entre si através de junções intercelulares complexas. Apresentam o arranjo dos filamentos contráteis muito similares às do músculo esquelético, com um ou dois núcleos centrais. Essas células são envolvidas por uma bainha de tecido conjuntivo com abundantes capilares sanguíneos¹.

Nas preparações histológicas do músculo cardíaco, uma característica o distingue dos demais tipos de músculo, as linhas transversais que aparecem em intervalos irregulares ao longo da célula (Figura 1)². Essas linhas são denominadas discos intercalares e representam locais de fixação altamente especializados entre células adjacentes. Esta ligação linear célula-a-célula resulta em "fibras" de comprimento variável. Assim, ao contrário das fibras musculares estriadas esqueléticas que representam células individuais multinucleadas, as fibras musculares cardíacas consistem de várias células cilíndricas, unidas nas extremidades - através dos discos intercalares, os cardiomiócitos, podendo ser ramificadas (Figura 1)^{1,2}.

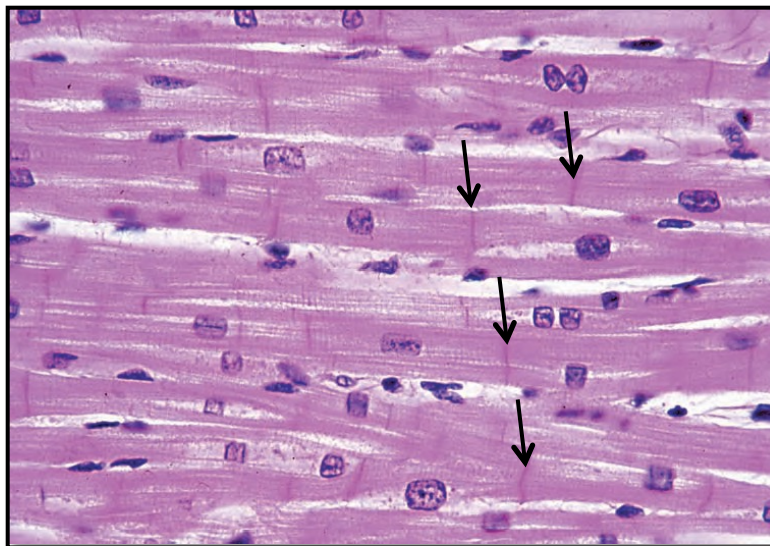


Figura 1. Corte longitudinal do tecido muscular cardíaco. Setas indicam os discos intercalares. Os discos representam as ligações célula-a-célula do tecido cardíaco. Também são evidenciadas as ramificações do tecido cardíaco. Aumento de 360 vezes. Adaptado de Ross & Pawlina, 2010²

Nos discos intercalares, encontram-se três especializações juncionais principais, as zônulas de adesão, que representam a principal especialização da membrana e servem para

ancorar os filamentos de actina aos sarcômero terminais, os desmossomos, que unem as células cardíacas e impedindo que elas se separem durante os movimentos de contração e as junções comunicantes que são responsáveis pela continuidade iônica entre os cardiomiócitos adjacentes¹ (Figura 2).

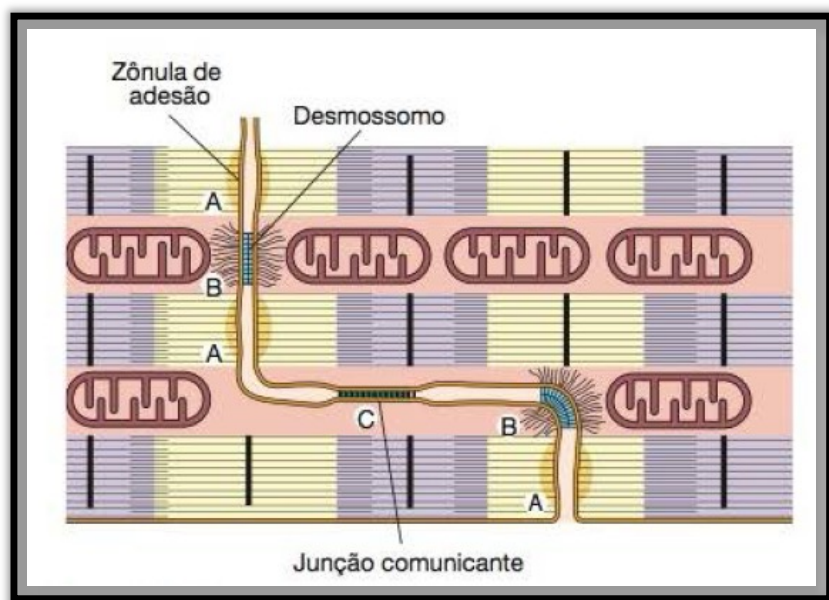


Figura 2. Demonstração esquemática do disco intercalar. (A) zônulas de adesão, (B) desmossomos e (C) Junções comunicantes. Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2013¹.

Quando observadas ao microscópio óptico, as fibras musculares cardíacas mostram estriações transversais pela alternância de faixas claras e escuras, assim como as fibras musculares esqueléticas. Ao microscópio de polarização, a faixa escura é anisotrópica e, por isso, recebe o nome de Banda A, enquanto a faixa clara, ou banda I, é isotrópica. No centro da banda I nota-se uma linha transversal escura – a linha Z. Essas estriações se devem a repetições de unidades chamadas de sarcômero. Cada sarcômero é formado pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas e contém uma banda A separando duas semibandas I. A banda A apresenta uma zona mais clara no seu centro, a banda H. A disposição dos sarcômero coincide nas várias miofibrilas da fibra muscular, e as bandas formam estriações paralelas transversalmente ao plano da fibra que é característico das fibras estriadas (Figura 3)¹.

Analisando os sarcômeros na microscopia eletrônica observa-se a existência de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente interagindo com diversas outras proteínas, como desmina, que une uma miofibrila a outra e a distrofina que ligam as proteínas do sarcoplasma ao sarcolema. Da linha Z, partem os

filamentos finos que vão até a borda da banda H. Os filamentos grossos ocupam a região central do sarcômero (Figura 3).

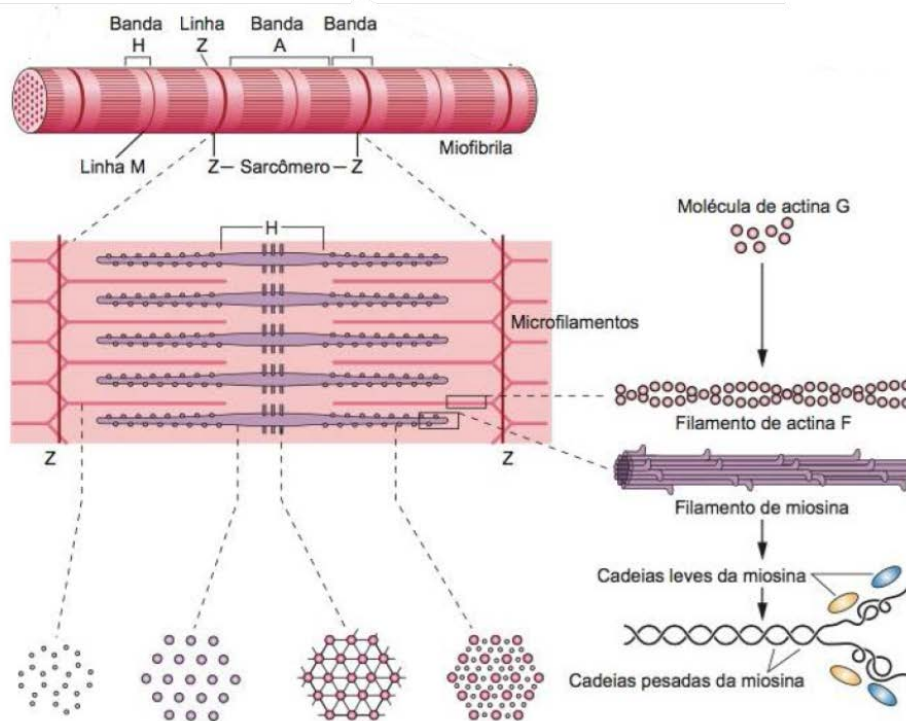


Figura 3. Diagrama da estrutura e posição dos filamentos finos e grossos do sarcômero. A estrutura molecular desses elementos é mostrada à direita. Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2013. Ilustração de Sylvia Colard Keene¹.

As principais proteínas da miofibrila são a actina, a miosina, a tropomiosina e a troponina. Os filamentos grossos são constituídos pela molécula de miosina e as demais proteínas compõem o filamento fino. A tropomiosina é uma molécula longa e fina constituída de duas cadeias polipeptídicas enroladas e se localizam ao longo dos sulcos entre os dois filamentos de actina. Já a troponina é um complexo de três subunidades: a TnT, que se liga a tropomiosina, TnC, que tem afinidade pelo cálcio e a TnI, que cobre o sítio ativo da actina, impedindo sua interação com a miosina (Figura 4)^{1,2}.

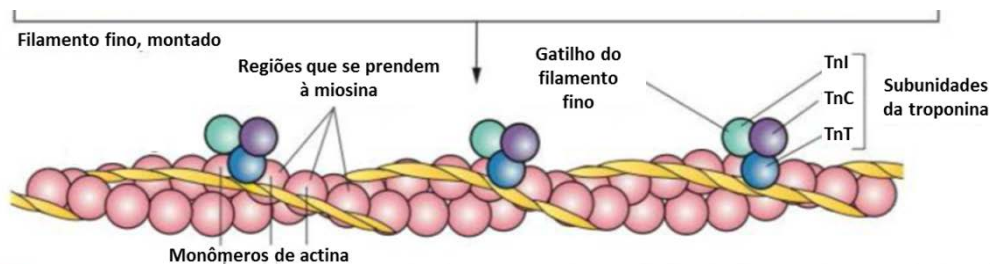


Figura 4. Desenho esquemático que mostra as três principais proteínas (actina, tropomiosina e troponina) dos filamentos finos e a estrutura desses filamentos. Adaptado Junqueira e Carneiro, 2013¹.

A miosina é uma molécula grande em forma de bastão formada por dois peptídeos enrolados em hélice. Em uma das extremidades ela apresenta uma saliência globular, que apresenta atividade ATPásica. É nesta parte que ocorre a hidrólise de ATP para liberar a energia utilizada na contração (Figura 5).

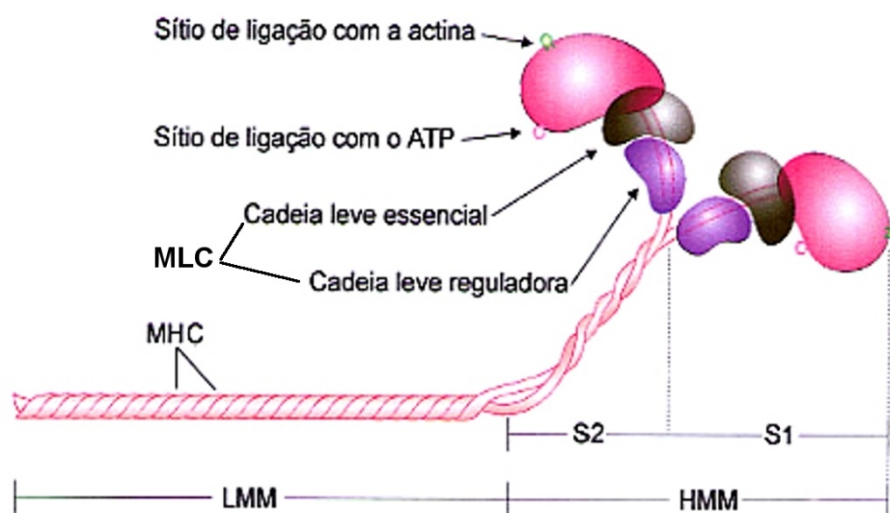


Figura 5. Esquema da molécula de miosina. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas da miosina (MHC) e quatro cadeias leves da miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas e gerarem as meromiosinas leves (LMM) e meromiosinas pesadas (HMM). As HMM são compostas pela porção globosa S1 e pela porção α -hélice em forma de bastão, S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1³.

A contração muscular depende da concentração de cálcio no sarcoplasma e no retículo sarcoplasmático (RS), rede de cisternas do retículo endoplasmático liso que envolve miofilamentos é o responsável pelo armazenamento desse íon. Quando o estímulo nervoso, oriundo da placa motora, chega no retículo através de reentrâncias tubulares da membrana plasmática da fibra, os túbulos T ou transversais,¹ o estímulo possibilita a liberação de cálcio

do RS que será utilizado para a contração muscular. Os túbulos T cardíacos não são tão bem organizados como na musculatura esquelética, eles não separam feixes de miofilamentos em miofibrilas discretas² e penetram nos feixes de miofilamentos ao nível da linha Z, entre as extremidades da rede do retículo sarcoplasmático. Assim, existe apenas um túbulo T por sarcômero no músculo cardíaco.² As pequenas cisternas terminais do retículo sarcoplasmático estão em grande proximidade com os túbulos T, para formar uma díade ao nível da linha Z². Esses túbulos permitem que a despolarização chegue no mesmo instante em todos os retículos e garanta que a contração seja homogênea independente da espessura da fibra¹ (Figura 6). Os túbulos T são maiores e mais numerosos no músculo do ventrículo do que no músculo esquelético e menos numerosos, no entanto, no músculo cardíaco do átrio².

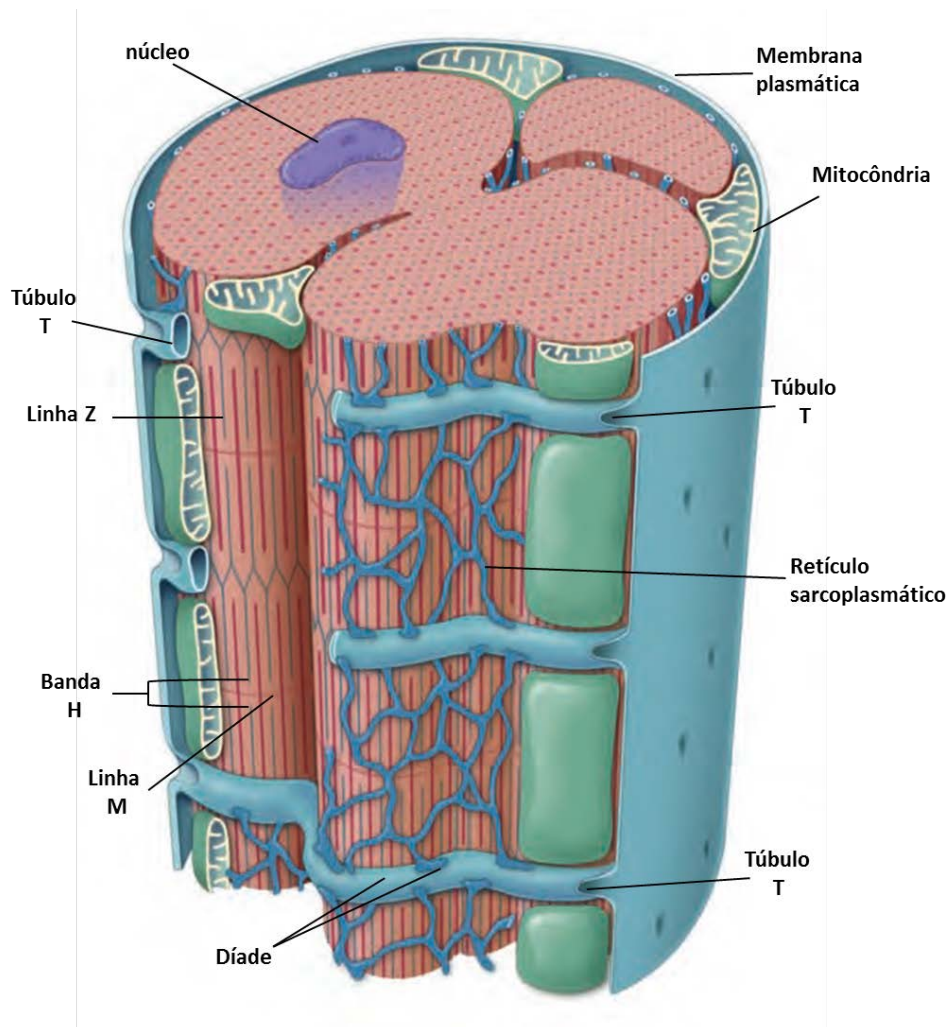


Figura 6. Esquema da organização da fibra muscular cardíaca. Adaptado de Ross & Pawlina, 2010².

A contração muscular cardíaca ocorre pela interação dos filamentos finos de actina com os grossos de miosina, aumentando a área de sobreposição dos filamentos e diminuindo

o tamanho do sarcômero. A despolarização é iniciada no marcapasso e chega ao túbulo T, na região das díades, ativando os sensores de voltagem das cisternas do retículo sarcoplasmático. Os canais de Ca^{2+} voltagem dependente liberam Ca^{2+} no citoplasma. Os íons Ca^{2+} liberados no citoplasma estimulam a abertura de mais canais de Ca^{2+} cálcio dependentes e promovem uma liberação de Ca^{2+} adicional (Figura7). O Ca^{2+} permite a interação da miosina com a actina, pois libera a sua área de contato que estava sendo bloqueada pela interação com o complexo troponina-tropomiosina; os íons Ca^{2+} interagem com a unidade TnC da troponina, o que muda a sua configuração espacial e empurra a tropomiosina para dentro do sulco da hélice de actina, deixando exposta a região de ligação com a miosina. A cabeça da miosina interage com a actina e a enzima ATPase hidrolisa o ATP e libera energia promovendo o deslizamento da actina sobre o filamento de miosina. Nem todas as cabeças de miosina interagem com o filamento de actina ao mesmo tempo. Durante a contração, o deslizamento da actina libera novos pontos de interação e outras cabeças de miosina tornam-se capazes de hidrolisar o ATP e fazerem a ligação. Assim que a cabeça de miosina volta a interagir com outra molécula de ATP ela volta ao estado de repouso e se prepara para um novo ciclo.

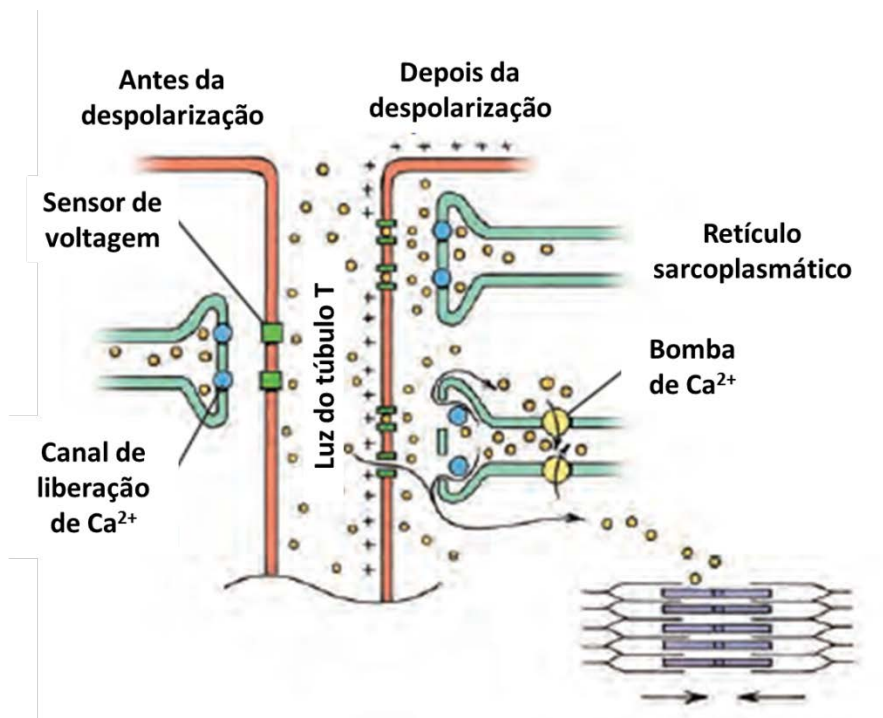


Figura 7. Movimento dos íons de cálcio durante a despolarização da membrana na musculatura cardíaca.

Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica debilitante e progressiva na qual o coração é incapaz de bombear sangue de acordo com as necessidades metabólicas teciduais, ou pode fazê-lo adequadamente à custa da elevação da pressão de enchimento ventricular. Estima-se que haja cerca de 26 milhões de portadores de IC em todo o mundo⁴, com 3,6 milhões de novos casos surgindo a cada ano, contudo esses dados podem estar subestimados tendo em vista que muitos países do mundo não divulgam os dados epidemiológicos relacionados com a IC. No Brasil, de acordo com o IBGE, de 190 milhões de habitantes sete milhões são portadores dessa síndrome⁵.

Com o avanço na elaboração de novos tratamentos as taxas de mortalidade melhoraram nas últimas décadas⁶. Os custos são exorbitantes, sendo 2% do total gasto com cuidados à saúde, destinados à IC. Dos pacientes que sofrem de IC sintomática, a principal preocupação, além de reduzida expectativa de vida, é a piora da qualidade de vida. A incidência de IC ascendeu mais de 150% nas duas últimas décadas e o número de pacientes com essa síndrome continua aumentando em função do desenvolvimento farmacológico, terapêutico e de técnicas e estratégias cirúrgicas que melhoram a sobrevivência após infarto agudo do miocárdio e outras condições cardiovasculares⁷.

Além de estratégias farmacológicas para o tratamento da IC, o treinamento físico aeróbico vem sendo considerado uma conduta proposta e amplamente aceita para reduzir a hospitalização e combater os diferentes aspectos que determinam um prejuízo na qualidade de vida dos pacientes com IC⁸ e é recomendado, de acordo com a New York Heart Association (NYHA), como tratamento da IC para alguns pacientes⁹.

A IC é a via final comum de muitas formas de doenças cardiovasculares que causam agressões ao miocárdio, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, coronariopatias¹⁰ ou a estenose aórtica (EAO) que promovem o desenvolvimento gradual de alterações ventriculares¹¹⁻¹⁴. A injúria ao tecido cardíaco determina o início do processo de remodelação cardíaca (RC).

Remodelação cardíaca

A remodelação cardíaca (RC) pode ser definida como uma alteração na expressão gênica resultando em alterações moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração após a agressão^{11,15}. Esse processo é tempo dependente, inicialmente com caráter adaptativo, representando uma

tentativa do organismo de compensar a sobrecarga de pressão e/ou volume, no entanto, posteriormente, contribuirá para o surgimento e a progressão da IC¹⁶. Constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento da disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca^{13,17,18}.

A disfunção cardíaca é definida como anormalidades do relaxamento e/ou contração cardíaca sem apresentar retenção hídrica e intolerância ao esforço¹⁹. Pode ocorrer em diferentes patologias cardíacas, tais como isquemia, insuficiência coronariana, infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica, doença cardíaca valvular e estenose aórtica²⁰⁻²². O estresse biomecânico originado é transmitido por meio da membrana citoplasmática dos cardiomiócitos por mecanismos ainda não plenamente elucidados. É bem provável que os canais iônicos sensíveis ao estiramento, as integrinas e outras proteínas estruturais atuam nesse processo e, em conjunto, estabeleçam uma ligação entre a matriz extracelular, o citoesqueleto, o sarcômero, as proteínas envolvidas na homeostasia do cálcio e o núcleo²³. Diferentes modelos experimentais têm sido propostos para o estudo da transição entre disfunção cardíaca e IC através da sobrecarga pressórica como a estenose da artéria renal²⁴, da aorta abdominal²⁵ e nos ratos espontaneamente hipertensos²⁶.

A RC ventricular, a nível microscópico e macroscópico, é dividida em três diferentes componentes: 1) alterações na biologia do miócito (expressão dos genes fetais das cadeias pesadas da miosina, perda de miofilamentos, hipertrofia, miocitólise e dessensibilização adrenérgica); 2) alterações estruturais miocárdicas a nível celular (perda de cardiomiócitos por necrose e apoptose e alterações na matriz extracelular); e 3) alterações na geometria da câmara ventricular esquerda (dilatação da cavidade do ventrículo esquerdo, aumento da esfericidade e fibrose subendocárdica)¹⁵.

O resultado final de todo remodelamento é a diminuição do débito cardíaco e dispnéia ou edema com pressões de enchimento cronicamente elevados²⁷.

Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como excêntrica ou concêntrica com base na geometria dos cardiomiócitos. A hipertrofia excêntrica refere-se a um aumento da massa cardíaca, com aumento de volume da câmara, apresentando cavidades dilatadas, sendo caracterizada por um padrão de adição do sarcômeros em série (Figura 8)²⁸.

Já a hipertrofia concêntrica refere-se a um aumento da espessura relativa da parede livre, da espessura septal e da massa cardíaca, com uma pequena ou nenhuma mudança no

volume da câmara, e é caracterizada por um padrão paralelo de adição do sarcômero (Figura 8)²⁸.

A hipertrofia cardíaca também pode ser definida de acordo com sua origem sendo chamada de hipertrofia fisiológica quando é reversível e molecularmente caracterizada pelo aumento na expressão de genes sarcoméricos como, a α -miosina de cadeia pesada (MHC) e a α -actina cardíaca que aumentam o débito cardíaco, para atender a demanda metabólica aumentada, fato que normalmente ocorre durante a gravidez e durante a realização de exercícios físicos (Figura 8)²².

A hipertrofia patológica é caracterizada, em nível molecular, pela expressão de um padrão de genes fetais e pode ser gerada por sinais de estresse patológico (ativação neuro-hormonal, estenose aórtica e inflamação), inicialmente sendo compensatória, com a diminuição da tensão na parede e preservação do desempenho contrátil, podendo, finalmente, ser descompensada e levar à IC (Figura 8)²².

A hipertrofia patológica desenvolve-se a partir de alguns mecanismos indutores: o aumento dos níveis de cálcio intracelular (um dos eventos iniciais neste processo²⁹), a ativação celular induzida por fatores como o TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*), a endotelina 1 (ET-1), as catecolaminas e a angiotensina II (Ang II)³⁰. A atuação da Ang II se dá através da ativação de receptores AT-1 (do inglês, *Angiotensin II receptor type 1*), e através da regulação positiva de subunidades da proteína GPCR (do inglês, *G protein-coupled receptors*) promovendo a hipertrofia cardíaca associada à disfunção cardíaca³¹⁻³³. Além disso, Ang II ativa três membros da família das quinases de proteínas ativadas por mitógenos, MAPK (do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*), ERKs (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*), JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinases*), p38³² (do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinases*) e dos seus ativadores, da cardiotrofina-1 (CT-1, do inglês, *Cardiotrophin-1*), da fosfolipase C, D e A2 (PLC, PLD e PLA2, do inglês, *Phospholipase C, D and A2*), do IGF (do inglês, *Insulin-like growth factor*), do FGF (do inglês, *Fibroblast growth factors*), da PKC (do inglês, *Protein kinase C*) e outras moléculas²².

As vias de sinalização dependentes das MAPK aumentam a expressão de vários proto-oncogenes de resposta rápida como c-fos (do inglês, *human homolog of the retroviral oncogene v-fos*), c-myc (do inglês, *V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e c-jun (do inglês, *Jun proto-oncogene*) e estão envolvidos na proliferação, diferenciação e

transformação celular, bem como na autofagia, sendo assim importante na fisiopatologia da IC³⁴.

Uma das vias de sinalização intracelular estimulada pelos receptores de angiotensina, AT-1 e AT-2, é a via do fator NFκB (do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)³⁵. Foi demonstrado o papel crucial da ativação da cascata de sinalização do fator nuclear NFκB, envolvido no crescimento celular, fibrose ou apoptose, e dependendo do contexto promove a iniciação da hipertrofia cardíaca e posterior progressão para IC^{35,36}. Desta forma, a autofagia cardíaca é um processo que contribui para a transição da hipertrofia cardíaca compensada para a IC³⁷. A autofagia, um mecanismo celular de reciclagem de proteínas e organelas, encontra-se ativada nos cardiomiócitos insuficientes, como resposta ao estresse biomecânico^{37,38}. A *beclina-1* (BECN1), uma proteína necessária para a formação do autofagossomo, desempenha um papel primordial nesse processo. Demonstrou-se que a inibição da expressão gênica de um dos alelos que codificam a beclina-1 diminui a autofagia dos cardiomiócitos e o remodelamento induzido pelo estresse biomecânico³⁸. O remodelamento ventricular é um processo progressivo de dilatação, hipertrofia, perda de cardiomiócitos, aumento da fibrose intersticial e disfunção ventricular³⁹, presente na IC.

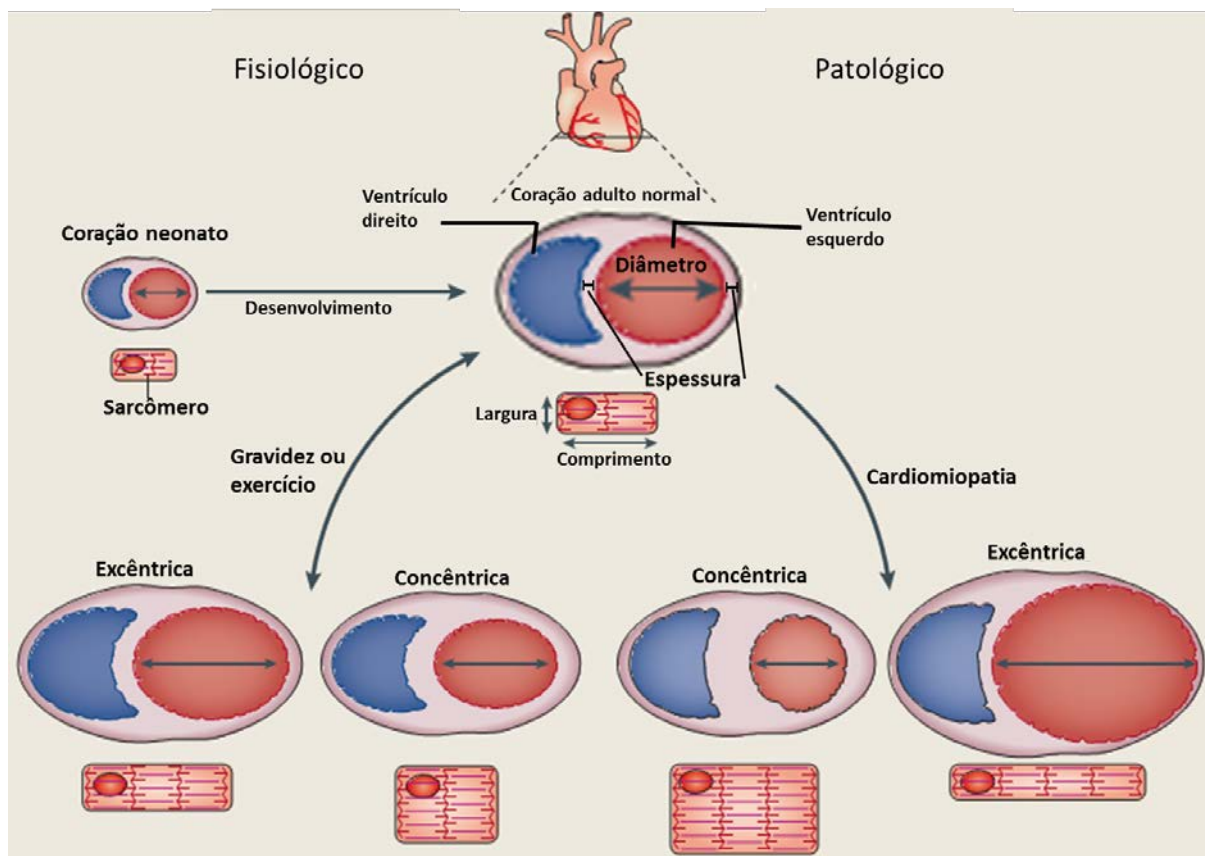


Figura 8. Geometria da hipertrofia cardíaca. O coração apresenta a capacidade de aumentar seu tamanho, dependendo do estímulo, resultando na hipertrofia ventricular ou disfunção cardíaca. A hipertrofia diminui o estresse da parede do ventrículo através do aumento da espessura da parede. Este comportamento segue a lei de Laplace, na qual o estresse da parede do ventrículo (ou tensão) é uma função inversa da espessura da parede ($\text{tensão} = (\text{pressão} \times \text{raio}) / (2 \times \text{espessura da parede})$). A disfunção cardíaca, se destaca por apresentar, principalmente, hipertrofia concêntrica caracterizada por uma redução da dimensão da câmara e um aumento da espessura da parede e do septo, e os cardiomiócitos normalmente aumentam em espessura mais do que em comprimento (isto resulta numa diminuição da relação entre comprimento e largura). Com a continuidade do estímulo causador da hipertrofia cardíaca o coração perde a habilidade de suportar o crescimento do miocárdio e promove uma dilatação da câmara e posteriormente IC (Adaptado Maillet et al., 2013).

Fibrose miocárdica

A fibrose miocárdica está associada à alteração da estrutura normal do coração considerando-se os cardiomiócitos e a uma deposição excessiva das proteínas da matriz extracelular⁴⁰; foi observada em várias condições patológicas como a sobrecarga de pressão, a isquemia e durante o envelhecimento normal⁴¹. Foi demonstrado que através da constrição aórtica em ratos, que a via do TGF- β 1 ativa a transição endotelial-mesenquimatosa, a qual, por sua vez, aciona a fibrose⁴². O TGF- β 1 promove essa transição pela ativação das moléculas Smad2 e Smad3⁴² que formam um complexo com a Smad4 e é translocado para o núcleo onde

ativa a expressão de genes específicos, como o COL1 (do inglês, *Collagen type I*), COL3 (do inglês, *Collagen type II*) e COL4 (do inglês, *Collagen type IV*) (Figura 9)⁴³. Outro membro da família do TGF- β , a *bone morphogenic protein 7* (BMP-7), um antagonista da via do TGF- β , inibe essa transição, com uma ação protetora contra a fibrose⁴². Isso mostra a interligação entre hipertrofia e fibrose e revela uma molécula que pode prevenir ou reverter a fibrose miocárdica⁴².

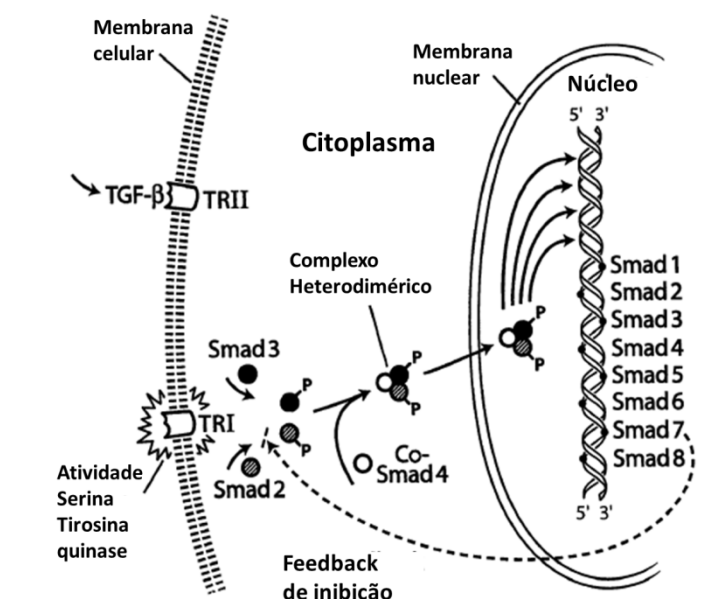


Figura 9. Via de sinalização da Smad ativando ou desativando genes específicos.

Essa situação é bastante complexa, em particular, já que a deposição de matriz extracelular, por um lado, ajuda na contenção de danos, enquanto, por outro lado, prejudica a função cardíaca, induz a arritmia, e agrava a progressão para a IC⁴⁴.

Uma das vias relacionadas à fibrose miocárdica é a do PI3K (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*), estimulada por receptores de tirosina quinase ativados por ligantes como o IGF, o FGF, o TGF, bem como de proteína G de receptores acoplados (GPCRs), culminando na translocação pela membrana da proteína Akt, também conhecida como proteína-quinase B (PKB, do inglês, *protein kinase B*). Além disso, a via de sinalização da PI3K/Akt é mediada por duas proteínas alvos, a mTOR (do inglês, *Mammalian target of rapamycin*) e GSK3 β (do inglês, *Glycogen synthase kinase-3 beta*)²².

Tomados em conjunto, estas informações suportam a ideia de que a ativação e o aumento da expressão de vias de sinalização responsáveis pelas alterações cardíacas possuem grande importância no efeito da IC sobre o coração. Além disso, embora vários fatores

tenham sido descritos como responsáveis pelas alterações na estrutura ou função do coração ao repouso, sinais de retenção líquida tais como congestão pulmonar ou inchaço dos tornozelos, e os sintomas, dispneia ao repouso ou aos mínimos esforços, cansaço e fadiga⁴⁵⁻⁴⁸, sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida.

Limitar a deposição excessiva de matriz extracelular representa, portanto, uma estratégia terapêutica interessante para prevenir a fibrose durante a remodelação e manter a função cardíaca na IC.

MicroRNAs e a IC

Um grupo de moléculas com grande importância na fibrose, envolvidas também com o estabelecimento de outras alterações cardíacas, são os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos que reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica pelo reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos⁴⁹.

Diversos miRNAs são altamente expressos no músculo cardíaco, como o miR-1, miR-133, miR-208 e miR-499^{50,51}. A família miR-1 representa 40% de todos os microRNAs expressos no coração, enquanto os miR-208a, miR-208b e miR-499 são específicos dos cardiomiócitos e geralmente estão super expressos em doenças cardíacas⁵¹.

Van Rooij e colaboradores⁵², utilizando dois modelos animais de hipertrofia cardíaca patológica e IC (camundongos com bandagem da aorta torácica e camundongos transgênicos para super expressão do gene calcineurina), mostraram que alguns miRNAs apresentam perfil semelhante de expressão na hipertrofia ventricular nos dois modelos: há aumento na expressão dos miRNAs miR-21, miR-23, miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a e miR-214, e diminuição na expressão do miR-29c, miR-93, miR-150 e miR-181b⁵².

Entretanto, ainda no mesmo estudo, os animais que evoluíram para IC apresentaram aumento na expressão do miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a e miR-214 e nenhuma alteração na expressão do miR-21, miR-27, miR-29c, miR-93, miR-150 e miR-181b⁵².

O estudo de Prasad e colaboradores⁵³ comparou a expressão global de miRNAs em tecido cardíaco humano de corações insuficientes e controle. Esse trabalho demonstrou que 8 miRNAs estão significativamente alterados na cardiomiopatia dilatada em relação aos controles. Dentre eles houve redução na expressão do miR-1, miR-29b, miR-7 e miR-378 e aumento na expressão do miR-214, miR-342, miR-145, miR-125b e miR-181b⁵³.

Particularmente, a família de miR-29 está relacionado a supressão de várias proteínas da matriz extracelular, como o colágeno⁵⁴⁻⁵⁶, e também com o crescimento e apoptose dos cardiomiócitos⁵⁷. Os níveis de expressão do miR-29b estão diminuídos em modelos de hipertrofia cardíaca e pós infarto do miocárdio, contribuindo para a formação de cicatrizes e fibrose⁵⁸. Mélanie Abonnenc e colaboradores (2013)⁵⁸ demonstraram forte efeito do miR-29b na expressão de proteínas da matriz extracelular, bloqueia os estímulos do TGF- β , um dos principais reguladores da fibrose, além de alterar a expressão de fatores de crescimento e citocinas como, por exemplo, LIF, IGF-1 e PTX-3, potenciais alvos do miR-29b.

Outros microRNAs com grande importância no processo de remodelação cardíaca são o miR-155 e miR-146a/b. São microRNAs associados com o sistema imunológico e contribuem para o desenvolvimento da IC⁵⁷⁻⁵⁹. Estudos prévios mostraram que os níveis desses dois microRNAs estão alterados no miocárdio de pacientes com IC^{60,61}.

Os miR-146a/b são expressos abundantemente no coração e regulados mediante a ativação de NF- κ B, um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento de insuficiência cardíaca^{62,63}. O aumento da expressão de miR-146a/b em monócitos leva à repressão da IRAK (do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e TRAF6 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*) que são moléculas chave na expressão de citocinas criando um circuito de retroalimentação anti-inflamatório, inibindo a cascata de ativação de citocinas pró-inflamatórias na qual o NF- κ B participa⁶⁴.

No ventrículo, no modelo de IC induzida pela doxorrubicina, a expressão do miR-146a/b estava aumentada inibindo a expressão do ErbB - 2 e -4 (do inglês, *epidermal growth factor receptor*, também conhecidas como HER2 e HER4), que são receptores da proteína neuregulina-1 (NRG-1), essencial para o desenvolvimento cardíaco normal e indução do crescimento hipertrófico em cardiomiócitos de ratos⁶⁵.

O miR-146a/b tem sido descrito como um importante sinalizador dependente de NF- κ B criando um circuito de retroalimentação negativa, impedindo a sinalização patológica por inibição da expressão de moléculas, tais como NF- κ B e TNF- α , tanto nos cardiomiócitos como nos monócitos.

Dados de expressão global de microRNAs obtidos no nosso laboratório mostraram que 20 miRNAs foram especificamente desregulados no miocárdio de ratos com IC submetidos ao treinamento aeróbico, sendo esses envolvidos com o controle de genes relacionados com as vias de morte celular programada, bem como a sinalização do TGF- β , processos metabólicos celulares, citocinas e morfogênese celular⁶⁶.

Exercício Físico Aeróbico

O exercício físico aeróbico atua diretamente no músculo cardíaco alterando o seu metabolismo, dependendo de condições como volume (tempo de treinamento), a frequência e intensidade (carga de treinamento) do treino^{67,68}, sendo a combinação desses fatores fundamental para o aparecimento de adaptações fisiológicas benéficas.

Os efeitos do exercício aeróbico sobre o sistema cardiovascular já são bem conhecidos e apontam para diminuição da frequência cardíaca tanto de repouso como em cargas submáximas⁶⁹. Desta forma, para uma mesma carga de trabalho há um menor gasto de energia pelo coração, ocorrendo melhora da eficiência cardíaca⁷⁰. Estas contribuições do treinamento físico são decorrentes da sua ação em diminuir acentuadamente a concentração de neuro-hormônios circulantes durante o repouso em pacientes com IC, sendo esses indicadores importantes de morbidade e mortalidade. Além de prevenir a hiperativação neuro-hormonal sistêmica e local na IC, o treinamento físico beneficia diretamente o coração insuficiente, promovendo efeito anti-remodelação.

Além dessa relação com o sistema neuro-hormonal, há também o aparecimento de alterações estruturais no coração com o treinamento físico: ocorre aumento da massa muscular do miocárdio, principalmente do ventrículo esquerdo, acarretando em aumento do volume diastólico e sistólico final, e consequentemente aumento da força de contração, caracterizando a hipertrofia excêntrica⁶⁹. Assim, foi demonstrado que o treinamento físico é capaz de reverter a hipertrofia cardíaca patológica, além de melhorar a função ventricular na IC, o que em última análise, levanta a possibilidade de que o treinamento físico, na doença cardíaca, promove uma mudança do perfil da remodelação cardíaca de patológica para fisiológica⁷¹. Durante a última década, muitos estudos se concentraram em decifrar a base celular da atuação do exercício físico prevenindo a remodelação cardíaca na IC. Uma grande via de sinalização como reguladora chave da hipertrofia cardíaca associada ao treinamento físico na IC é a cascata de sinalização da fosfoinositol-3 quinase / proteína quinase B (PI3K/Akt) que contribui para a remodelação cardíaca fisiológica com ganho de função⁷². A ativação da via da PI3K/Akt leva a hipertrofia cardíaca através da ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e desativação da glicogênio sintase-quinase 3 (GSK-3). De fato, o aumento da expressão da forma ativada da Akt conduz a hipertrofia do miocárdio com a melhoria da função cardíaca⁷³, enquanto a inativação do gene da Akt-1 anula a

hipertrofia cardíaca em resposta ao treinamento físico⁷⁴. Kemi et al.⁷² demonstraram que as mudanças na via de sinalização da PI3K/AkT no coração estão relacionadas com alterações fisiológicas e não patológicas.

Como efeito do treinamento físico, principalmente em atletas, observa-se aumento da massa cardíaca em resposta à sobrecarga de trabalho⁷⁵. Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, caracterizado pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos com a finalidade de suportar a tensão na parede do ventrículo⁷⁶. Atletas que realizam treinamento aeróbico desenvolvem hipertrofia cardíaca excêntrica em decorrência da sobrecarga de volume, devido ao aumento do retorno venoso, acarretando em elevação da tensão diastólica, induzindo a hipertrofia dos cardiomiócitos. Primariamente, ocorre adição em série de novos sarcômeros com consequente aumento no comprimento da célula, levando a um aumento na cavidade do ventrículo. A cavidade aumentada eleva a tensão sistólica, o que proporciona a adição de novos sarcômeros em paralelo, aumentando também a espessura da parede do ventrículo. Assim, a relação entre a espessura da parede e o raio permanece inalterada⁷⁷. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca concêntrica é encontrada em atletas que realizam treinamento resistido, e é caracterizada por uma cavidade de tamanho normal e por espessamento da parede e do septo do ventrículo. Esta alteração é decorrente do aumento no diâmetro dos cardiomiócitos, através da adição de sarcômeros em paralelo como resposta à sobrecarga hemodinâmica⁷⁷. Além disso, a hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício é totalmente reversível. Estudos ecocardiográficos mostraram que a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo e massa estimada do ventrículo regrediram após algumas semanas de destreino em atletas universitários e olímpicos^{78,79}. Isto sugere que a hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício seja inofensiva, e talvez até mesmo benéfica, em indivíduos saudáveis, embora condições pré-existentes, como cardiomiopatias herdadas possam promover uma doença e até mesmo morte prematura em atletas^{80,81} (Figura 7).

Os efeitos benéficos do treinamento físico acarretaram na sua utilização como parte importante no tratamento de doenças cardíacas, uma vez que é uma ferramenta extremamente útil tanto para o diagnóstico como também vem sendo uma das principais prescrições não farmacológicas na rotina terapêutica^{10,82,83}. Resultados importantes em pacientes cardiopatas mostraram que o exercício físico é capaz de atenuar seus efeitos e, em alguns casos, até promover a suspensão de medicamentos⁸⁴. No entanto, embora numerosos relatem que o treinamento aeróbico melhora os sintomas clínicos e a qualidade de vida, reduzindo a taxa de mortalidade e hospitalização dos pacientes com IC os mecanismos envolvidos nos efeitos

benéficos da atividade física sobre o músculo cardíaco durante o desenvolvimento e estabelecimento da IC não estão completamente esclarecidos. No presente trabalho, serão apresentados e discutidos os efeitos do treinamento físico aeróbico realizado durante a transição entre disfunção ventricular e insuficiência cardíaca com foco sobre os efeitos estruturais e moleculares do coração. O entendimento dessas vias poderá favorecer a elaboração e direcionamento dos programas de treinamento físico para pacientes com diferentes graus de IC, contribuindo para melhora na qualidade de vida destes pacientes.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações morfológicas e moleculares do coração e o efeito do treinamento aeróbico durante a transição da disfunção ventricular para a IC no modelo de estenose aórtica em ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o ventrículo esquerdo de ratos submetidos à estenose aórtica durante a transição entre a disfunção ventricular (18 semanas da cirurgia) e a IC (28 semanas da cirurgia) e a influência do exercício aeróbico. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Estruturais e funcionais do coração pelo ecocardiograma;
2. Fibrose do ventrículo esquerdo pelo picrosirius;
3. Expressão de genes:
 - a. Marcadores de hipertrofia patológica: ANP, BNP, MyH6 e MyH7;
 - b. Marcadores de degradação proteica: FoxO3, TNF- α e NF- κ B;
 - c. Marcadores de fibrose: TGF- β , Col1 α 1, Col1 α 2, Elastina e Fibrilina;
4. Expressão de microRNAs pró-fibrótico (miR-21) e anti-fibrótico (miR-29b).

METODOLOGIA

Animais e grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados 52 ratos Wistar machos (90 a 100 g e 30 dias de idade), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Campinas, SP. Os animais foram mantidos em gaiolas (três animais por gaiola), no Biotério de Pequenos

Mamíferos do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório publicados pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (Protocolo 495-CEUA – Anexo 1) e da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo 1035-2013- CEUA – Anexo 2) da Universidade Estadual Paulista.

Para a realização do experimento foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- Sham 18 (n=8): Animais controle de 18 semanas;
- EAo 18 (n=12): Animais com estenose aórtica 18 semanas após a cirurgia;
- Sham 28 (n=8): Animais controle de 28 semanas;
- Sham TR (n=8): Animais controle de semanas, submetidos a treinamento aeróbico;
- EAo 28 (n=8): Animais com estenose aórtica 28 semanas após a cirurgia;
- EAo TR (n=8): Animais com estenose aórtica 28 semanas após a cirurgia, submetidos a treinamento aeróbico 10 semanas.

Protocolo Experimental

Para promover a remodelação cardíaca através da hipertrofia gradual e posterior IC foi utilizado o modelo da estenose aórtica supravalvar (EAo). Através de uma cirurgia os animais desenvolvem remodelação cardíaca associada à disfunção diastólica com melhora da função cardíaca seguida de menor desempenho sistólico e posteriormente desenvolvem insuficiência cardíaca⁸⁵. Ribeiro *et al.* (2003)⁸⁶, utilizando métodos ecocardiográficos e hemodinâmicos observaram que após 6 semanas da indução da estenose, os animais apresentaram aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo e com 21 semanas, mesmo não mostrando os sinais de IC, já apresentavam disfunção diastólica.

Na cirurgia os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um *clip* de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz dos animais dos grupos EAo (n = 24). Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual a pressão

positiva e 1 ml de soro fisiológico aquecido, intraperitonealmente. Os animais dos grupos controles ($n = 24$), pareados por idade e peso, foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do *clip* (Figura 10).

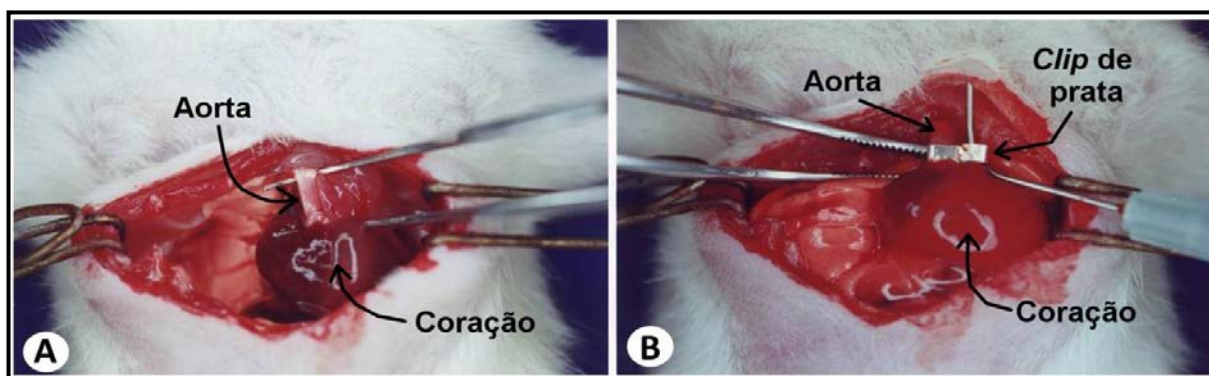


Figura 10. Procedimento cirúrgico para a inclusão do clip de prata na aorta ascendente. A. Identificação da artéria aorta ascendente; B. Colocação do clip de prata com 0,6 mm de diâmetro interno.

Após 18 semanas da cirurgia, quando os animais apresentam diminuição da função ventricular, porém sem sinais de IC, demonstrada pela técnica do ecocardiograma^{85,87}, os animais dos grupos EAo 18 e Sham 18 foram submetidos à eutanásia. Os animais dos grupos controle (Sham 28, $n = 8$) e estenose aórtica 28 semanas (EAo 28, $n = 8$), foram os grupos de animais que permaneceram sem treinamento por um período de 10 semanas; os animais estenose aórtica treinados (EAoTR, $n = 8$) e controle treinados (Sham TR, $n=8$), foram submetidos a 10 semanas de treinamento físico aeróbico. O protocolo de treinamento utilizado está descrito abaixo. O nosso laboratório demonstrou previamente que ratos com EAo começam a apresentar evidência de IC cerca de 21-25 semanas após a cirurgia⁸⁸. Assim, após 28 semanas, todos os 3 grupos foram submetidos a um outro ecocardiograma e foram, então, eutanasiados. O delineamento experimental está apresentado na Figura 11. No momento da eutanásia, os ratos foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico intraperitonealmente (50 mg/kg). O coração foi removido por meio de toracotomia, e os átrios e ventrículos foram separados e pesados. Os ventrículos esquerdos, que foram escolhidos devido a sua íntima relação com o desenvolvimento da IC, ou seja, um dos tecidos mais afetados durante a evolução da patologia, foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Para a análise de IC, dois observadores determinaram a presença ou ausência de características clínicas e patológicas no momento da eutanásia. O achado clínico sugestivo de IC foi taquipneia/ dispneia. A avaliação patológica

de descompensação cardíaca incluíram trombos no átrio esquerdo, congestão pulmonar, hipertrofia ventricular direita, ascite e congestão hepática⁸⁹. Neste estudo, foram considerados animais com IC os ratos com trombo atrial, congestão pulmonar, e/ou hipertrofia ventricular direita⁹⁰. Além disso, foi analisada a mortalidade dos grupos experimentais antes e após o período do treinamento.

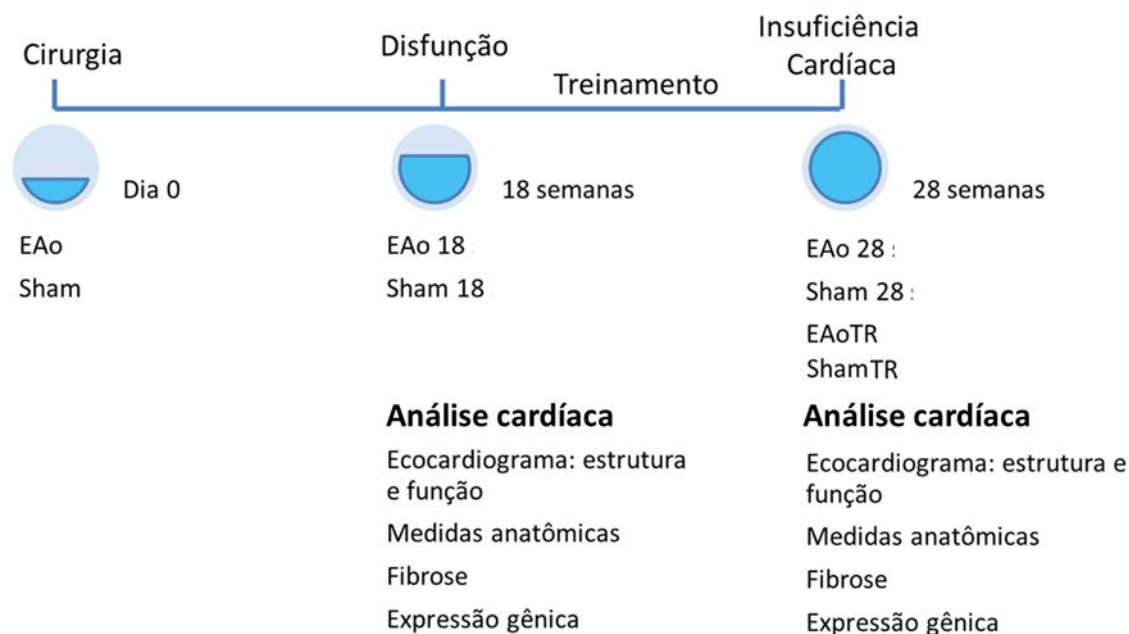


Figura 11. Delineamento experimental. Sham 18, grupo controle com 18 semanas; EAO 18, animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica com 18 semanas; Sham 28, grupo controle com 28 semanas não treinado; Sham, grupo controle com 28 semanas treinado TR; EAO 28, grupo estenose aórtica com 28 semanas não treinado; EAO28, grupo estenose aórtica com 28 semanas treinado.

Determinação do limiar de lactato

Para determinar o limiar de lactato e a velocidade na qual o limiar ocorreu, os animais que realizaram o treinamento físico foram submetidos a um teste de esforço incremental em esteira⁹¹. O limiar de lactato foi definido como a velocidade de corrida que poderia ser mantida sem o aumento de 1,0 mmol/L de lactato acima da concentração de lactato sanguíneo, obtido na velocidade anterior⁹². O protocolo utilizado para o teste de cargas incrementais foi adaptado do trabalho anteriormente descrito por Carvalho et al.⁹³ e foi realizado no final das semanas 1 (semana de adaptação), 4 e 7.

Depois de uma semana de adaptação (10 min/dia) para os exercícios na esteira, os ratos foram submetidos ao teste de esforço. A velocidade da esteira começou a 6 m/min, e foi

progressivamente aumentada em 3 m/min a cada 3 min a 0 % de inclinação até a exaustão dos animais, o qual foi definido quando o animal se recusou a correr mesmo sob estímulo sonoro ou quando a coordenação entre as passadas se apresentou dificultada ao longo de 3 minutos. Após cada aumento de carga, o animal foi removido manualmente da esteira por 1 min para coleta de sangue da cauda. O sangue foi pipetado uniformemente sobre uma tira teste, o qual foi inserido um analisador portátil de lactato, previamente calibrado (Accutrend Lactato, Boehringer-Mannheim)^{94,95}.

Treinamento aeróbico

Os animais dos grupos ShamTR e EAoTR foram submetidos a um programa de treinamento aeróbico em esteira durante 10 semanas (5 dias/semana; Figura 12). Os animais não receberam qualquer estímulo de treinamento. O programa de treinamento, adaptado de De Sousa et al., 2002⁹⁶, Siu et al., 2004⁹⁷ e Pacagnelli et al., 2014⁹⁸, teve início após uma semana de familiarização com a esteira e com a execução do exercício. O volume (tempo) e intensidade (velocidade) de treinamento foi progressivo, sendo equivalente a 5 min, 5 m/min (1ª sem); 6 m/min (2ª a 4ª sem); 12 m/min (5ª a 7ª sem); e 15 m/min (8ª a 10ª sem; Tabela 1). A intensidade (velocidade) correspondeu ao limiar de lactato, que foi determinado pelo teste de esforço incremental (descrito acima) realizado ao final das semanas 1, 4 e 7 para ajustar a velocidade do treinamento. As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.



Figura 12. Foto ilustrativa dos animais realizando o treinamento aeróbico em esteira.

Tabela 1. Protocolo de treinamento aeróbico para os animais com EAo.

Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Duração (min)	5	10	12	14	16	18	20	20	22	22
Velocidade (m/min)	5	6	6	6	12	12	12	15	15	15

Ecocardiograma

A função ventricular foi avaliada, na 18^a e 28^a semanas do experimento, através do ecocardiograma⁹⁹ utilizando o ecocardiógrafo da General Electric Medical Systems (modelo S6) equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5 – 11,5 MHz. A preparação dos animais e a realização do ecocardiograma foi feita de acordo com os trabalhos publicados^{100,101}. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma.

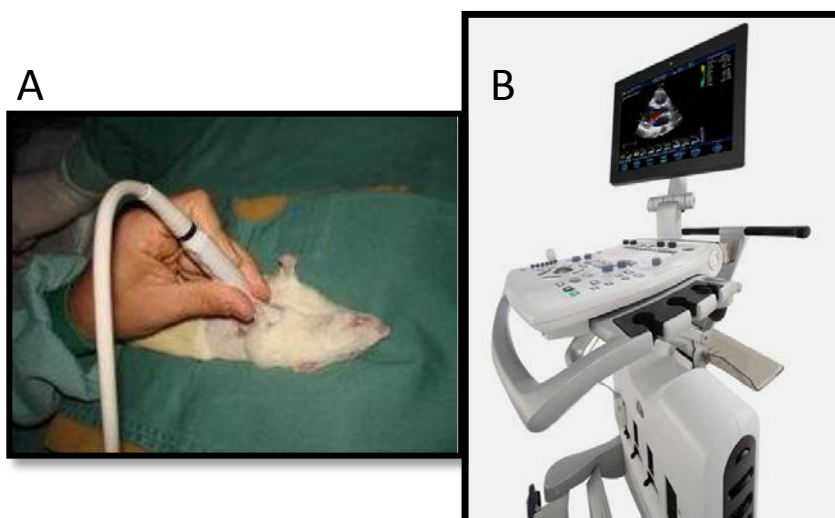


Figura 13. Ecocardiograma na região do tórax dos animais (A); Ecocardiógrafo utilizado para as análises (General Electric Medical Systems - modelo S6) (B).

Para medir as estruturas cardíacas, utilizamos imagens em modo-M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares¹⁰⁰. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o

cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional foi realizado por meio da impressora UP-895MD da Sony Co[®].

Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro seguindo as recomendações da *American College of Echocardiography*¹⁰² em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. As seguintes variáveis estruturais foram medidas: o diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo e outras calculadas: a espessura relativa do VE na diástole (Esp. Rel., calculado como $2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$).

A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento endocárdico, Enc. Endo. $[(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}]$, a fração de ejeção e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, VEPP, que é a velocidade correspondente a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior.

No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondentes a fase de enchimento inicial (onda E) e tardia consequente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da razão onda E/onda A. A medida dos fluxos foi realizada no monitor do ecocardiógrafo.

Dados Anatômicos

Após 18 e 28 semanas do experimento, os animais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p) e eutanasiados por decapitação. O ventrículo esquerdo foi dissecado e coletado. O ventrículo direito também foi dissecado e pesado separadamente. As relações entre os pesos dos ventrículos direito (PVD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (PVD / PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia dos ventrículos.

Análise Morfológica

Após a retirada do ventrículo esquerdo, uma porção foi separada e imediatamente imersa em Formol tamponado 10% para fixação e posteriormente incluído em parafina. Cortes histológicos transversais (6 μm) foram obtidos em um micrótomo, e submetidos à

coloração de Picrosirius para análise da morfologia e quantificação do colágeno da matriz extracelular. Áreas de tecido conjuntivo foram quantificadas utilizando um sistema de análise de imagem (Leica QWin Plus, Alemanha). A área relativa ocupada pelo tecido conjuntivo foi quantificada em pelo menos cinco campos de cada corte em aumento de 40x, e os dados obtidos foram expressos como a porcentagem da área total. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo examinador, cego para os grupos experimentais.

Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

a) Extração de RNA com RNasy (Quiagen).

O RNA foi extraído das amostras utilizando o Kit comercial RNasy (Quiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Amostras do músculo cardíaco previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas (homogeneizador IKA UltraTurrax/T-25) em 600 µl de Buffer RLT, centrifugadas (3 minutos) e no sobrenadante foi adicionado 70% do volume de etanol. O volume de 700 µl de cada amostra foi transferido para a coluna de centrifugação RNeasy Mini em um tubo de 2 ml e centrifugado por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$; o filtrado foi descartado. Foi adicionado 700 µl do Buffer RW1, sendo centrifugado por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$; o filtrado foi descartado novamente então adicionado 500 µl do Buffer RPE e centrifugado por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ novamente descartando o filtrado. Foi adicionado novamente 500 µl do Buffer RPE e centrifugado por 2 minutos a $\geq 8000 \times g$. O conteúdo foi colocado num novo tubo e centrifugado em velocidade total para secar a membrana. A coluna de centrifugação RNeasy Mini foi colocada num tubo de 1,5 ml com adição de 30-50 µl de água livre de RNA e centrifugada por 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ para diluir o RNA.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas), o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração. As amostras utilizadas tiveram razão $\geq 1,8$.

b) Análise da integridade do RNAm

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese capilar utilizando o sistema Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Este sistema fornece um valor que representa a integridade do RNAm (*RnaIntegrityNumber* - *RIN*). Os valores das amostras utilizadas foram superiores a 7,0, indicando um RNA íntegro¹⁰³.

c) Tratamento do RNA com DNase

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), o RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foi acrescentado 1 µl de tampão DNase, 1 µl de DNase I (1unidade/ml) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µl de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 min e, em seguida, foi acrescida de 1 µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C/10min.

d) Reação de Transcrição Reversa e PCR quantitativo em Tempo Real de miRNA (RT-qPCR):

Para as análises de expressão dos microRNAs, foi realizada a transcrição reversa do RNA extraído pelo *TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) combinado com o kit *TaqMan®MicroRNA Assays* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do protocolo.

Para a análise da expressão dos microRNAs foram utilizadas amostras de 5 grupos experimentais (Sham 18, EAo 18, Sham 28, EAo 28 e EAoTR). Os níveis de expressão dos microRNAs foram detectados por RT-qPCR, através da plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Cada amostra de cDNA correspondente aos microRNAs obtidos das amostras musculares foi amplificada através do ensaio *TaqMan® small RNA assay* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para os microRNAs miR-21 e miR-29b. A quantificação relativa da expressão foi realizada pelo método do CT comparativo (Livak&Schmittgen, 2001). As expressões dos microRNAs foram normalizadas pela expressão do RNA não codificante U6.

e) Reação de Transcrição Reversa (RT) mRNA

A transcrição reversa do RNA total obtido dos músculos cardíacos foi realizada usando o kit High Capacity cDNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Aliquotas contendo 2 µg de RNA total ao qual foram adicionados 2 µl de Random Primers (50 ng/µl), 0,8 µl de dNTP (100mM), 2 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT Buffer), 1 µl de enzima de transcriptase reversa *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µl), 1 µl do inibidor de RNase (20 U/µl) e o volume ajustado para 20 µl com água livre de nucleases. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 min e 37 °C por 120 min, seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min e o produto da reação armazenado a -20 °C.

f) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) mRNA dos grupos de 28 semanas

O TLDA contém oito locais para a adição da amostra, sendo cada um conectado por um micro canal a 48 poços, totalizando 384 poços por cartão. As sondas TaqMan gene específicas foram escolhidas e incorporadas em cada poço (Tabela 2). Todos os genes foram medidos por RT - qPCR utilizando os cartões de TLDA (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Cinco genes de referência foram testados 18S rRNA (Hs99999901_s1), ACTB (Rn00667869_m1), GAPDH (Rn01775763_g1), HPRT1 (Rn01527840_m1) e TBP (Rn01455648_m1), no entanto GAPDH e ACTB foram utilizados como genes de referência para normalizar os dados, uma vez que eles apresentaram maior estabilidade. Um total de 100 µl da mistura da reação, sendo 10 µl de cDNA (200 ng RNa), 40 µl de água ultrapura e 50 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionados a cada um dos oito poços do TLDA. O volume final em cada poço do cartão de TLDA é de cerca de 1 µl. O volume excedente era necessário para o carregamento adequado do cartão. As placas foram centrifugadas duas vezes a 1200 rpm durante 1 min de cada vez, selado, e colocado no termociclador. O protocolo de amplificação utilizado foi: 2 min a 50 °C para ativar a uracil-DNA glicosilase (UNG), 10 min a 95 °C (ativação), 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15s, e anelamento e extensão a 60 °C por 1 min e a termociclagem e detecção da fluorescência foi realizada pelo sistema de detecção da Applied Biosystems ABI Prism ViiA7 com ABI Prism ViiA7 SDS Software 2.4. A quantidade relativa de cada gene alvo foi calculado através da

média do $2^{-\Delta Ct}$ onde $\Delta Ct = Ct - Ct_{(\text{genes de referência})}$. O ciclo threshold foi automaticamente dado pelo programa SDS 2.2 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e as análises de expressão gênica foram realizados nos programas qBase plus (Biogazelle, Gent, Bélgica) e DataAssist, v3.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 2. Genes estudados através do TLDA para os grupos de 28 semanas por RT-qPCR .			
Símbolo	Nome	Ação	Nº de Acesso
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Atrofia Cardíaca	NM_012675.3
NF- $\kappa\beta$	<i>factor nuclear kappa beta</i>		AF079314.1
FOXO3	<i>Forkhead box protein O3</i>		NM_001106395
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>		NM_032080.1
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>	Fibrose cardíaca	AY550025.1
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>		NM_053304
COL1A2	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>		NM_053356
FBN1	<i>Fibrillin-1</i>		AAD34438
ELN	<i>Elastin</i>		BC085910
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>	Hipertrofia cardíaca	M25297.1
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>		NM_012612.2
α -MyHC	α -Myosin		AF074962.1
β -MyHC	β -Myosin		AY191159.1
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>		X06043
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>	Modeladores da matriz	NM_001134530.1
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>		NM_031055.1
MMP8	<i>Matrix metalloproteinase-8</i>		NM_022221.1
β -Actin	β -Actin	Endógenos	EF156276.1
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>		NM_017008.4
Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no <i>GenBank</i> .			

g) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) mRNA dos grupos de 18 semanas

Alíquotas de 2 μ l da reação de RT foram adicionadas a uma mistura contendo, 12,5 μ l de Platinum SYBR® Green qPCRSupermix-UDG, 2 μ l de primers “sense” e “anti-sense” (5 μ M) e o volume completado para 25 μ l com água ultra pura, livre de RNase, (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para cada amostra. Os primers para os genes analisados (Tabela 3) foram obtidos através do programa para desenho de primers OligoPerfect™ Designer disponível no endereço eletrônico (www.invitrogen.com/oligos), a partir de

sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), para garantir a especificidade das sequências-alvo, evitar a formação de estruturas secundárias dos primers e a dimerização dentro de cada primer e entre os primers sense e anti-sense. Foi testada a concentração ótima dos primers (100 a 500 nM), e a análise da curva de anelamento para identificar a formação de dímeros dos primers e a especificidade da reação. As condições dos ciclos da reação do qPCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento adquirido. Os valores obtidos foram normalizados pelo fator de normalização dos genes constitutivos mais estáveis. O número ótimo e a escolha dos genes de referência foram experimentalmente determinados¹⁰⁴.

Tabela 3. Genes estudados através do SYBR® Green para os grupos de 18 semanas por RT-qPCR .

Símbolo	Nome	Ação	Nº de Acesso	Sequência
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Atrofia cardíaca	NM_012675.3	R - GTCTGGGCCATGGAAGTAT F - GCCACCACGCTCTTCTGTC
NF- κ B	<i>factor nuclear kappa beta</i>		AF079314.1	R - TCCACATTCTCTCTCTCCCT F - CCCTGCGAGTGTCTATAACTTTG
FOXO3	<i>Forkhead box protein O3</i>		NM_001106395	R - AACGTGACCAAGTGTGCTGA F - ACTCTACCTGAACAGCCCCA
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>		NM_032080.1	R - AACGTGACCAAGTGTGCTGA F - ACTCTACCTGAACAGCCCCA
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>	Fibrose cardíaca	AY550025.1	R - GACTGGCGAGCCTTAGTTTG F - GGACTCTCCACCTGCAAGAC
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>		NM_053304	R - CTTCTCCTTGGGGTTTGGGC F - ACCTGTGTGTTCCCACTCA
COL1A2	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>		NM_053356	R - GCACCAGGCTGTCTTTCAA F - ACAAGGTGCTCGTGGTTTCC
FBN1	<i>Fibrillin-1</i>		AAD34438	R - AACTTTCCAGGCTTTCTCTC F - GGTGGCTTAGGAGTCTCAAC
ELN	<i>Elastin</i>		BC085910	R - AACTTTCCAGGCTTTCTCTC F - GGTGGCTTAGGAGTCTCAAC
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>	Hipertrofia cardíaca	M25297.1	R - AAAACAACCTCAGCCCGTCA F - TGGGCAGAAAGATAGACCGGA
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>		NM_012612.2	R - CAGGTTCTTGAAATCCATCAGA F - CTCTCTCTGGCCTTTGGCT
α -MyHC	α -Myosin		AF074962.1	R - ATCGTGCAATTTCTGCTGGCG F - TCCGCAAGGTGCAGCACGAG
β -MyHC	β -Myosin		AY191159.1	R - ACTCTTCATTCAGGCCCTTGGCG F - GGCAGAGGAGAGGGCGGACA
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>		X06043	R - TCCGAATGCTGGAGCCATAG F - TTCAGTTCGTGTGTGGACA
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>	Modelador da matriz	NM_001134530.1	R - TGTTCCACATTTCTGGCGG F - TGCTGTGCTTCTCTCCGTA
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>		NM_031055.1	R - TGGTTATCCTTCCACTGAGGG F - GGAGAATCCAACCCACTCAC
MMP8	<i>Matrix metalloproteinase-8</i>		NM_022221.1	R - CCTGCTGGAAAAGTGCATCAA F - TCCAGGTTACCCCACTAGCAT
β -Actin	β -Actin	Endógeno	FF156276.1	R - AACGCAGCTCAGTAAGAGTCCGC F - AGTCCGGCCCTCCATCGTG
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>		NM_017008.4	R - GGCATGGACTGTGGTACTGA F - ACTCCCTCAAGATTGTCAAGAA

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank.

Forma de análise dos resultados

Para a análise dos resultados que não obtiveram a distribuição normal, foi utilizada o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementada com o Teste de Dunn. Já para a análise dos resultados que obtiveram a distribuição normal, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) (média $\pm$ DP), complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey¹⁰⁵. O grau de associação entre as variáveis foi verificado pelo cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Ecocardiograma 18 Semanas e 28 Semanas

Dezoito semanas após a indução da estenose aórtica, foram observados hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), caracterizada pelo aumento da massa ventricular (mVE), aumento da espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e aumento na espessura relativa da parede do VE (Esp. Rel. VE), e disfunção diastólica do ventrículo esquerdo demonstrada pelo aumento da relação onda E do fluxo mitral pela onda A do fluxo mitral (E/A) e aumento da relação diâmetro do átrio esquerdo pelo diâmetro da aorta (AE/AO) nos animais do grupo EAo 18 comparada ao Sham 18 (Tabela 4).

Ao final do experimento (28 semanas após a cirurgia), todos os parâmetros analisados, com exceção da frequência cardíaca (FC) e do peso corporal (PC) foram maiores no grupo EAo 28 comparado ao grupo Sham 28. Nesse mesmo período, no grupo EAoTR, os parâmetros diâmetro diastólico e sistólico do VE (DDVE e DSVE) e E/A foram menores em relação ao EAo 28 e a fração de ejeção e a porcentagem de encurtamento do endocárdico (% Enc. Endo) foram maiores no grupo treinado (Tabela 4).

Comparando os grupos com EAo (18 e 28 semanas) houve aumento do diâmetro diastólico e sistólico do VE (DDVE e DSVE), da espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e da E/A, diminuição da fração de ejeção e da porcentagem de encurtamento do endocárdico (% Enc. Endo.) (Tabela 4).

Tabela 4. Dados ecocardiográficos

Parâmetros	Grupos					
	Sham 18	EAO 18	Sham 28	ShamTR	EAO 28	EAO TR
FC (bpm)	276 ± 26	296 ± 27	301 ± 26	309 ± 49	282 ± 49	282 ± 55
PC (g)	460 ± 48	418 ± 45	489 ± 29	475 ± 47	464 ± 36	440 ± 45
DDVE (mm)	8,07 ± 0,60	9,00 ± 0,66*	8,40 ± 0,66	8,42 ± 0,38	9,14 ± 0,32 *‡	8,19 ± 0,77 †
DSVE (mm)	4,38 ± 0,62	4,88 ± 1,25	3,82 ± 0,63	3,84 ± 0,36	5,08 ± 0,57 *‡	3,41 ± 1,01 †
EDPP (mm)	1,36 ± 0,04	1,97 ± 0,32*	1,46 ± 0,06	1,43 ± 0,07	2,29 ± 0,20 * ‡	2,15 ± 0,25§
mVE (g)	0,76 ± 0,11	1,62 ± 0,65*	0,9 ± 0,10	0,88 ± 0,10	1,84 ± 0,30*	1,49 ± 0,40 §†
Esp. Rel. VE	0,34 ± 0,02	0,45 ± 0,06*	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,51 ± 0,05 *	0,53 ± 0,08 §
AE (mm)	5,03 ± 0,52	7,86 ± 1,82*	5,7 ± 0,2	6,24 ± 0,6	8,46 ± 0,49*	8,5 ± 0,8 §
AE/AO	1,31 ± 0,13	2,06 ± 0,54*	1,44 ± 0,10	1,56 ± 0,18	2,21 ± 0,26 *	2,08 ± 0,24 §
Enc. Endo (%)	45,92 ± 5,00	46,11 ± 10,83	55,33 ± 4,40	54,37 ± 4,02	43,78 ± 6,68 *‡	58,84 ± 10,72 †
E/A	1,68 ± 0,29	3,94 ± 2,52*	1,33 ± 0,32	1,36 ± 0,2	7,93 ± 1,75 *‡	4,24 ± 2,23 †
Fração ejeção	86 ± 2	88 ± 2	90 ± 3	90 ± 3	82 ± 6 *‡	92 ± 6 †

FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE: diâmetro diastólico e sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; Esp. Rel.: espessura relativa da parede do VE; AE/AO: relação diâmetro do átrio esquerdo/ diâmetro da aorta; Enc. Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; E/A: relação onda E do fluxo mitral / onda A do fluxo mitral. Valores expressos em média ± DP. * p < 0,05 vs. Sham; † p < 0,05 vs. Sham 28; ‡ p < 0,05 vs. EAO 18; § p < 0,05 vs. ShamTR; † p < 0,05 vs. EAO 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.

Desempenho do treinamento

Em relação ao treinamento utilizado, observou-se aumento da tolerância e desempenho, como demonstrado por aumento significativo na velocidade do limiar de lactato nos testes realizados nos grupos ShamTR e EAO TR entre as semanas 1 e 7 (Figura 14).

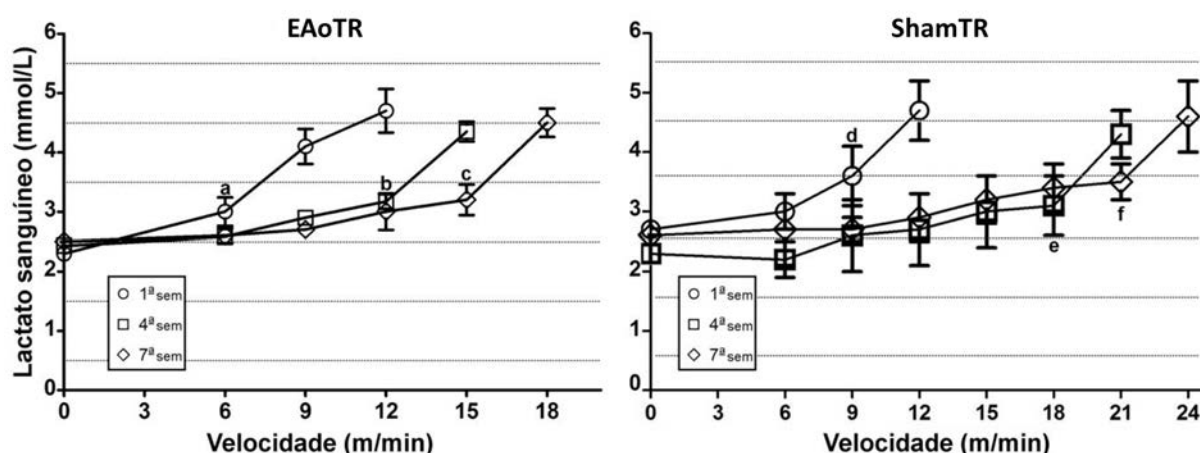


Figura 14. Concentração de lactato sanguíneo nos grupos ShamTR e EAO TR avaliados na primeira, na 4ª e na 7ª semanas de treinamento por teste de carga incremental. Os valores estão expressos em média ± DP. Diferenças no

mesmo período foram no grupo EAoTR: a. vs. 9 m/min; b. vs. 15 m/min; e c. vs. 18 m/min. ShamTR: d. vs. 12 m/min; e. vs. 21 m/min; f. vs. 24 m/min. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.

Sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca

Neste estudo, o diagnóstico de IC foi baseado na presença de taquipneia e dispneia, e confirmado pelos achados patológicos post mortem, como derrame pleural, ascite e trombo cardíaco. Após 18 semanas de experimento os animais do grupo EAo 18 apresentaram somente derrame pleural e trombo cardíaco com leve intensidade e pouca frequência. Já os animais do grupo EAo 28 apresentaram sinais clínicos e patológicos de IC em maior intensidade e frequência. Já, os animais do grupo EAoTR demonstraram menor intensidade e frequência dos sinais reportados (Tabela 5). Nenhuma alteração foi observada nos grupos Sham 28 (não mostrado). O período de treinamento foi bem tolerado. A mortalidade do grupo EAo 28 foi de quatro animais enquanto que nos animais do grupo EAoTR foi de um animal. Nos grupos EAo 18, Sham 18 e Sham 28 não houve mortes (dados não mostrados).

Tabela 5. Dados clínicos e patológicos dos grupos EAo 18 (n = 12), EAo 28 (n = 8) e EAoTR (n = 8).

Sinais Clínicos	Grupos	Frequência Relativa (%)
Taquipnéia	EAo 18	nenhum
	EAo 28	25 +; 50 ++
	EAoTR	25 +
Ascite	EAo 18	nenhum
	EAo 28	12,5 +; 75 ++
	EAoTR	50 +
Derrame pleural	EAo 18	8,3 +; 8,3 ++
	EAo 28	50 +; 12,5 ++; 12,5 +++
	EAoTR	50 +
Presença de trombo cardíaco	EAo 18	8,3
	EAo 28	75
	EAoTR	12,5

Intensidade do sinal: + leve; ++ moderado; +++ severo

Dados Anatômicos

Dados anatômicos relevantes estão resumidos na Tabela 6. Com 18 semanas após a cirurgia e antes do período do treinamento aeróbico, todos os animais do grupo com estenose aórtica apresentaram deterioração da estrutura e função diastólica cardíaca, com somente alguns sinais de IC, com exceção da hipertrofia ventricular direita. Ao final do experimento, os animais EAo 28 apresentaram alteração em todos os parâmetros estudados.

Tabela 6. Dados anatômicos dos animais dos grupos Sham 18 (n=8), EAo 18 (n = 12), Sham 28 (n=8), ShamTR (n=8), EAo 28 (n = 8) e EAoTR (n = 8).

Parâmetros	Grupos					
	Sham 18	EAo 18	Sham 28	ShamTR	EAo 28	EAoTR
PC (g)	460 ± 48	418 ± 45	489 ± 29	475 ± 47	464 ± 36	440 ± 45
VD (g)	0,29 ± 0,04	0,43 ± 0,12 *	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,46 ± 0,10 *	0,35 ± 0,09 §
VD/PC	0,63 ± 0,08	1,06 ± 0,3	0,52 ± 0,09	0,51 ± 0,04	1,00 ± 0,26 *	0,86 ± 0,25 §
Átrios (g)	0,13 ± 0,06	0,39 ± 0,19*	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,08 *	0,28 ± 0,09 §
Átrios/PC	0,28 ± 0,14	0,94 ± 0,43*	0,23 ± 0,06	0,2 ± 0,02	0,87 ± 0,17 *	0,64 ± 0,22 §
Pulmão (g)	1,57 ± 0,6	2,8 ± 1,15*	1,92 ± 0,44	1,89 ± 0,2	3,25 ± 0,62 *	2,52 ± 0,59
Pulmão/PC	3,4 ± 0,6	5,3 ± 2,8*	3,92 ± 0,93	4,00 ± 0,53	7,16 ± 1,53 *	5,49 ± 1,17 §
Fígado (g)	2,9 ± 0,07	3,28 ± 0,28*	3,19 ± 0,02	3,14 ± 0,07	3,37 ± 0,09*	3,26 ± 0,04 †§

PC, peso corporal; VD, ventrículo direito. Dados estão expressos em média ± DP. * p < 0,05 vs. Sham; 0 p < 0,05 vs.

Sham 28; ‡ p < 0,05 vs. EAo 18; § p < 0,05 vs. ShamTR; † p < 0,05 vs. EAo 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.

Análise morfológica

A fibrose do miocárdio é uma característica da hipertrofia cardíaca patológica, desta forma nós analisamos nos grupos experimentais o conteúdo de colágeno no tecido muscular cardíaco do ventrículo esquerdo. A análise histológica demonstrou que houve aumento na deposição de colágeno no grupo EAo 28 quando comparado ao Sham 28 e aumento no grupo EAoTR em relação ao grupo ShamTR (Figura 15).

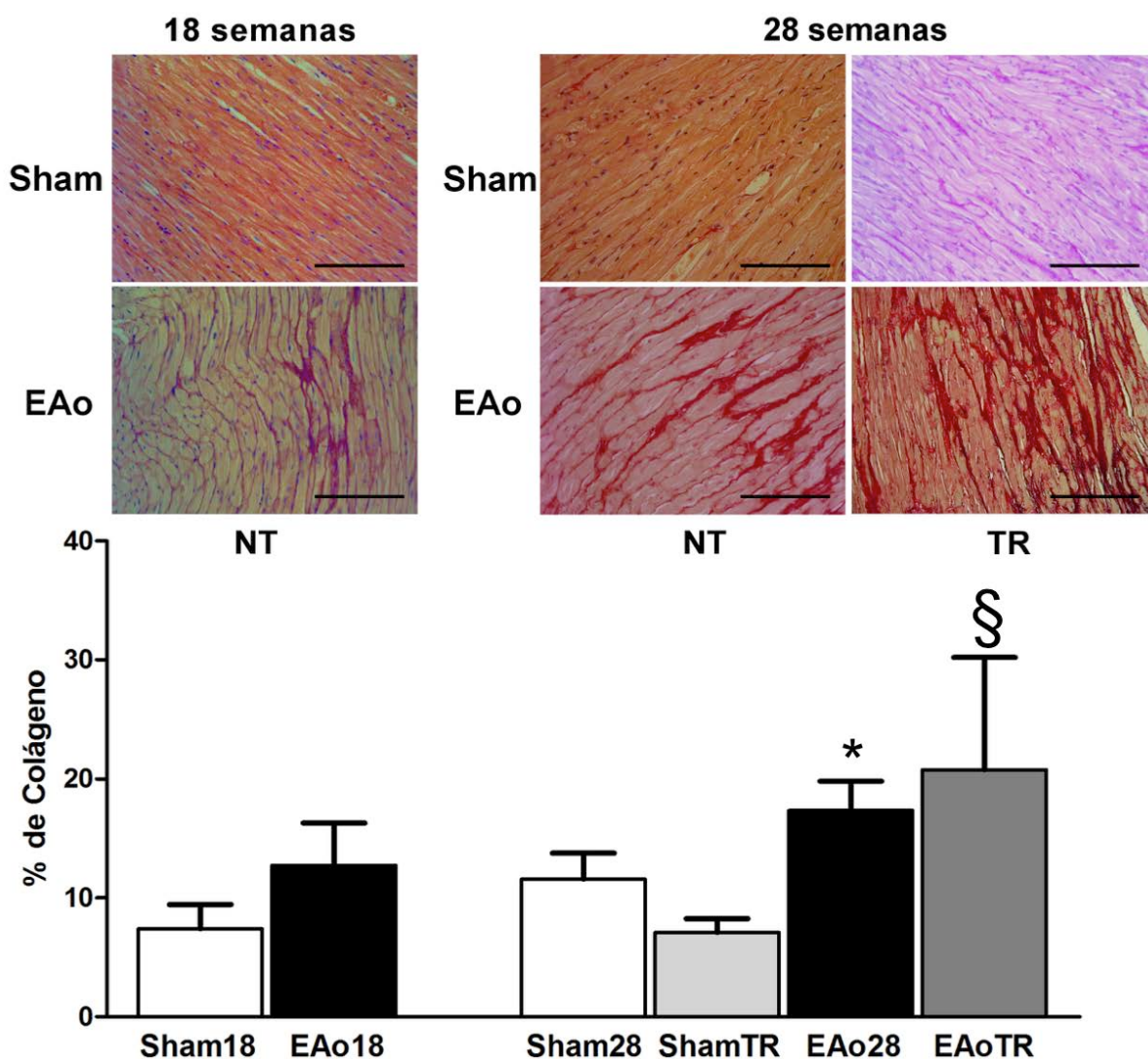


Figura 15. Imagens representativas do ventrículo esquerdo corado com picrosirius red e o percentual de fibrose nos grupos Sham 18, EAo 18, Sham 28, ShamTR, EAo 28 e EAoTR. * $p < 0,05$ vs. Sham; θ $p < 0,05$ vs. Sham 28; $\ddagger$ $p < 0,05$ vs. EAo 18; $\S$ $p < 0,05$ vs. ShamTR; $\dagger$ $p < 0,05$ vs. EAo 28. Método não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementada com o Teste de Dunn a posteriori quando apropriado.

Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Micro-RNAs relacionados à fibrose cardíaca

A fibrose cardíaca têm sido associada a vários fatores, entre os quais, à ação conjunta de miRNAs e seus alvos que são componentes da matriz extracelular ou enzimas de modelação da matriz. O miR-21, que apresenta ação pró-fibrótica e está relacionado à

hipertrofia cardíaca com a modulação da atividade da MMP-2, apresentou alta expressão no grupo EAo 18 em relação ao Sham 18 e nos grupos EAo 28 e EAoTR comparados aos grupos Sham 28 e EAo 28, respectivamente (Figura 16).

O miR-29b, que apresenta ação anti-fibrótica, possui relação com a supressão de várias proteínas da matriz extracelular, com o crescimento e apoptose dos cardiomiócitos, teve sua expressão aumentada no grupo EAo 18 comparado ao Sham 18 e no grupo EAoTR comparado ao EAo 28. O nível de expressão desse miRNA mostrou-se diminuído no grupo EAo 28 comparado ao grupo Sham 28 (Figura 16).

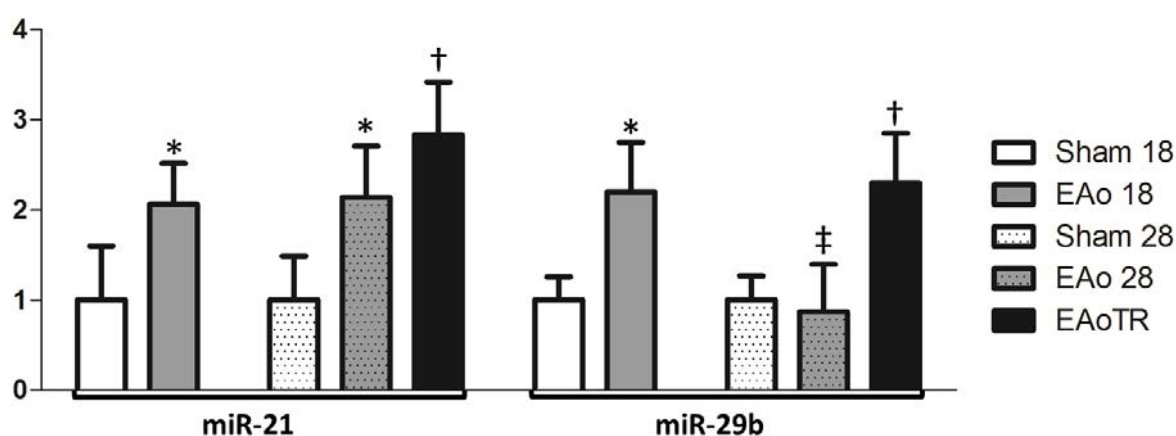


Figura 16. Quantificação do miRNA de genes envolvidos com a fibrose do miocárdio dos animais nos grupos Sham 18, EAo 18, Sham 28, EAo 28 e EAoTR. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$ vs. Sham 28; ‡ $p < 0,05$ vs. EAo 18; § $p < 0,05$ vs. ShamTR; † $p < 0,05$ vs. EAo 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.

Genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica

A hipertrofia cardíaca patológica tem sido associada com a reativação e a regulação positiva de genes fetais nos cardiomiócitos incluindo o peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e a isoforma lenta de MyHC (β -MyHC ou MyH7). Por outro lado, ocorre a regulação negativa de genes normalmente expressos em níveis mais elevados em adultos em comparação ao estágio fetal, como a isoforma rápida de MyHC (α -MyHC ou MyH6)^{106,107}. Os níveis de mRNA destes 4 genes foram avaliados no ventrículo esquerdo por PCR em tempo real.

Os resultados mostraram que o treinamento físico, nos animais com EAo não alterou os níveis de expressão dos marcadores ANP e do BNP. No entanto, houve aumento

significativo na expressão no grupo EAo 18, comparado ao Sham 18, no grupo EAo 28 comparado ao Sham 28 e no grupo EAoTR comparado ao Sham TR.

Em relação ao gene BNP, houve aumento significativo no grupo EAo 18, comparado ao Sham 18, no grupo EAo 28 comparado ao Sham 28 e EAo 18, no grupo EAoTR comparado ao ShamTR. Os níveis de MyH6 (α -MyHC) foram menores nos animais dos grupos EAo 18, EAo 28 e EAoTR comparados com os respectivos grupos Sham 18, 28 e TR. Para a MyH7 (β -MyHC), os níveis de expressão foram maiores nos animais do grupo EAo 28 comparados com o grupo Sham 28. (Figura 17).

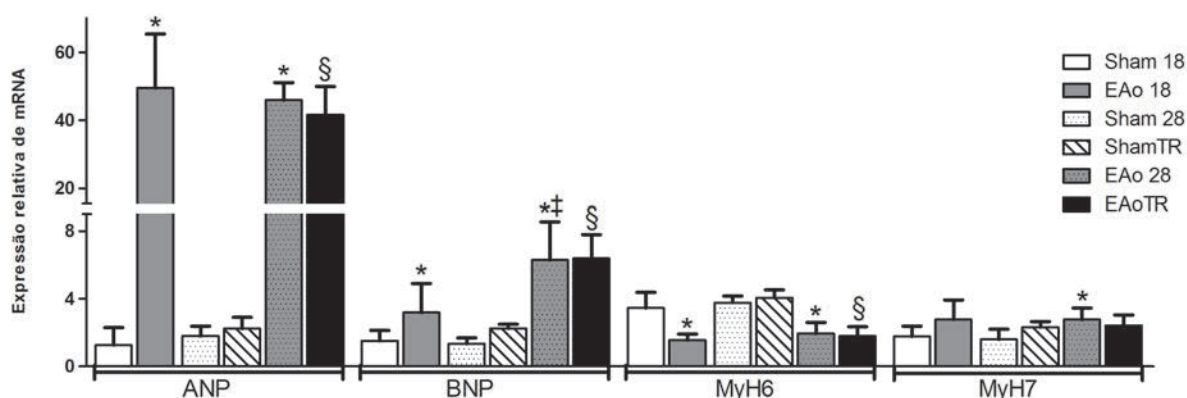


Figura 17. Quantificação do mRNA de genes envolvidos com a hipertrofia patológica do miocárdio, nos animais dos grupos Sham 18, EAo 18, Sham 28, ShamTR, EAo 28 e EAoTR. * $p < 0,05$ vs. Sham; 0 $p < 0,05$ vs. Sham 28; ‡ $p < 0,05$ vs. EAo 18; § $p < 0,05$ vs. ShamTR; † $p < 0,05$ vs. EAo 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.

Genes relacionados à degradação proteica e hipertrofia fisiológica

Para maior compreensão dos mecanismos responsáveis pela atrofia e hipertrofia fisiológica do coração durante a transição da disfunção para a IC, analisamos a expressão gênica de componentes de vias de degradação e síntese proteica do músculo cardíaco nos grupos experimentais estudados. Após a análise dos alvos envolvidos com o processo de proteólise, observou-se um aumento na expressão do gene TNF- α no grupo EAo 18 em relação ao grupo Sham 18 e dos genes FoxO3, TNF- α , NF- κ B no grupo EAo 28 em relação ao grupo Sham 28. Quando comparamos os grupos EAo 28 com o EAoTR observamos uma prevenção no aumento da expressão do gene TNF- α nos animais treinados e entre os grupos Sham 18 e Sham 28 uma diminuição da expressão do gene do NF- κ B (Figura 18A).

Quanto ao gene envolvido com o processo de hipertrofia fisiológica cardíaca, observou-se diminuição na expressão do gene IGF-1 no grupo EAo 28 quando comparado ao grupo Sham 28. Comparando os grupos EAo 18 e EAo 28, observou-se que ao longo do

desenvolvimento da IC há uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene IGF-1 (Figura 18B).

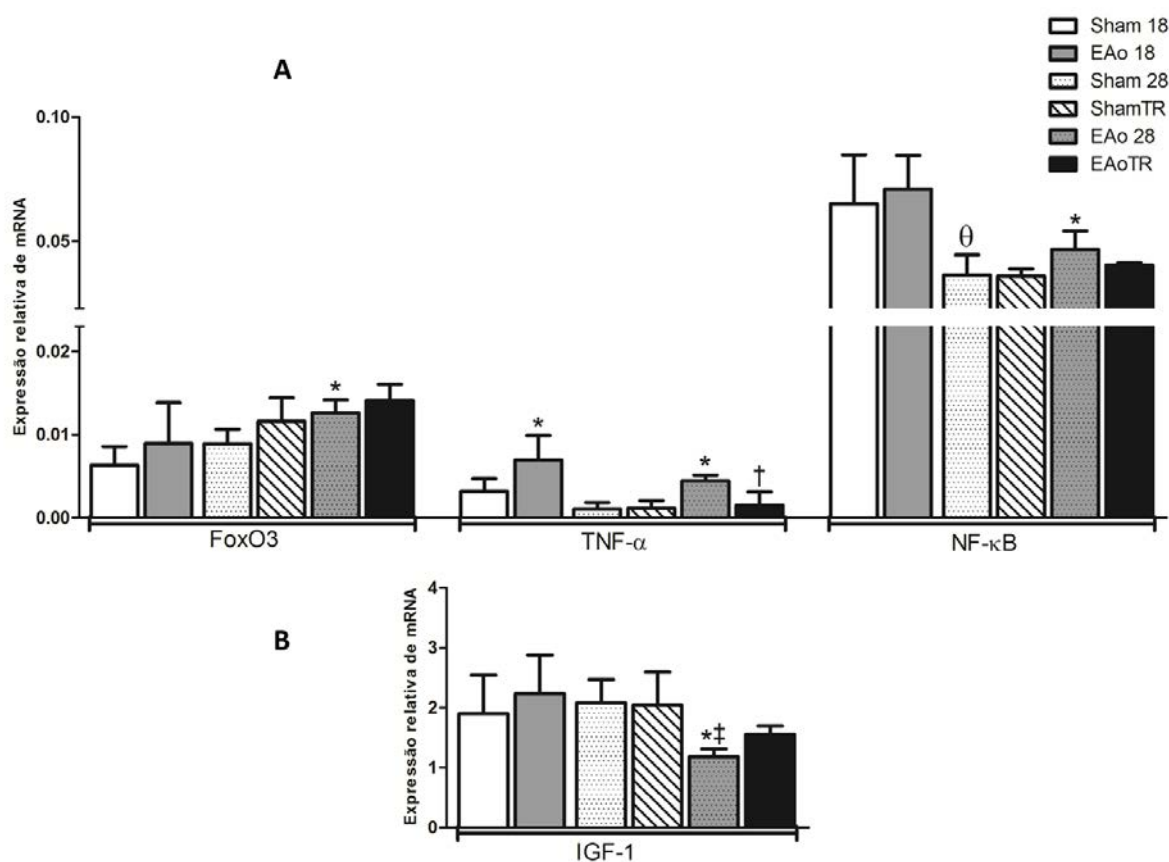


Figura 18. Quantificação do mRNA de genes envolvidos com a (A) degradação e (B) síntese proteica no miocárdio dos animais dos grupos Sham 18, EAo 18, Sham 28, ShamTR, EAo 28 e EAoTR. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. Sham; θ $p < 0,05$ vs. Sham 28; $\ddagger$ $p < 0,05$ vs. EAo 18; $\S$ $p < 0,05$ vs. ShamTR; $\dagger$ $p < 0,05$ vs. EAo 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste.

Genes relacionados à fibrose cardíaca

A análise dos genes relacionados à fibrose cardíaca, mostrou nos animais dos grupos EAo 18, 28 e TR um aumento significativo no mRNA dos genes colágeno I (alfa I) comparados aos grupos Sham 18, 28 e TR, respectivamente. Em relação ao colágeno I (alfa II), a expressão foi maior no grupo EAoTR comparado ao grupo EAo 28 e ShamTR, a elastina mostrou diferença estatística no grupo EAoTR, sendo mais expressas quando comparadas ao grupo EAo 28 e a Fibrilina apresentou aumento da expressão no grupo EAo 18 quando comparado ao grupo Sham 18 (Figura 19A).

Quanto ao gene envolvido com a estimulação da fibrose, observou-se aumento da expressão do TGF- β nos grupos EAo 18 e 28 quando comparado aos grupos Sham 18 e 28, respectivamente e ao longo do desenvolvimento da IC, houve diminuição na expressão no grupo EAo 28 quando comparado ao grupo EAo 18 (Figura 19B).

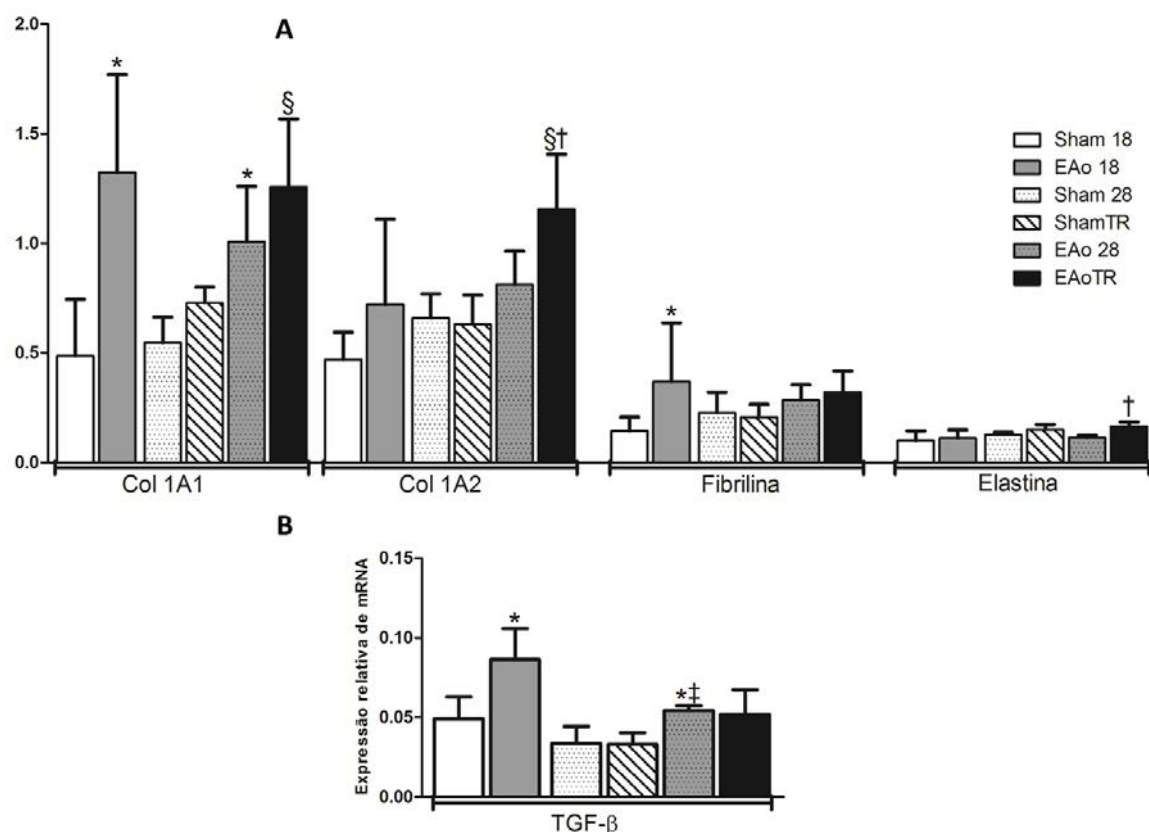


Figura 19. Quantificação do mRNA de genes envolvidos com a fibrose cardíaca dos animais dos grupos Sham 18, EAo 18, Sham 28, ShamTR, EAo 28 e EAoTR. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$ vs. Sham 28; ‡ $p < 0,05$ vs. EAo 18; § $p < 0,05$ vs. ShamTR; †† $p < 0,05$ vs. EAo 28. One-way ANOVA com Tukey post hoc teste quando apropriado.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



DISCUSSÃO

O treinamento físico em pacientes com Insuficiência cardíaca (IC) é uma terapia não farmacológica eficaz para melhorar a qualidade de vida¹⁰⁸. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o treinamento físico atenua os sintomas dessa doença durante o seu desenvolvimento ainda permanecem incompreendidos. Em nosso estudo, utilizamos o modelo de estenose aórtica ascendente para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda e posterior IC, em ratos¹⁰⁹. Neste modelo, os animais desenvolvem a remodelação cardíaca que está associada, no curto prazo, com disfunção diastólica e melhora da função sistólica, seguido da diminuição do desempenho sistólico e, por fim, desenvolvem IC. Após 18 semanas de estenose supra-aórtica, a remodelação cardíaca foi observada na avaliação ecocardiográfica, embora os animais não apresentaram os sinais de IC. Após 10 semanas de treinamento aeróbico, os animais do grupo EAoTR apresentaram uma melhora da estrutura e função sistólica e diastólica em comparação com o EAo 28. Nossos dados confirmam descobertas anteriores de que o treinamento apresentou efeitos benéficos sobre a função do ventrículo esquerdo de indivíduos com IC^{110,111}, e indicam que o treinamento físico aeróbico pode ser uma importante intervenção clínica para melhorar a estrutura e função cardíaca durante a transição da hipertrofia para IC.

Algumas características celulares e moleculares da hipertrofia cardíaca patológica e/ou fisiológica estão, pelo menos em parte, interligadas, o que torna essas definições bastante controversas¹¹². Entretanto, a visão predominante, com base na maioria das evidências disponíveis, é que estímulos distintos e vias de sinalização podem levar à hipertrofia patológica ou fisiológica²⁸.

A hipertrofia cardíaca patológica tem sido associada, com a reativação/super-expressão do programa de genes fetais dos cardiomiócitos incluindo o ANP, BNP e MyH7; e com a regulação negativa dos genes normalmente expressos em níveis mais elevados nos ventrículos de adultos, como a MyH6¹¹³⁻¹¹⁵. O ANP é um vasodilatador secretado no átrio em resposta ao dano na parede, já o BNP é um vasodilatador sintetizado e secretado predominantemente no ventrículo em resposta ao dano da parede.¹¹⁶ Em nosso estudo, a estenose aórtica nos animais com 18 e 28 semanas promoveu a reprogramação fetal no coração aumentando a expressão do ANP e BNP, demonstrando que esses vasodilatadores são expressos já na fase da remodelação cardíaca. Considerando que a expressão do BNP foi

maior nos animais com IC, podemos inferir que a hipertrofia foi continuamente estimulada e o dano à parede do coração aumentou.

No coração de mamíferos, duas isoformas de miosina são expressas, a MyH6 e a MyH7, que apresentam diferenças nos aminoácidos que as compõem o que leva a diferenças na atividade ATPásica e consequentemente, na velocidade de contração. Desta forma, cardiomiócitos que expressam exclusivamente MyH6 geram força cerca de três vezes maior que miócitos que expressam somente MyH7; um leve aumento na expressão de MyH6 é suficiente para aumentar o volume de ejeção¹¹⁷. A conversão da MyH6 em MyH7 pode estar relacionada, em parte, com a diminuição do volume de ejeção encontrada nos animais do grupo EAo 28.

A mudança da expressão de genes fetais através da reativação do programa gênico fetal não ocorre geralmente em modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica, como por exemplo, na hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício⁷⁴. Nesse caso, ocorre a expressão de uma complexa rede de fatores de transcrição, incluindo GATA4 (do inglês, *Transcription factor GATA-4*), GATA6 (do inglês, *Transcription factor GATA-6*), Csx/Nkx2.5 (do inglês, *Homeobox protein Nkx-2.5*), MEF2 (do inglês, *myocyte enhancer factor-2*), c-jun, c-fos, c-myc, NFκB e NFAT (do inglês, *Nuclear factor of activated T-cells*) que orquestram a ativação dos genes cardíacos, em resposta ao estímulo cardíaco hipetrófico fisiológico.^{74,114,115}. O treinamento utilizado em modelos de hipertrofia patológica, como descrito por Emter and Baines¹¹⁸, promove alterações na função cardíaca, na deposição do colágeno e nas proteínas relacionadas ao cálcio, mas não altera as proteínas marcadoras de hipertrofia patológica. No nosso experimento, o treinamento utilizado nos animais entre a disfunção cardíaca e a IC, induzida pela estenose aórtica, não exerceu efeito sobre a expressão dos marcadores de hipertrofia patológica (ANP e BNP) e do fenótipo fetal das miosinas, provavelmente pela presença constante do agente agressor (estenose aórtica) que impediu a ação benéfica do exercício físico. Além disso a intensidade moderada/leve recomendada e considerada segura para os pacientes com IC pode não ser efetiva em conter todas as alterações encontradas durante a remodelação cardíaca conforme demonstrado em recentes estudos que variaram a frequência e intensidade do exercício^{72,119-121}.

No nosso estudo, além da mudança na expressão dos genes fetais, que ocorreu durante a remodelação cardíaca patológica e IC (18 e 28 semanas), houve um aumento na expressão de genes relacionados com a inflamação nos 2 momentos analisados e de genes envolvidos com a degradação proteica nos cardiomiócitos na IC. A proteólise muscular na IC pode ser

induzida através da ação de citocinas inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$ ¹²², envolvido com a ativação de fatores transcricionais que controlam vários processos celulares como apoptose, inflamação, e desenvolvimento/diferenciação¹²³. Os efeitos de $\text{TNF-}\alpha$ sobre a IC são mediados através da ativação dos fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), que regula a atividade do sistema proteossomal dependente de ubiquitina (PDU)¹²⁴. A ativação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ leva a um aumento da expressão dos atrogenes MuRF1 e MAFbx^{124,125}, que resulta na proteólise de proteínas sarcoméricas, promovendo a degradação muscular. No nosso estudo, a expressão do $\text{TNF-}\alpha$ no coração apresentou-se elevada nos animais do grupo EAo 18 e EAo 28

No grupo EAo 28, o aumento do $\text{TNF-}\alpha$ ocorreu concomitante com o aumento do $\text{NF-}\kappa\text{B}$, fato não observado no grupo EAo 18, onde somente o $\text{TNF-}\alpha$ aumentou sua expressão. Esse fato demonstra que, a ativação da proteólise muscular não ocorre de forma acentuada durante a RC, sendo ativada nas fases posteriores, durante a IC.

A degradação proteica é mediada principalmente pelas *E3 ubiquitin ligases*, MAFbx e Murf-1, componentes da via de sinalização da família FoxO¹²⁶. Sandri et al.¹²⁶ inibiram as isoformas do FoxO tanto em culturas de células C2C12, quanto no musculo tibial anterior de camundongos fêmeas adultas e concluíram que o aumento na expressão das isoformas 1 e/ou 3 do FoxO foram suficientes para promover a atrofia muscular in vivo. No nosso trabalho, o aumento da expressão do mRNA de FoxO3 nos animais dos grupos EAo 28 demonstra que a IC promoveu a degradação de proteínas dos cardiomiócitos, possivelmente através da ação do $\text{TNF-}\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e FoxO.

Embora o exercício físico não foi eficiente em atenuar o catabolismo proteico, foi benéfico impedindo o aumento da expressão do $\text{TNF-}\alpha$ nos animais com estenose aórtica, fato que pode ter contribuído para a melhora da estrutura e função do coração. Por outro lado, como o agente causador da IC (estenose aórtica) continua atuando, isso contribui para o contínuo aumento na degradação dos cardiomiócitos.

Poucos trabalhos mostraram alteração na expressão do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ em animais normais. Shiota et al.,¹²⁷ demonstraram que em coração de ratos saudáveis, pode ocorrer uma diminuição da expressão desse fator transcricional durante o crescimento, fato que pode explicar os resultados obtidos no nosso estudo onde a expressão foi menor no grupo Sham 28 quando comparado ao Sham 18. Isso pode estar relacionado com o envolvimento, migração e diferenciação dos mastócitos, células responsáveis pela expressão de $\text{TNF-}\alpha$ que estimulam a

expressão de NF-kB nas células musculares cardíacas, durante a angiogênese no crescimento dos animais.

O treinamento físico promove adaptações estruturais no coração, como o aumento da massa muscular do miocárdio, caracterizando a hipertrofia fisiológica⁶⁹, sendo a via do IGF-1-phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT diretamente associada com o aumento da massa muscular cardíaca nesse processo¹¹². Serner et al.¹²⁸ observaram que, exercícios de resistência promovem o aumento da expressão do IGF-1 cardíaco e ativação da via do PI3K e estão implicados na hipertrofia de cardiomiócitos¹²⁹. No presente experimento, no músculo cardíaco dos animais do grupo EAo 28, houve uma diminuição na expressão do IGF-1 comparado com o grupo Sham 28 e com o grupo EAo 18, demonstrando que na IC ocorre a diminuição da síntese de proteínas, sendo essa diminuição maior quando comparada com a fase de remodelação cardíaca. Tendo em vista o equilíbrio existente entre as vias do catabolismo e anabolismo proteico intracelular¹³⁰, podemos inferir que na IC induzida por estenose aórtica, promoveu um aumento da degradação e diminuição na síntese de proteínas nos cardiomiócitos, fato que não foi evidenciado no coração na fase da disfunção cardíaca. O treinamento não foi eficiente em atenuar o processo de degradação e a diminuição da síntese de proteínas, indicando a contínua destruição dos cardiomiócitos.

Os danos provocados pela sobrecarga pressórica induzem alterações estruturais no coração, não só através de hipertrofia dos cardiomiócitos, mas também pelas alterações de proteínas da matriz extracelular, como o aumento do colágeno caracterizando a fibrose^{131,132}; esse fato pode ser responsável pelo coração responder ao aumento da pressão de trabalho por remodelação adaptativa benéfica ou prejudicial¹³³. Em nosso estudo, demonstramos que a estenose aórtica aumentou a expressão dos genes relacionados à fibrose (Col1A1 e fibrilina) e dos microRNAs, miR-21 (pró-fibrótico) e miR-29b (anti-fibrótico) no grupo EAo 18; no grupo EAo 28, a expressão do Col1A1 aumentou, a expressão do miRs-21 aumentou enquanto a expressão do miR-29b diminuiu. A expressão do miR-21 está relacionada com o aumento da expressão do TGF- β , fator envolvido com o aumento do colágeno. Assim, o aumento do TGF- β nos animais dos grupos EAo 18 e EAo 28 pode estar relacionado com o aumento da expressão gênica do colágeno no músculo cardíaco nesses grupos, embora a morfologia não tenha mostrado diferença na proteína do colágeno no grupo EAo 18 semanas. O processo de fibrose no grupo EAo 28, demonstrado também pela morfologia, possivelmente está ocorrendo com a participação da via do TGF- β , estimulado pela ação do miR-21 (pró-fibrótico) e pela diminuição da expressão do miR-29b (anti-fibrótico), conforme

indicado por vários autores que descrevem que o TGF- β está relacionado com a estimulação do miR-21 e com a supressão do miR-29^{134,135}. Já, durante a disfunção cardíaca (18 semanas após a cirurgia de indução da estenose aórtica), embora a morfologia não demonstrou alteração no colágeno, o aumento na expressão gênica do colágeno pode ter ocorrido via TGF- β estimulado somente pela ação do miR-21 (pró-fibrótico).

O treinamento físico, durante a IC, promoveu aumento na expressão gênica de Col1A2 e da elastina no grupo EAoTR que pode ser decorrente, entre outros fatores, da ação do miR-21 (pró-fibrótico), embora a proteína do colágeno não foi alterada pela análise morfológica. Por outro lado, o aumento na expressão do miR-29b neste grupo indica que o treinamento foi efetivo em aumentar a ação anti-fibrose, possivelmente na tentativa de atenuar a fibrose. Assim, embora uma importante característica da hipertrofia cardíaca patológica e consequente IC seja a fibrose, caracterizada pelo aumento do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular¹³⁶, este componente pode funcionar como um "selante" unindo fibrilas de colágeno¹³⁷ e tornando o tecido mais elástico e estável às contrações consecutivas no coração durante a IC. Desta forma, o aumento da expressão de colágeno Col1A2 e de elastina no grupo EAoTR pode favorecer a organização e adaptação do coração para um órgão mais elástico, estável e consequentemente mais adaptativo durante a IC.

CONCLUSÃO

Nossos dados mostraram que durante a transição entre a disfunção cardíaca e a IC ocorre o aumento do catabolismo, diminuição do anabolismo celular, aumento da inflamação e a fibrose. O treinamento aeróbico realizado durante a transição entre a disfunção cardíaca e a IC teve efeitos benéficos sobre a estrutura e função cardíaca, diminuiu a inflamação, favoreceu a fibrose cardíaca sem atenuar a ação de genes relacionados com o catabolismo e anabolismo celular.

REFERÊNCIAS

1. Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J. *Histologia Básica*. 556 (Guanabara Koogan, 2013).
2. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histology: A text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
3. Dal-Pai, M., Dal-Pai, V. & Carvalho, R. F. in *Células uma abordagem Multidisciplinar* p. 83–94. (2005).
4. Poole, D. C., Copp, S. W., Hirai, D. M. & Musch, T. I. Dynamics of muscle microcirculatory and blood-myocyte O₂ flux during contractions. *Acta Physiol. (Oxf)*. **202**, 293–310 (2011).
5. Mady, C. Situação atual do tratamento da insuficiência cardíaca no Brasil. *Arq. Bras. Cardiol.* **89**, e84–e86 (2007).
6. The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur. Heart J.* **33**, 1750–7 (2012).
7. Liew, C.-C. & Dzau, V. J. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 811–25 (2004).
8. Crimi, E., Ignarro, L. J., Cacciatore, F. & Napoli, C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 292–300 (2009).
9. EA, B. *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* **93** (1 supl, 1–71 (2009).
10. Brum, P. C. *et al.* Aerobic exercise training in heart failure : impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function Aerobic exercise training in heart failure : impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **44**, 827–835 (2011).
11. Mendes, O. de C. *et al.* [Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction]. *Arq. Bras. Cardiol.* **94**, 62–70 (2010).
12. Bregagnollo, E. A. *et al.* Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq. Bras. Cardiol.* **84**, 225–232 (2005).
13. Bregagnollo, E. a *et al.* Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int. J. Cardiol.* **117**, 109–14 (2007).
14. Bregagnollo, E. A. *et al.* Papel relativo da remodelação geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na transição da hipertrofia

- compensada para a falência cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar. *Arq. Bras. Cardiol.* **88**, 225–233 (2007).
15. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
 16. Norton, G. R. *et al.* Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 664–71 (2002).
 17. Cicogna, A. C., Padovani, C. R., Okoshi, K., Aragon, F. F. & Okoshi, M. P. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am. J. Med. Sci.* **320**, 244–248 (2000).
 18. Zornoff, L. A. M. *et al.* Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1450–5 (2002).
 19. Lionel H. Opie. *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. 648 (2004). at http://books.google.com.br/books/about/Heart_Physiology.html?id=CPVSg69CPMsC&pgis=1
 20. Anzai, T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circ. J.* **77**, 580–7 (2013).
 21. Sutton, M. G. S. J. & Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* **101**, 2981–2988 (2000).
 22. Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C. N. & Singh, R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.* **61**, 269–80 (2010).
 23. Sadoshima, J. & Izumo, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 551–71 (1997).
 24. Okoshi, M. P., Matsubara, L. S., Franco, M., Cicogna, A. C. & Matsubara, B. B. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 1135–44 (1997).
 25. Rodrigues, M. A., Bregagnollo, E. A., Montenegro, M. R. & Tucci, P. J. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int. J. Cardiol.* **35**, 253–7 (1992).
 26. Bing, O. H. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 383–96 (1995).
 27. Johnson, F. L. Pathophysiology and etiology of heart failure. *Cardiol. Clin.* **32**, 9–19, vii (2014).

28. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* **128**, 191–227 (2010).
29. Chien, K. R. Meeting Koch's postulates for calcium signaling in cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **105**, 1339–42 (2000).
30. Gonçalves, L. M. [Physiopathologic mechanisms of ventricular remodelling]. *Rev. Port. Cardiol.* **23 Suppl 2**, II41–6 (2004).
31. D'Angelo, D. D. *et al.* Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8121–6 (1997).
32. Bueno, O. F. & Molkenkin, J. D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.* **91**, 776–81 (2002).
33. Gutkind, J. S. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**, 1839–42 (1998).
34. Castro-Chaves, P. & Leite-Moreira, A. F. [Renin-angiotensin system and its role in cardiovascular physiopathology and therapy]. *Rev. Port. Cardiol.* **23 Suppl 2**, II61–77 (2004).
35. Ruiz-Ortega, M. *et al.* Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ. Res.* **86**, 1266–72 (2000).
36. Gupta, S. *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J. Mol. Biol.* **375**, 637–49 (2008).
37. Matsui, Y. *et al.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* **100**, 914–22 (2007).
38. Zhu, H. *et al.* Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Invest.* **117**, 1782–93 (2007).
39. Jessup, M. & Brozena, S. Heart Failure. *N Engl J Med* 2007–2018 (2007). doi:10.1056/NEJMra021498
40. Towbin, J. A. Scarring in the heart--a reversible phenomenon? *N. Engl. J. Med.* **357**, 1767–8 (2007).
41. Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* **79**, 215–62 (1999).
42. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–61 (2007).

43. Cutroneo, K. R. TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair Regen.* **15 Suppl 1**, S54–60
44. Wijnen, W. J., Pinto, Y. M. & Creemers, E. E. The therapeutic potential of miRNAs in cardiac fibrosis: where do we stand? *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **6**, 899–908 (2013).
45. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. Heart J.* **29**, 2388–442 (2008).
46. Poole-Wilson, P. A. & Ferrari, R. Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 2275–85 (1996).
47. Wilson, J. R. Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 2287–92 (1996).
48. Bigard, A. X. *et al.* Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2391–401 (1998).
49. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. 277–279 (2003). doi:10.1261/rna.2183803.One
50. Wang, N., Zhou, Z., Liao, X. & Zhang, T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. *IUBMB Life* **61**, 566–71 (2009).
51. Fernandes-silva, M. M., Carvalho, V. O., Guimarães, G. V. & Bacal, F. Review Article Physical Exercise and MicroRNAs : New Frontiers in Heart Failure. 459–466 (2011).
52. Van Rooij, E. *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18255–60 (2006).
53. Naga Prasad, S. V *et al.* Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J. Biol. Chem.* **284**, 27487–99 (2009).
54. Van Rooij, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13027–32 (2008).
55. Maurer, B. *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1733–43 (2010).
56. Liu, Y. *et al.* NIH Public Access. **55**, 974–982 (2011).

57. Wang, J. *et al.* MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2150–60 (2012).
58. Abonnenc, M. *et al.* Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circ. Res.* **113**, 1138–47 (2013).
59. Quinn, S. R. & O'Neill, L. a. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int. Immunol.* **23**, 421–5 (2011).
60. Horie, T. *et al.* Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovasc. Res.* **87**, 656–64 (2010).
61. Da Costa Martins, P. a *et al.* Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* **118**, 1567–76 (2008).
62. Morishita, R. *et al.* In vivo transfection of cis element “decoy” against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat. Med.* **3**, 894–9 (1997).
63. Cheng, Y. *et al.* MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart: Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? *Am. J. Pathol.* **170**, 1831–1840 (2007).
64. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12481–6 (2006).
65. Zhao, Y.-Y. *et al.* Neuregulin Signaling in the Heart : Dynamic Targeting of erbB4 to Caveolar Microdomains in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **84**, 1380–1387 (1999).
66. De Souza, R. W. A. *et al.* Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *BMC Genomics* (2014).
67. Edward Lyle Fox & Donald Kenneth Mathews. *The Physiological Basis of Physical Education and Athletics*. 677 (Saunders College Publishing, 1981).
68. O'Toole, M. L. & Douglas, P. S. Applied physiology of triathlon. *Sports Med.* **19**, 251–67 (1995).
69. Stratton, J. R., Levy, W. C., Cerqueira, M. D., Schwartz, R. S. & Abrass, I. B. Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in healthy men. *Circulation* **89**, 1648–55 (1994).
70. Kanakis, C. & Hickson, R. C. Left ventricular responses to a program of lower-limb strength training. *Chest* **78**, 618–21 (1980).
71. Medeiros, A. *et al.* Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J. Appl. Physiol.* **104**, 103–9 (2008).

72. Kemi, O. J. *et al.* Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* **214**, 316–21 (2008).
73. Latronico, M. V. G., Costinean, S., Lavitrano, M. L., Peschle, C. & Condorelli, G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1015**, 250–60 (2004).
74. McMullen, J. R. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12355–60 (2003).
75. Barbier, J., Lebillier, E., Ville, N., Rannou-Bekono, F. & Carré, F. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **13**, 115–21 (2006).
76. Urhausen, A. & Kindermann, W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. *Sports Med.* **28**, 237–44 (1999).
77. Colan, S. D. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiol. Clin.* **15**, 355–72 (1997).
78. Ehsani, A. A., Hagberg, J. M. & Hickson, R. C. Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am. J. Cardiol.* **42**, 52–6 (1978).
79. Maron, B. J., Pelliccia, A., Spataro, A. & Granata, M. Reduction in left ventricular wall thickness after deconditioning in highly trained Olympic athletes. *Br. Heart J.* **69**, 125–8 (1993).
80. Sarquella-Brugada, G. *et al.* Genetics of sudden cardiac death in children and young athletes. *Cardiol. Young* **23**, 159–73 (2013).
81. Patten, I. S. *et al.* Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature* **485**, 333–8 (2012).
82. Lunde, P. K., Sjaastad, I., Schiøtz Thorud, H. M. & Sejersted, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. *Acta Physiol. Scand.* **171**, 277–94 (2001).
83. Schulze, P. C., Gielen, S., Schuler, G. & Hambrecht, R. Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. *Int. J. Cardiol.* **85**, 141–9 (2002).
84. Nader, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass : getting the “ AKT ” together. **37**, 1985–1996 (2005).
85. Mendes, O. C. *et al.* Exercise tolerance in rats with aortic stenosis and ventricular diastolic and/or systolic dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.* **100**, 44–51 (2013).

86. Ribeiro, H. B. *et al.* Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supra-avalvular aortic stenosis. *Arq. Bras. Cardiol.* **81**, 569–75, 562–8 (2003).
87. Carvalho, R. F. *et al.* Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int. J. Exp. Pathol.* **84**, 201–6 (2003).
88. Moreira, V. O. *et al.* [Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats]. *Arq. Bras. Cardiol.* **86**, 432–8 (2006).
89. Cicogna, A. C. *et al.* Direct effects of colchicine on myocardial function: studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **33**, 60–5 (1999).
90. Boluyt, M. O. *et al.* Heart failure after long-term supra-avalvular aortic constriction in rats. *Am. J. Hypertens.* **18**, 202–12 (2005).
91. Mendes, O. C. *et al.* Tolerância ao Esforço em Ratos com Estenose Aórtica e Disfunção Ventricular Diastólica e / ou Sistólica. (2012).
92. Ferreira, J. C. B. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 760–5 (2007).
93. Carvalho, J. F., Masuda, M. O. & Pompeu, F. A. M. S. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **140**, 409–13 (2005).
94. Baldari, C. *et al.* Accuracy, reliability, linearity of Accutrend and Lactate Pro versus EBIO plus analyzer. *Eur. J. Appl. Physiol.* **107**, 105–11 (2009).
95. Pérez, E. H., Dawood, H., Chetty, U., Esterhuizen, T. M. & Bizaare, M. Validation of the Accutrend lactate meter for hyperlactatemia screening during antiretroviral therapy in a resource-poor setting. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 553–6 (2008).
96. De Sousa, E. *et al.* Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc. Res.* **56**, 260–8 (2002).
97. Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W. & Alway, S. E. Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *J. Appl. Physiol.* **97**, 277–85 (2004).
98. Pacagnelli, F., Okoshi, K., Campos, D. & Wagner, R. Physical Training Attenuates Cardiac Remodeling in Rats with Supra-aortic Stenosis. *Exp. Clin. Cardiol.* **20**, 3889–3905 (2014).
99. De Paiva, S. A. R. *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H2242–6 (2003).

100. Litwin, S. E. *et al.* Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* **91**, 2642–54 (1995).
101. Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J. & Weyman, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* **58**, 1072–83 (1978).
102. Picard, M. H. *et al.* American Society of Echocardiography recommendations for quality echocardiography laboratory operations. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **24**, 1–10 (2011).
103. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126–39 (2006).
104. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
105. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 633 (Prentice-Hall New Jersey, 1999).
106. Depre, C. *et al.* Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **4**, 1269–75 (1998).
107. Rajabi, M., Kassiotis, C., Razeghi, P. & Taegtmeyer, H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail. Rev.* **12**, 331–43 (2007).
108. Piepoli, M. F., Davos, C., Francis, D. P. & Coats, A. J. S. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* **328**, 189 (2004).
109. Feldman, A. M., Weinberg, E. O., Ray, P. E. & Lorell, B. H. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ. Res.* **73**, 184–92 (1993).
110. Giannuzzi, P., Temporelli, P. L., Corrà, U. & Tavazzi, L. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction and Chronic Heart Failure (ELVD-CHF) Trial. *Circulation* **108**, 554–9 (2003).
111. Smart, N. A. & Steele, M. The effect of physical training on systemic proinflammatory cytokine expression in heart failure patients: a systematic review. *Congest. Heart Fail.* **17**, 110–4
112. Dorn, G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**, 962–70 (2007).

113. Morissette, M. R. *et al.* Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ. Res.* **99**, 15–24 (2006).
114. Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 339–43 (1988).
115. MacLellan, W. R. & Schneider, M. D. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 289–319 (2000).
116. Selvais, P. L. *et al.* Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**, 636–642 (1998).
117. Herron, T. J. Small Amounts of alpha-Myosin Heavy Chain Isoform Expression Significantly Increase Power Output of Rat Cardiac Myocyte Fragments. *Circ. Res.* **90**, 1150–1152 (2002).
118. Emter, C. a & Baines, C. P. Low-intensity aerobic interval training attenuates pathological left ventricular remodeling and mitochondrial dysfunction in aortic-banded miniature swine. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H1348–56 (2010).
119. Chicco, A. J. *et al.* Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* **51**, 1096–102 (2008).
120. Emter, C. a, McCune, S. a, Sparagna, G. C., Radin, M. J. & Moore, R. L. Low-intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2030–8 (2005).
121. Schultz, R. L. *et al.* Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. *Hypertension* **50**, 410–416 (2007).
122. Argilés, J. M. & López-Soriano, F. J. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* **19**, 223–48 (1999).
123. Baldwin, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649–83 (1996).
124. Acharyya, S. *et al.* Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *Regulation* **114**, (2004).
125. Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1974–84 (2005).
126. Sandri, M. *et al.* Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. **117**, 399–412 (2004).

127. Kovanen, P. T. *et al.* A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. 1935–1944 (1935). doi:10.1097/01.hjh.0000084766.37215.f2
128. Neri Serneri, G. G. *et al.* Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ. Res.* **89**, 977–82 (2001).
129. Oudit, G. Y. *et al.* Phosphoinositide 3-Kinase γ -Deficient Mice Are Protected From Isoproterenol-Induced Heart Failure. *Circulation* **108**, 2147–2152 (2003).
130. Souza, R. W. A. *et al.* Aerobic Exercise Training Prevents Heart Failure-Induced Skeletal Muscle Atrophy by Anti-Catabolic, but Not Anabolic Actions. **9**, (2014).
131. Kania, G., Blyszczuk, P. & Eriksson, U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 247–52 (2009).
132. Creemers, E. E. & Pinto, Y. M. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc. Res.* **89**, 265–72 (2011).
133. Kim, H. E. *et al.* Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J. Clin. Invest.* **106**, 857–66 (2000).
134. Massagué, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597–641 (1990).
135. Chung, A. C. K. *et al.* Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs. *Mol. Ther.* **21**, 388–98 (2013).
136. Berk, B. C., Fujiwara, K. & Lehoux, S. Review series ECM remodeling in hypertensive heart disease. **117**, (2007).
137. Skrbic, B. *et al.* Differential regulation of extracellular matrix constituents in myocardial remodeling with and without heart failure following pressure overload. *Matrix Biol.* **32**, 133–42 (2013).

ANEXOS

Anexo 1



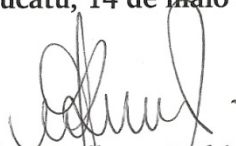
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **495-CEUA**, sobre "Perfil global da expressão gênica e de microRNAs no músculo esquelético durante a transição entre a disfunção e a insuficiência cardíaca", sob a responsabilidade de **Maeli Dal Pai**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 14 de maio de 2013.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secda@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



Anexo 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

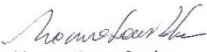
Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1035-2013) "Perfil global da expressão gênica e de microRNAs no músculo esquelético durante a transição entre a disfunção e a insuficiência cardíaca", a ser conduzido por Warlen Pereira Piedade, orientado pela Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva, co-orientado por Robson Francisco Carvalho, com a colaboração do Prof. Titular Antonio Carlos Cicogna, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 29/08/2013



Profª Adjunta Noeme Sousa Rocha
Presidente no exercício da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br