



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

Gustavo Augusto Ferreira Mota

**Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca,
proliferação de cardiomiócitos e níveis de angiotensina-
(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com
disfunção ventricular**

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

Orientador: Prof. Emérito Antonio Carlos Cicogna

**Botucatu
2017**

Gustavo Augusto Ferreira Mota

Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca, proliferação de cardiomiócitos e níveis de angiotensina-(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com disfunção ventricular

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

Orientador: Prof. Emérito Antonio Carlos Cicogna

**Botucatu
2017**

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

Mota, Gustavo Augusto Ferreira.

Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca, proliferação de cardiomiócitos e níveis de angiotensina-(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com disfunção ventricular / Gustavo Augusto Ferreira Mota. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101002

1. Coração - Doenças. 2. Disfunção Ventricular. 3. Células - Proliferação. 4. Miócitos Cardíacos. 5. Exercícios físicos. 6. Angiotensina. 7. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: disfunção cardíaca; proliferação de cardiomiócitos; ratos; receptor *Mas* ; treinamento físico.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Sebastião Augusto e minha mãe Elza Paula, que ainda hoje, não medem esforços para que eu tenha a oportunidade de ter um bom estudo, ensinando como seguir o melhor caminho para que eu possa ser feliz neste plano. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filho de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigado por tudo. Amo muito vocês!

Agradecimentos

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

Agradeço a Deus, pois nele encontro a força que necessito para continuar a minha jornada.

Ao Prof. Antonio Carlos Cicogna, por ter aceitado me orientar. Agradeço pelos aconselhamentos no sentido de ser uma pessoa íntegra, ética, disciplinada e competente naquilo que faz, sempre me incentivando a sair da zona de conforto e ir em busca de outros desafios para meu crescimento intelectual e pessoal. Obrigado!

Aproveito para agradecer também ao Prof. Dr. Mário Sugizaki, o qual tive a oportunidade de conviver no decorrer da minha iniciação científica e que me incentivou a ingressar na Pós-Graduação.

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

À minha namorada Mariana Gatto, que colaborou para a realização deste estudo, além de seu incentivo, amizade, paciência, carinho e por me apoiar nas horas mais difíceis e compartilhar os momentos de felicidade. Te amo!

Aos amigos e companheiros do EAoTF: Dijon Campos, Vitor Loureiro e Sérgio Borges, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

As amigas do *Lab. Cic.*, Paula Grippa, Loreta De Tomasi, Danielle Vileigas, Danielle Bertani, obrigado pela ajuda e convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela pronta disponibilidade e assistência estatística dada a este trabalho.

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

Ao Prof. Dr. Éneas Gomes, por me receber e abrir as portas do laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular na UFPB. Muito obrigado pela sua disponibilidade e contribuição científica. As pós-graduandas Andrezza Miná, Bruna Dantas e Aline Lara, pela contribuição acadêmica e experimental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Sérgio, que disponibilizou o laboratório de Estudos do Treinamento Físico na UFPB para continuarmos o treinamento dos animais e ao pós-graduando Gustavo que nos auxiliou no decorrer do treinamento.

À Profa. Dra. Edilamar Menezes e Dr. Tiago Fernandes, por me receberem em seu laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício – USP, para a extração dos peptídeos e pelas contribuições científicas.

Aos professores, Dr. Marcos Minicucci e Dra. Maeli Dal Pai, pelas orientações prestadas no exame geral de qualificação.

Aos Professores, Dr. Tiago Fernandes e Dra. Marjorie Golim por terem aceitado o convite para participar da banca de defesa desta dissertação.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental da FMB (UNIPLEX): José Georgette, Diego Generoso, Igor Deprá e Rodrigo Mattos por todos os auxílios prestados.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

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

Epígrafe

“O conhecimento serve para encantar as pessoas. Não para humilhá-las”.

Mario Sergio Cortella

Resumo

RESUMO

Introdução: Nos últimos anos, investigadores têm demonstrado que há a possibilidade de estimular a proliferação de cardiomiócitos adultos. Atualmente, a comunidade científica está voltada para três principais estratégias para a regeneração cardíaca: uso de células tronco, inibição de genes que regulam o sistema de controle do ciclo celular e o aperfeiçoamento de mecanismos endógenos. Um exemplo de mecanismo endógeno é a estimulação de vias de sinalização que permite a reentrada dos miócitos no ciclo celular e sua posterior divisão. O treinamento físico (TF) é um fator estimulatório para a proliferação das células cardíacas por meio da angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) via receptor *Mas*. Além disso, o TF promove cardioproteção e aumenta os níveis deste peptídeo em animais com sobrecarga pressórica. Existem evidências, recentes, que o TF promove proliferação de miócitos em diferentes modelos experimentais e atua sobre os níveis de Ang-(1-7) em corações disfuncionantes. Entretanto, não foram encontrados estudos que avaliaram, concomitantemente, os efeitos do TF sobre a função, níveis de Ang-(1-7) e receptor *Mas* miocárdicos e proliferação de cardiomiócitos em modelo de sobrecarga pressórica e deterioração da função cardíaca. **Objetivo:** Testar a hipótese que o TF atenua a queda do desempenho cardíaco, acarreta proliferação de cardiomiócitos e eleva os níveis de Ang-(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com estenose aórtica supravalvar (EAo) e disfunção ventricular esquerda. **Métodos:** Ratos *Wistar* machos foram separados em dois grupos: controle operado (Sham) e EAo. Após 18 semanas do procedimento cirúrgico, os ratos EAo e Sham foram redistribuídos em 4 grupos e randomizados quanto a presença ou ausência do TF por 10 semanas; (Sham, n = 20), (EAo, n = 19), (ShamTF, n = 20) e (EAoTF, n = 15). A remodelação cardíaca foi caracterizada pelas análises estrutural e funcional

por ecocardiograma na 18ª e 28ª semana e estudo macroscópico *post mortem*. A análise da capacidade funcional dos animais foi realizada pelo teste de esforço progressivo. A avaliação da proliferação dos cardiomiócitos, pelo conteúdo de DNA, foi feita por citometria de fluxo. O sistema renina angiotensina cardíaco foi analisado pela expressão proteica dos receptores *Mas* e AT1 por Western blot. **Resultados:** O TF promoveu melhoria na capacidade funcional dos animais Sham e EAo quanto a velocidade de exaustão, tempo total e distância percorrida. Ao iniciar o TF na 18ª semana os animais EAo apresentavam disfunção diastólica, sistólica e hipertrofia ventricular esquerda concêntrica. Na 28ª semana, este grupo manteve o mesmo padrão de disfunção cardíaca. O TF não acarretou alteração na função diastólica e melhorou a estrutura e função sistólica dos animais EAo. Os animais ShamTF mostraram aumento da função sistólica comparados com o Sham. Não foram observadas diferenças entre os quatro grupos estudados em relação ao ciclo celular dos cardiomiócitos e expressão do receptor *Mas* no miocárdio. Houve diminuição da expressão do receptor AT1 no grupo EAo, e o TF não alterou este padrão no EAoTF. **Conclusão:** O treinamento físico melhorou a capacidade funcional e a função sistólica dos animais, sem repercussões benéficas sobre a função diastólica, proliferação de cardiomiócitos e expressão proteica do receptor *Mas*. **Palavras-chave:** Disfunção cardíaca, treinamento físico, ratos, proliferação de cardiomiócitos, receptor *Mas*.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: In the last years, researchers have showed that it is possible to induce adult cardiomyocytes proliferation. Currently, the scientific community is focused on three main strategies for cardiac regeneration: stem-cell use, inhibition of genes that regulate cell-cycle control system and improvement of endogenous mechanisms. An example of endogenous mechanism is the stimulation of signaling pathways that allow the reentry of myocytes into the cell cycle and their posterior division. The physical training (PT) is a stimulatory factor for the proliferation of cardiac cells through angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) via Mas-receptor. In addition, PT promotes heart protection and increases this peptide levels in animals with pressure overload. Recent evidences showed that PT promotes myocyte proliferation in distinct experimental models and acts on Ang-(1-7) levels in dysfunctional hearts. However, no studies were found that evaluated, concurrently, the effects of PT on cardiac function, myocardial levels of Ang-(1-7) and Mas receptor and cardiomyocyte proliferation in a model of pressure overload with deteriorated cardiac function.

Objective: To test the hypothesis that PT attenuates the impairment in cardiac performance, leads to cardiomyocyte proliferation and increases myocardial Ang-(1-7) and Mas-receptor levels in rats with supralvalvar aortic stenosis (AS) and left ventricular dysfunction. **Methods:** Male Wistar rats were separated into two groups: operated control (Sham) and AS. After 18 weeks of the surgical procedure, AS and Sham rats were redistributed into four groups and randomized for the presence or absence of PT for 10 weeks; (Sham, n=20), (AS, n=19), (ShamPT, n=20) and (ASPT, n=15). Cardiac remodeling was characterized by structural and functional analysis by echocardiogram at the 18th and 28th week and by post-mortem macroscopic evaluation. The functional capacity of the groups was analyzed by the progressive

treadmill running test. The cardiomyocyte proliferation was evaluated by DNA content using flow cytometry. The cardiac renin-angiotensin system was analyzed by protein expression of Mas and AT1 receptors by Western blot. **Results:** The PT improved the functional capacity of Sham and AS animals regarding the exhaust speed, total time and treadmill running distance. At the beginning of PT, at the 18th week, the AS group presented diastolic and systolic dysfunction and concentric left ventricular hypertrophy. At the 28th week, AS group maintained the same pattern of cardiac dysfunction. The PT was not alter diastolic function and improved structure and systolic function in AS group. The ShamPT rats showed increased systolic function in relation to animals of Sham group. No differences were detected among the four groups regarding the cardiomyocyte cell cycle and the myocardial *Mas*-receptor expression. The expression of AT1 receptor was reduced in the AS group, and PT did not modify this pattern in ASPT group. **Conclusion:** The PT improved the functional capacity and systolic function of the rats, without beneficial repercussions on diastolic function, cardiomyocyte proliferation and protein expression of *Mas* receptor.

Keywords: Cardiac dysfunction, physical training, rats, cardiomyocytes proliferation, *Mas*-receptor.

Lista de Abreviaturas

% Δ meso: Porcentagem de encurtamento mesocárdico do ventrículo esquerdo

A 779: Antagonista seletivo da angiotensina (1-7)

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

AE: Diâmetro do átrio esquerdo

Akt: Proteína quinase B

Ang I: Angiotensina I

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)

ANOVA: Análise de variância

AO: Diâmetro da aorta

AT: Átrio

AT1: Receptor de angiotensina II tipo 1

AT2: Receptor de angiotensina II tipo 2

CPCS: Células progenitoras cardíacas

DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSVE: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

E mitral: Onda E do fluxo transmitral

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

EAo: Estenose aórtica supravalvar

EAoTF: Estenose aórtica supravalvar submetido ao TF

ECA 2: Enzima conversora de angiotensina 2

ECA: Enzima conversora de angiotensina

Esp.Rel.VE: Espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo

FC: Frequência cardíaca

FE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

G1: Crescimento celular

G2/M: Mitose

IPS: Células estaminais pluripotentes induzidas

Mas: Receptor *Mas*

mTOR: Alvo em mamífero da rapamicina

NEP: Endopeptidase neutra

Onda E: Pico de velocidade do enchimento diastólico inicial

PCF: Peso corporal final

PEP: Prolil-endopeptidase

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase

RC: Remodelação cardíaca

RNA: Ácido desoxirribonucleico

S: Síntese de DNA

Sham: Controle operado

ShamTF: Controle operado submetido ao TF

SRA: Sistema renina angiotensina

SubG1: Apoptose

TF: Treinamento físico

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VEPP: Velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo

Lista de Tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1. Teste de esforço progressivo.....	57
Tabela 2. Sinais de insuficiência cardíaca nos grupos EAo e EAoTF.....	59
Tabela 3. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos.....	61
Tabela 4. Dados anatômicos e análise macroscópica cardíaca <i>post mortem</i>	63
Tabela 5. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 18ª semana.....	64
Tabela 6. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª e 28ª semanas.....	65
Tabela 7. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular..	68

Lista de Figuras

Lista de figuras

Figura 1. Vias de formação dos peptídeos angiotensinérgicos.....	33
Figura 2. Vias contra-regulatórias do sistema renina-angiotensina.....	34
Figura 3. Delineamento experimental.....	40
Figura 4. Teste de esforço progressivo.....	43
Figura 5. Vel. exaustão, temp. total, distân. percorrida nos testes de esforço.....	58
Figura 6. Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca.....	60
Figura 7. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular..	69
Figura 8. Expressão proteica dos receptores AT1 e <i>Mas</i>	70

Lista de Quadros

Lista de quadros

Quadro 1. Protocolo de treinamento físico.....	43
---	----

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Lista de Abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

1. INTRODUÇÃO.....	30
1.1 – Objetivos.....	36
1.1.1 - Objetivo geral.....	36
1.1.2 - Objetivos específicos.....	36
1.2 – Hipótese.....	37
1.3 – Importância do trabalho.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1- Animais.....	39
2.2- Protocolo experimental.....	39
2.3- Indução de estenose aórtica supraválvular.....	40
2.4- Protocolo de treinamento físico	41
2.5- Avaliação da capacidade funcional pelo teste de esforço progressivo.....	42
2.6- Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca.....	44
2.7- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..	44
2.8- Caracterização da remodelação cardíaca.....	44
2.8.1- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	44
2.8.2- Análise estrutural e funcional por ecocardiograma.....	45
2.9- Análise da proliferação dos cardiomiócitos.....	47
2.9.1- Isolamento dos cardiomiócitos.....	47
2.9.2- Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	48
2.10- Expressão proteica pela técnica de Western Blot.....	49
2.11- Quantificação sérica e tecidual por espectrometria de massa.....	52
2.12- Análise estatística.....	53
3. RESULTADOS.....	56
3.1- Análise da capacidade funcional dos animais durante o treinamento físico..	56

3.2- Sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca.....	59
3.3- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	61
3.4- Caracterização da remodelação cardíaca.....	62
3.4.1- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	62
3.4.2- Ecocardiograma dos grupos Sham e EAO na 18 ^a semana.....	63
3.4.3- Parâmetros ecocardiográficos dos grupos na 18 ^a e 28 ^a semanas.....	64
3.5- Análise da proliferação dos cardiomiócitos.....	67
3.6- Expressão proteica pela técnica de Western Blot.....	70
4. DISCUSSÃO	72
4.1- Análise da capacidade funcional dos animais.....	72
4.2- Dados anatômicos <i>post mortem</i> e sinais clínicos de insuficiência cardíaca..	73
4.3- Estrutura e função por ecocardiograma na 18 ^a semana.....	74
4.4- Estrutura e função por ecocardiograma na 28 ^a semana.....	75
4.5- Proliferação de cardiomiócitos.....	76
4.6- Sistema renina angiotensina.....	78
4.7- Limitações do estudo.....	80
5. CONCLUSÃO	82
6. REFERÊNCIAS	84

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços e progressos na terapêutica das patologias cardiovasculares, estas ainda representam grande problema de saúde pública e são citadas como as principais responsáveis por morte no mundo (1–4). Este dado mostra a importância do entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese dessas doenças cardíacas, o que pode resultar no desenvolvimento de novas terapias.

Em resposta a determinado estresse, o coração passa por um processo de remodelação cardíaca (RC) que consiste em alterações gênicas, moleculares, celulares ou intersticiais que podem manifestar-se clinicamente por alterações no tamanho, geometria, massa e função, na tentativa de manter o seu adequado funcionamento (5–8). Dependendo da relação entre as características do agente agressor e do receptor, a RC pode a longo prazo acarretar distúrbio funcional, sistólico e diastólico e posteriormente, insuficiência cardíaca (7,9–11).

Dentre os diversos estímulos patológicos que acarretam a RC, podemos destacar a sobrecarga pressórica, entre as quais se destaca experimentalmente o modelo de estenose aórtica supravalvar (EAo) em ratos, o qual ocasiona desenvolvimento gradual da hipertrofia ventricular esquerda concêntrica (5,12–14); com sobrecarga inicial leve, acentuando-se progressivamente à medida que os animais vão ficando senescentes. Investigadores de nosso grupo mostraram que os animais com EAo apresentaram hipertrofia ventricular esquerda após 6 semanas, disfunção diastólica e melhoria do desempenho sistólico (15). Além disso, Mendes et al. (5) mostraram manutenção da disfunção diastólica e deterioração da função sistólica a partir da 12^a semana; acentuação da disfunção sistólica após a 18^a

semana e aparecimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca (IC) ao redor da 20ª semana (12,16–18).

Mesmo com os avanços científicos na área de cardiologia, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca não estão totalmente elucidados; vários desses mecanismos poderiam contribuir para a instalação da disfunção e/ou IC em ratos com EAO, como a perda do número de miócitos por necrose, apoptose e autofagia (6–8,19).

Nos últimos anos grupos de investigadores têm demonstrado que há possibilidade de estimular a proliferação de cardiomiócitos e conseqüentemente, a regeneração cardíaca (19–31). Este evento, contrapondo-se a morte celular que pode ocorrer nas patologias cardíacas, poderia acarretar melhoria no desempenho do coração disfuncionante (32,33).

Uma nova perspectiva no campo da fisiopatologia cardiovascular surgiu com a descoberta da janela proliferativa, período entre o 1º e 7º dia de vida de ratos, em que ressecção ventricular apical resulta em regeneração cardíaca completa, através da proliferação de miócitos pré-existentes (34). A partir deste momento, a comunidade científica dirigiu sua atenção para três principais estratégias utilizadas para a regeneração do miocárdio. A primeira; compreende o uso de células estaminais pluripotentes induzidas (iPS), que possuem a capacidade de se diferenciar em células progenitoras cardíacas (CPCs) (35); entretanto, estudos recentes mostraram que essas células atuam como fonte de formação de novos miócitos no coração em desenvolvimento e, em menor intensidade, no coração adulto (36). A segunda estratégia é a inibição de genes que regulam o sistema de controle do ciclo celular (28) e a terceira, mais robusta, está relacionada ao

aperfeiçoamento de mecanismos regenerativos endógenos, como a estimulação de vias de sinalização que alteram a maquinaria do ciclo celular (22,23,28,29,37–40).

As ativações dessas vias estão envolvidas no processo de proliferação de células cardíacas adultas. Kühn et al. (23) e Bersell et al. (22) demonstraram que a proliferação de cardiomiócitos adultos *in vivo* ocorria via fosfatidilinositol 3 quinase (PI3-K). Recentemente, Lin et al. (39) mostraram que a via PI3-K está relacionada com a regulação da proliferação e sobrevivência dos cardiomiócitos, corroborando com os estudos supracitados. Gomes et al. (41) sugerem que a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) estimula a proliferação de cardiomiócitos através da ativação da via PI3K/Akt (proteína quinase B), trazendo uma possibilidade para a regeneração cardíaca.

A Ang-(1-7), um importante componente funcional do sistema renina angiotensina (SRA), apresenta um amplo espectro de efeitos cardioprotetores (42), tornando-a como potencial fármaco para a proliferação das células miocitárias. É um heptapeptídeo com ausência da fenilalanina na posição 08 do peptídeo angiotensina II (Ang II). A Ang-(1-7) pode ser formada diretamente da angiotensina I (Ang I) pela ação da prolil-endorpeptidase (PEP), pela endopeptidase neutra (NEP) (43) ou através da Ang II pela ação da prolil-carboxipeptidase (PCP), PEP e da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2). Além disso, pode também ser formada via angiotensina 1-9 (Ang(1-9)) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da NEP (42,44–47) (Figura 1).

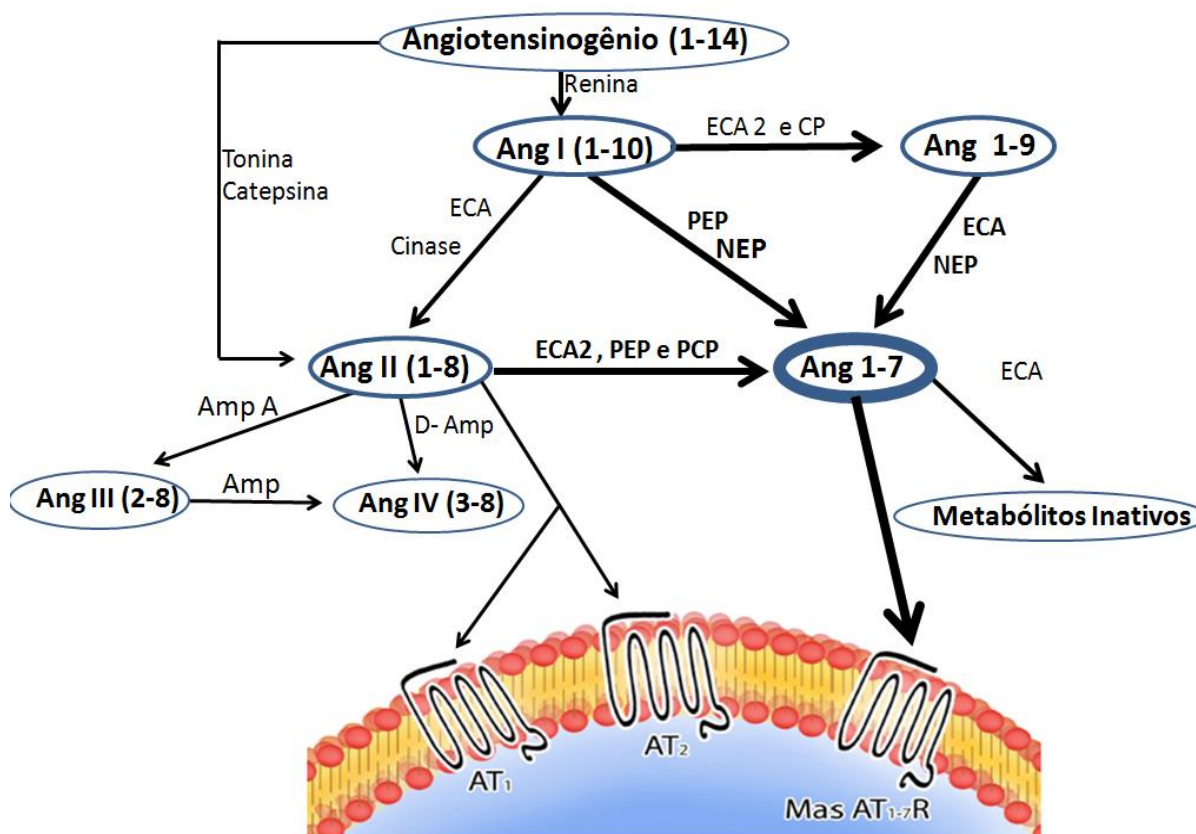


Figura 1. Vias de formação dos peptídeos angiotensinérgicos e dos receptores envolvidos nas ações da Ang II e Ang-(1-7). Ang I, Angiotensina I; Ang II, Angiotensina II; Ang III, Angiotensina III (2-8); AngIV, Angiotensina IV (3-8); Ang-(1-7), Angiotensina-(1-7); Ang-(1-9), Angiotensina-(1-9); CP, carboxipeptidase; Amp, Aminopeptidase; Amp A, Aminopeptidase A; D-Amp, Dipeptidil-aminopeptidase; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; NEP, Endopeptidase Neutra; PCP, Prolil-carboxipeptidase; PEP, Prolil-endopeptidase; AT₁: Receptor da Ang II tipo 1; AT₂: Receptor da Ang II tipo 2; Mas-AT₁₋₇R: Receptor da Ang-(1-7). Modificado de Katz, (2011) (48).

A Ang-(1-7) atua no miocárdio via receptor *Mas* (49); este proto-oncogene, vinculado à proteína G, possui sete domínios transmembrana, sendo expresso em vários tecidos, incluindo o coração. Os efeitos protetores da Ang-(1-7)/*Mas* no coração podem ser bloqueados pelo antagonista seletivo do receptor *Mas*, o A-779, o que evidencia um papel importante deste sistema no aparelho cardiovascular (42,50).

A via Ang-(1-7) atua de forma contra regulatória às ações da Ang II; um octapeptídeo que possui um importante papel na remodelação cardíaca patológica

(51–54). O heptapeptídeo Ang-(1-7) promove vasodilatação, diminuição da fibrose tecidual e da hipertrofia dos miócitos, atenuando os efeitos deletérios da Ang II (55) (Figura 2).

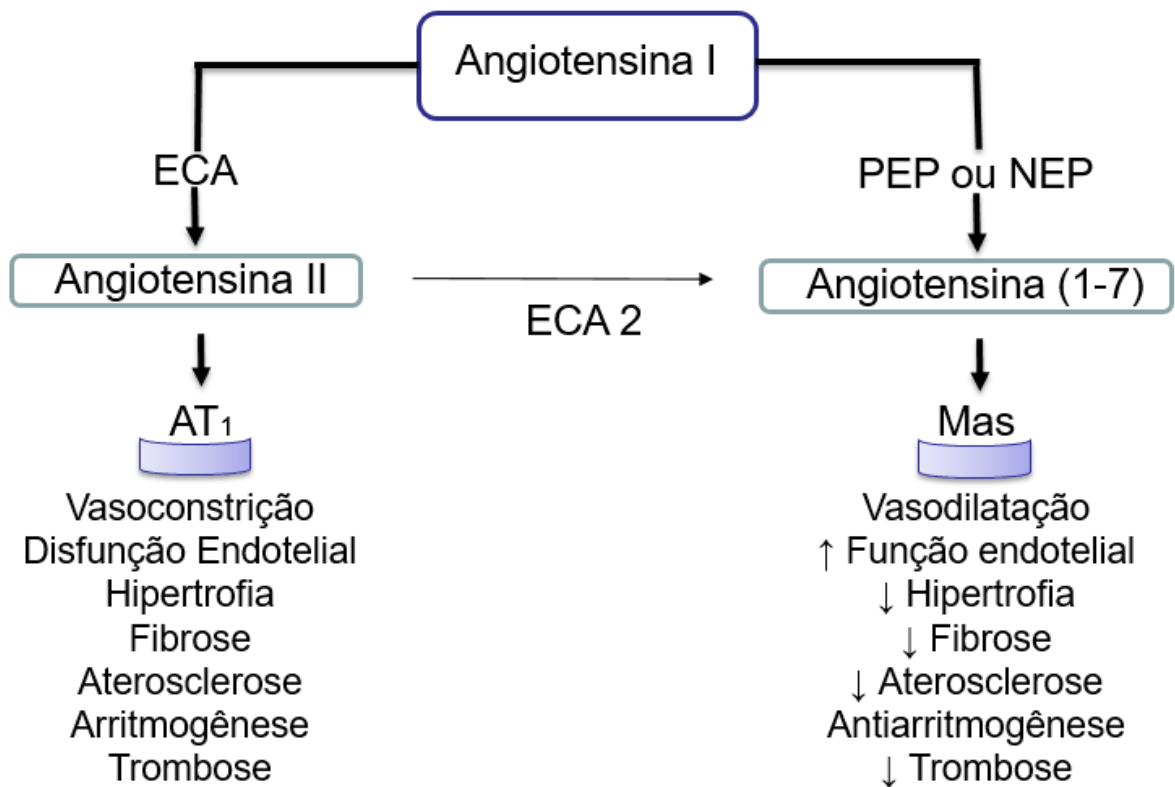


Figura 2. Vias contra regulatórias do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina II; NEP: endopeptidase neutra; PEP: prolil-endopeptidase; AT₁: receptor da angiotensina II tipo 1; Mas: receptor da angiotensina-(1-7); ↑: aumento; ↓: diminuição. Adaptado de Santos, (2007) (43)

No âmbito das terapias não farmacológicas para as doenças cardiovasculares, destaca-se o exercício físico frequente, também intitulado treinamento físico (TF), uma atividade sistematizada com um objetivo pré-estabelecido, tal como o aprimoramento das valências físicas (56). Sua importância nos dias atuais é relacionada a sua atribuição, a qual resulta na melhoria do condicionamento físico, na prevenção de doenças, na diminuição de patologias vinculadas com a senescência e por abrandar sintomas de doenças crônicas (57–60). De acordo com estas evidências, o TF é de fundamental importância para

melhorar a qualidade de vida, a longevidade e diminuir as taxas de morbimortalidade populacional (56).

A prática do TF tem sido relacionada com a diminuição da ocorrência de eventos cardíacos fatais, além de ter se tornado parte essencial de um estilo de vida saudável (57,61–63). Desta forma, diretrizes internacionais e nacionais passaram a recomendar o TF para pacientes estáveis com insuficiência cardíaca de classes I a III, de acordo com a *American Heart Association* (64,65).

Os mecanismos envolvidos no efeito protetor do TF no coração lesionado não estão totalmente compreendidos. No entanto, entre os efeitos benéficos que são conhecidos, destaca-se a ativação da via PI3K/Akt/mTOR, a qual participa da remodelação cardíaca fisiológica (66,67). Nesse sentido, trabalhos de Brum et al. mostraram que o TF contribui adicionalmente a terapia farmacológica para a melhora da função cardíaca em animais com insuficiência cardíaca (68) e que a via PI3K é ativada seletivamente na remodelação fisiológica, o que não ocorre na patológica (69). Outros autores demonstraram que o TF aumenta a concentração da Ang-(1-7) miocárdica em ratos normotensos e hipertensos (70,71), que como referenciada acima, contrapõe-se as ações deletérias da Ang II (42). Trabalhos recentes mostraram o efeito benéfico do eixo Ang-(1-7); Shah et al. (72) mostraram que ratos com ligadura da artéria renal, submetidos ao TF de corrida em esteira rolante e tratados com Ang-(1-7), preveniram a hipertensão arterial e reduziram a hipertrofia e fibrose cardíaca. Guimarães et al. (73) verificaram que a natação com intensidade moderada em camundongos knockout para o receptor *Mas*, promoveu hipertrofia cardíaca e aumento dos colágenos I e II; no entanto, nos animais com o receptor *Mas*, o treinamento acarretou aumento da Ang-(1-7) e ausência de fibrose.

Diferentes autores analisaram o efeito do TF na remodelação cardíaca em animais com cardiopatia por sobrecarga pressórica (74–78). Enquanto alguns autores mostraram que o TF promove uma melhoria ou atenuação da disfunção cardíaca (74–76) outros investigadores não detectaram alteração no desempenho deste órgão (77,79). Entretanto, estes trabalhos não avaliaram os mecanismos envolvidos nos efeitos desta terapêutica sobre a performance do coração.

Embora existam evidências recentes que o treinamento físico promove proliferação de miócitos em diferentes modelos experimentais (80–82) e atua sobre os níveis de angiotensina-(1-7) em corações disfuncionantes (70,72,73), não foram encontrados estudos que avaliaram, concomitantemente, os efeitos do TF sobre a função, níveis de angiotensina-(1-7) e receptor *Mas* miocárdicos e proliferação de cardiomiócitos em ratos com estenose aórtica e disfunção ventricular.

1.1 - OBJETIVOS

1.1.1 - Objetivo geral

Avaliar a função cardíaca, proliferação dos cardiomiócitos e os níveis de Ang-(1-7) e do receptor *Mas* no miocárdio de ratos com estenose aórtica e disfunção ventricular submetidos ao treinamento físico.

1.1.2 - Objetivos específicos

1.1.2.1- Avaliar a estrutura e função cardíaca, *in vivo*, pelo ecocardiograma;

1.1.2.2- Analisar a proliferação dos cardiomiócitos, *ex vivo*, pela citometria de fluxo;

1.1.2.3- Mensurar a expressão proteica dos receptores *Mas* e AT₁ no miocárdio por Western Blot;

1.1.2.4 - Quantificar os níveis séricos e teciduais cardíacos da Ang I, Ang II, e Ang-(1-7) por espectrometria de massa.

1.2 - HIPÓTESE

O treinamento físico atenua a queda do desempenho cardíaco, acarreta proliferação de cardiomiócitos e eleva os níveis de Ang-(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com estenose aórtica e disfunção ventricular.

1.3 - IMPORTÂNCIA DO TRABALHO

Utilizar uma terapia de baixo custo e fácil implementação, que pode colaborar na sobrevida de pacientes com cardiopatias graves, além disso, investigar possíveis mecanismos relacionados aos benefícios do TF no processo evolutivo da remodelação cardíaca.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central do *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, nas seguintes condições: gaiolas coletivas de polipropileno, tampas de arame cromado, forradas com xilana de sabugo de milho esterilizada (Suprimart, Itaquaquecetuba, São Paulo, Brasil), temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas invertido. A oferta de água e ração foi *ad libitum* e o peso corporal foi aferido semanalmente. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob o protocolo CEUA 1133-2015.

2.2 - Protocolo experimental

Inicialmente, foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supralvar (EAo). Após 18 semanas do procedimento cirúrgico, momento em que os animais com EAo apresentam sinais de disfunção ventricular esquerda (74), os ratos EAo foram redistribuídos em dois grupos semelhantes quanto a estrutura e função cardíaca e randomizados quanto a presença ou ausência do TF por um período de 10 semanas; o mesmo procedimento foi realizado nos animais Sham. Dentro deste contexto, na segunda etapa, o experimento foi composto por quatro grupos experimentais: controle

operado (Sham, n=20); estenose aórtica supralvalvar (EAo, n=19); controle operado submetido ao treinamento físico (ShamTF, n=20) e estenose aórtica supralvalvar submetido ao treinamento físico (EAoTF, n=15) (Figura 3). O delineamento experimental foi realizado de acordo com trabalhos anteriores que utilizaram o TF em ratos com EAo e disfunção ventricular (74–76). Os animais de todos os grupos foram avaliados e eutanasiados após 10 semanas do início do treinamento físico, ou seja, 28 semanas após o procedimento cirúrgico.

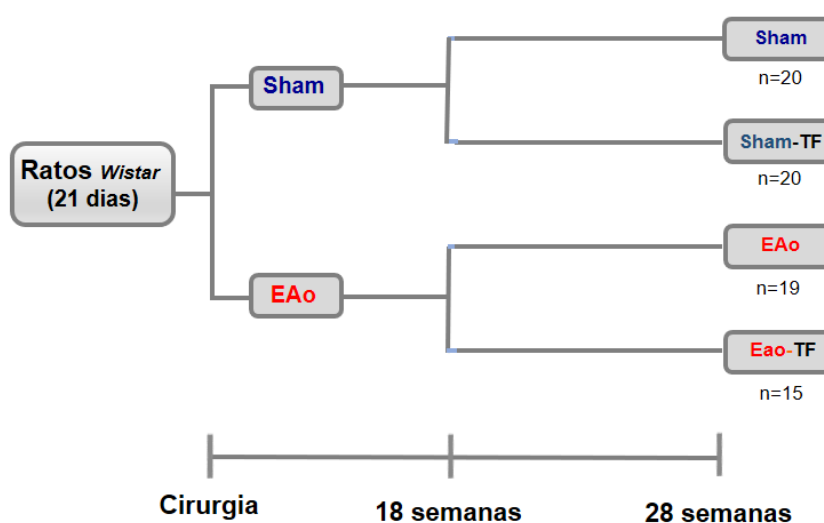


Figura 3. Delineamento experimental.

2.3 - Indução de estenose aórtica supralvalvar

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (12,17,18,51,74,83). Os animais com três a quatro semanas de vida, pesando de 70 a 90 gramas, após anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip Dopalen®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip Anasedan®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) intraperitoneal, foram submetidos à toracotomia mediana. A aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata com

0,60 mm de diâmetro interno, foi colocado aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada utilizando-se fio *mononylon* 5.0 para suturar o esterno, as camadas musculares e a pele. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com pressão positiva com oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos receberam solução isotônica (2 ml/kg, Soro fisiológico®, ADV Farma, Nova Odessa, São Paulo, Brasil) aquecido via subcutânea, Enrofloxacino (5,0 mg/kg Enrofloxacina 10%®, Mairinque, São Paulo, Brasil) via subcutânea e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Passados os efeitos do anestésico, os animais foram medicados via oral com Metamizol Sódico (30 mg/kg Dipirona®, Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, exceto pela colocação do clipe. O pós-operatório consistiu na troca da xilana de sabugo de milho das caixas diariamente, aplicação de antibiótico, analgésico e assepsia com Digliconato de Clorexidina 1% (10mg/ml, Riohex 1%®, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) da cicatriz cirúrgica durante 5 dias.

2.4 - Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico, adaptado de Pacagnelli et al. (74), foi iniciado 18 semanas após a cirurgia e envolveu um programa de corrida em esteira rolante específica para ratos (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), com frequência de 5 vezes por semana, perfazendo 10 semanas consecutivas (74). Os animais dos grupos ShamTF e EAoTF foram inicialmente submetidos a um período de adaptação à esteira, o qual consistiu em caminhada de baixa intensidade, velocidade de 5 m/min, com a finalidade de minimizar o estresse ao ambiente. O protocolo do TF foi ajustado pelo teste de esforço progressivo (Item 2.5), realizado

antes do início do treinamento e após 3 e 7 semanas desta terapia. Os animais realizaram um programa de TF aeróbio com carga equivalente a 50% da velocidade máxima atingida no teste de esforço progressivo; da 1ª à 6ª semana o tempo de duração aumentou progressivamente em 2 minutos por semana (10, 12, 14, 16, 18 e 20 minutos), sendo que, a partir da 6ª semana, o tempo foi fixado em 20 minutos (Quadro 1).

2.5 - Avaliação da capacidade funcional pelo teste de esforço progressivo

Para ajustar as velocidades do TF e avaliar o desempenho físico nos momentos pré e pós-treinamento, os grupos Sham, ShamTF, EAo e EAoTF foram submetidos ao teste de esforço progressivo, em esteira rolante, de acordo com o protocolo adaptado de Rodrigues et al. (84). As variáveis analisadas foram: velocidade de exaustão, tempo total e distância percorrida. A velocidade inicial do teste foi de 6 m/min, sendo aumentada progressivamente 3 m/min a cada 3 minutos, até à exaustão. O critério para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste, foi o momento em que o mesmo não foi capaz de manter a corrida após o incremento da velocidade da esteira rolante (Figura 4).

Quadro 1. Protocolo do treinamento físico

Momentos	Progressão do treinamento	
	Volume	Intensidade (VMC)*
Adaptação		
1º teste de esforço		
1ª semana	10 minutos	50%
2ª semana	12 minutos	50%
3ª semana	14 minutos	50%
2º teste de esforço		
4ª semana	16 minutos	50%
5ª semana	18 minutos	50%
6ª semana	20 minutos	50%
7ª semana	20 minutos	50%
3º teste de esforço		
8ª semana	20 minutos	50%
9ª semana	20 minutos	50%
10ª semana	20 minutos	50%
4º teste de esforço		

*VMC: Velocidade máxima de corrida obtida no teste de esforço.

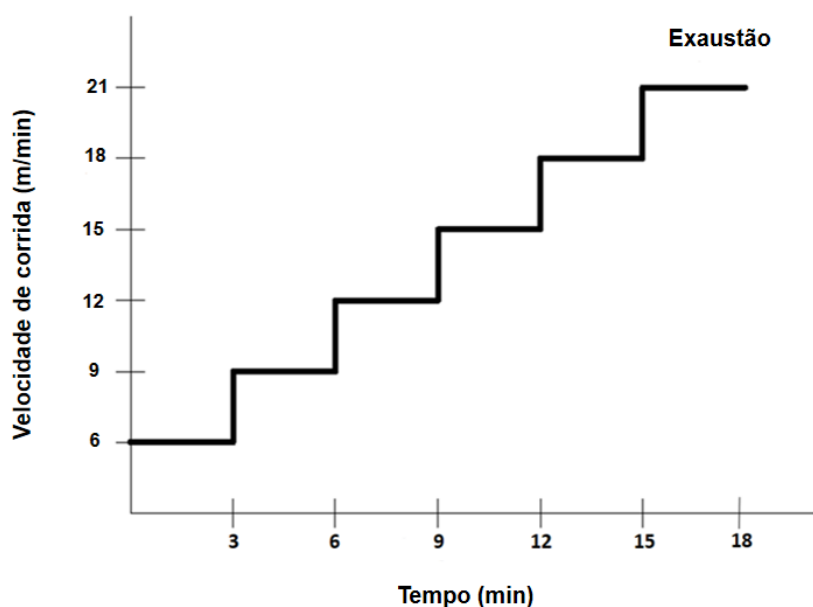


Figura 4. Teste de esforço progressivo; a velocidade inicial do teste foi de 6 m/min, sendo progressivamente aumentada, 3 m/min a cada 3 minutos, até a exaustão.

2.6 - Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca

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

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

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

2.8 - Caracterização da remodelação cardíaca

2.8.1 - Análise macroscópica do coração *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* foi realizada somente 28 semanas após a indução da EAo e permite identificar a presença de hipertrofia a nível atrial e ventricular. Os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip), eutanasiados por decapitação e o coração removido e dissecado. Para indicar o grau de hipertrofia cardíaca foram

avaliados os pesos absolutos em balança analítica dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD), dos átrios (AT) e do coração e suas relações com o comprimento da tíbia, obtendo as seguintes relações: VE/tíbia, VD/tíbia, AT/tíbia e coração/tíbia.

2.8.2 - Análise estrutural e funcional por ecocardiograma

A análise ecocardiográfica foi realizada após 18 e 28 semanas da indução de EAo. O estudo após 18 semanas teve como finalidade caracterizar estrutural e funcionalmente, os ratos Sham e EAo, a fim de formar grupos homogêneos com EAo (EAo e EAoTF) e Sham (Sham e ShamTF). O ecocardiograma representa uma alternativa para o estudo da função ventricular e pode oferecer importantes informações sobre desempenho cardíaco em roedores (85). Ele permite avaliar: 1) a morfologia e a função do coração (12,14,18); 2) a evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão(86) e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração (17). É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriais (87). É um processo que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que técnicas invasivas, como a hemodinâmica (88). É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício (88).

Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo-M com o feixe de ultrassom, orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo

esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares (14). 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. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro, em pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo intraventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e septo intraventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar a função sistólica do VE, foram calculadas a porcentagem de encurtamento mesocárdico, ΔD meso $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + EDSIV)\}$, a velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior e a fração de ejeção ($FE = DDVE^3 - DSVE^3 / DDVE^3$). No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondentes à fase de enchimento inicial (onda E) e à fase de enchimento tardio, conseqüente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da relação onda E / onda A. Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente à ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras; a medida dos fluxos foi realizada no monitor do ecocardiógrafo (89).

2.9 - Análise da proliferação dos cardiomiócitos

A análise da proliferação dos miócitos foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo.

2.9.1 - Isolamento dos cardiomiócitos

Para a obtenção dos cardiomiócitos isolados, foi utilizado o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido, como descrito por Guatimosim et al. (90). Em resumo, ao final do experimento os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip). O coração foi rapidamente removido, a artéria aorta foi canulada em sistema Langendorff e o órgão foi perfundido com solução de isolamento contendo CaCl_2 (1 M), em fluxo constante. No momento em que o coração passou a contrair regularmente, a solução de perfusão foi trocada por solução de Tyrode, livre de Ca^{+2} , contendo 140 mM de cloreto de sódio (NaCl), 5 mM de cloreto de potássio (KCl), 5 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico), 1 mM de fosfato monossódico (NaH_2PO_4), 1 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 2 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 10 mM glicose (pH 7.4) durante 4 a 6 minutos para depleção do Ca^{+2} cardíaco e lise dos discos intercalares. Em seguida, o coração foi perfundido com solução enzimática contendo 50 mM de CaCl_2 , 1.4 mg/ml de colagenase tipo II (Worthington, Lakewood, New Jersey, USA) e 0.04 mg/ml de protease tipo XIV (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 25 a 30 minutos para a lise da matriz extracelular. O coração foi removido do aparelho de perfusão, triturado aproximadamente em pedaços de 1 mm, e os miócitos foram dispersos por meio de agitação moderada em banho Maria (Modelo 100, Fanem®, Guarulhos, São Paulo, Brasil), temperatura de 37°C. Após 5 minutos de agitação em solução Tyrode

contendo 50 mM de CaCl_2 , 0.7 mg/ml de colagenase, as células foram separadas por filtração para remover pedaços de tecidos e posteriormente, centrifugadas (Centrifuge 5804 R, Eppendorf®, São Paulo, SP, Brasil) por 40 segundos, com o intuito de separar pequenas células que não são cardiomiócitos tais como células endoteliais e fibroblastos (91). As experiências foram realizadas à temperatura ambiente (22-24°C).

2.9.2 - Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

A análise da proliferação dos cardiomiócitos foi realizada por meio da identificação de alterações no ciclo celular. A citometria é amplamente utilizada em estudos que analisam a progressão do ciclo celular, possibilitando o registro dos parâmetros cinéticos destas células. Esta técnica revela a quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) pelo uso de corantes fluorescentes e a porcentagem de células nas fases SubG1, G1, S e G2/M e indica parâmetros uni ou multivariados, prognósticos e rumos terapêuticos (92).

O ciclo celular é uma sequência organizada de eventos, controlados por sinais internos e externos que resultam em duplicação e divisão celular, ou seja, proliferação celular (93). É formado por diferentes fases: fase G1, em que ocorre o crescimento celular, síntese de ácido ribonucleico (RNA) e estão presentes enzimas necessárias para a replicação do DNA; fase S, onde ocorre replicação do DNA; fase G2, formada por um segundo período de crescimento celular e síntese de proteínas e, fase M, onde ocorre a mitose e a citocinese. Além dessas quatro etapas principais, existe ainda um estágio chamado G0, onde a célula entra num estado de repouso. Cada etapa do ciclo celular possui uma quantidade específica de DNA, o que caracteriza a fase do ciclo em que a célula se encontra (94). A análise do

conteúdo de DNA de uma célula é realizada através da capacidade do iodeto de propídio de se ligar ao DNA, desta forma, a membrana plasmática deve ser primeiramente permeabilizada permitindo a entrada do corante até o núcleo. Assim, o DNA celular é marcado estequiometricamente, ou seja, a quantidade de corante é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula, permitindo a identificação da quantidade de células em cada fase do ciclo (95).

Após o isolamento das células, as mesmas foram colocadas em tubos tipo “eppendorfs” e centrifugadas a uma velocidade de 400 g, por 5 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e ajustou-se a concentração dos cardiomiócitos para $1 \times 10^4/\text{ml}$ através da contagem na câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas em uma solução de lise hipotônica contendo 0.1% de citrato de sódio, 0.1% de triton X-100 e 50 mg/L de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) e incubadas por 30 minutos. A seguir, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Trenton, New Jersey, USA). Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa Cell Quest, e dez mil eventos foram adquiridos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula. Os parâmetros analisados foram FL2-W *versus* FL2-A (94).

2.10 - Expressão proteica pela técnica de Western Blot

As proteínas analisadas no tecido cardíaco foram os receptores *Mas* e o *AT1* pela técnica de Western Blot.

2.10.1 - Técnica de Western Blot

Este método é frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico (96), sendo constituído das

seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos blots de polipetídeos (97). A metodologia está pormenorizadamente descrita abaixo.

2.10.1.1 - Extração das proteínas

Fragments do VE foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7.0, sucrose 0.3 M, DTT 0.5 mM EDTA 1 mM pH 8.0, PMSF 0.3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos eppendorfs e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método 15 de Bradford(98), utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.10.1.2 - Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240 mM, SDS 0.8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.02% e β -mercaptoetanol 200 mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL, 240 mM, pH 6.8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL, 240 mM, pH 8.8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6 a 10%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi

aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 3 horas, com tampão de corrida (Tris 0.25 M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.10.1.3 - Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0.1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCl, 20 mM, pH 7.6 e NaCl 137 mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, pH 7,4 (Tris-HCl, 20 mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0.1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M, pH 2.8; NaCl 5 M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas, sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. A imuno detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA).

Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em foto documentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

Anticorpos primários que foram utilizados

- *Anti-Angiotensin II Receptor Type-1* (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.
- *Anti-Angiotensin (1-7) Mas Receptor* (Alomone Labs, Jerusalém, Israel).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.

Anticorpo de normalização

- *β -Actin, rabbit IgG* (4967 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA) Concentração recomendada pelo fabricante, 1:200).

Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase, *Anti-Rabbit IgG-HRP* (Abcam, Cambridge, MA, USA) e *Anti-Mouse IgG-HRP* (Abcam, Cambridge, MA, USA). Os anti-anticorpos primários, foram utilizados na titulação de 1:10000. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas metodológicas.

2.10.1.4 - Quantificação das proteínas

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

2.11 – Quantificação sérica e tecidual por espectrometria de massa

A quantificação das concentrações plasmáticas e teciduais no miocárdio de Ang-(1-7) e Ang II foi realizada pela técnica de espectrometria de massa.

A extração das angiotensinas plasmáticas foi realizada através de colunas Oasis C18 (Waters, MA, USA), previamente ativadas com metanol (5 mL), tetraiodofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas em etanol / ácido acético / água na proporção 90% / 4% / 6%. As frações eluídas foram liofilizadas e redissolvidas em 500 µL de veículo em fase A (5% acetonitrila em 0.1% ácido ortofosfórico) e filtradas em membranas de 0.22 mm para análise em espectrômetro (AB Sciex 5500 QTRAP LC/MS/MS, Estugarda, Baden-Württemberg, Alemanha). As angiotensinas de cada amostra foram separadas em coluna de fase reversa ODS Aquapor 300 (250x4,6mm), 7 µl (Colunas Browlee, PerkinElmer), usando um gradiente de 5 a 35% de fase móvel B (95% de acetonitrila em 0.1% de ácido fosfórico) sob um fluxo de 1,5 mL.min⁻¹ por 40 min. As angiotensinas foram identificadas por comparação com o tempo de retenção amostras padrão de angiotensinas, e os resultados expressos em pmol.mL⁻¹ de plasma.

O tecido miocárdico foi pesado e homogeneizado em 100 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7,2, 340 mM de sucrose e 300 mM de cloreto de sódio, contendo o mesmo inibidor de proteases descrito na coleta de sangue. As amostras foram centrifugadas a 10000 g a 4°C por 20 min, e então passadas pela coluna de extração, seguindo a mesma sequência descrita para o plasma, e os resultados expressos em pmol.g⁻¹ de tecido.

2.12 – Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. A comparação entre os grupos Sham e EAo na 18ª semana pós-

indução da estenose aórtica foi realizada pelo teste “*t*” de Student ou Mann-Whitney para amostras independentes. As comparações entre os grupos no final do experimento, após as 10 semanas de treinamento físico, foram realizadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para esquema de dois fatores no experimento completamente casualizado (quando não paramétrica, Kruskal-Wallis) complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni (quando não-paramétrico, Dunn) (99). Para a comparação da frequências dos sinais de insuficiência cardíaca entre os grupos, foi utilizado o teste de associação de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (100,101). As conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de significância de 5%.

Resultados

3 - RESULTADOS

3.1 - Análise da capacidade funcional dos animais durante o treinamento físico

No decorrer do protocolo de treinamento físico, o teste de esforço foi realizado para avaliar a capacidade funcional dos animais pelas variáveis velocidade de exaustão (Vex), tempo total (TT) e distância percorrida (DP). Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 5. No momento T1, não houve diferença entre os grupos Sham (Sham vs ShamTF) e os grupos EAo (EAo vs EAoTF), nas três variáveis analisadas; entretanto as variáveis foram estatisticamente menores nos grupos EAo em relação aos Sham. Nos momentos T2, T3 e T4 o grupo ShamTF e o EAoTF apresentaram valores significativamente maiores nas três variáveis analisadas em relação aos respectivos controles. A comparação entre os diferentes momentos mostrou que no grupo ShamTF, a Vex, o TT e a DP foram semelhantes entre si, em T2, T3 e T4 e diferentes do T1. Em relação ao grupo EAo, a Vex foi semelhante em T1 e T2 e diferente de T4. E o T1, foi igual ao T3. No EAoTF a Vex e a DP foram iguais entre T1 e T2 e entre T2, T3 e T4. O TT e DP do EAo foi igual entre T1 T2 e diferente de T3 e T4, que foram semelhantes entre si. No grupo EAoTF, T1 foi diferente de T2, T3 e T4, que foram semelhantes entre si.

Tabela 1. Teste de esforço progressivo

Variável	Cirurgia	TF	Momentos do teste de esforço				Valor p
			T1	T2	T3	T4	
Velocidade de exaustão (m/min)	Sham	Ausente	25,9 ± 3,55 ^{aB}	25,9 ± 3,55 ^{aB}	23,5 ± 4,05 ^{aB}	25,0 ± 6,10 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	23,7 ± 4,66 ^{aBα}	31,6 ± 4,40 ^{bBβ}	34,0 ± 6,25 ^{bBβ}	34,6 ± 8,00 ^{bBβ}	<i>p</i> <0,01
	EAo	Ausente	17,3 ± 3,64 ^{aAβγ}	18,3 ± 3,14 ^{aAγ}	15,1 ± 4,53 ^{aAαβ}	14,0 ± 3,61 ^{aAα}	<i>p</i> <0,01
		Presente	19,4 ± 4,93 ^{aAα}	22,4 ± 4,66 ^{bAαβ}	24,6 ± 5,10 ^{bAβ}	23,6 ± 4,79 ^{bAβ}	<i>p</i> <0,01
Tempo total (min)	Sham	Ausente	23,3 ± 3,29 ^{aB}	22,7 ± 3,59 ^{aB}	21,1 ± 3,91 ^{aB}	22,4 ± 6,34 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	21,2 ± 4,35 ^{aBα}	28,9 ± 4,11 ^{bBβ}	31,1 ± 5,75 ^{bBβ}	31,8 ± 8,33 ^{bBβ}	<i>p</i> <0,01
	EAo	Ausente	14,8 ± 3,86 ^{aAβ}	15,2 ± 2,87 ^{aAβ}	12,2 ± 4,17 ^{aAα}	11,3 ± 3,21 ^{aAα}	<i>p</i> <0,01
		Presente	16,5 ± 4,53 ^{aAα}	19,4 ± 4,30 ^{bAβ}	21,8 ± 4,90 ^{bAβ}	20,9 ± 4,75 ^{bAβ}	<i>p</i> <0,01
Distância percorrida (m)	Sham	Ausente	381 ± 90,5 ^{aB}	366 ± 95,9 ^{aB}	323 ± 101 ^{aB}	366 ± 174 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	322 ± 119 ^{aAα}	553 ± 149 ^{bBβ}	638 ± 224 ^{bBβ}	683 ± 348 ^{bBβ}	<i>p</i> <0,01
	EAo	Ausente	183 ± 79,2 ^{aAβ}	183 ± 55,7 ^{aAβ}	137 ± 72,2 ^{aAα}	120 ± 52,1 ^{aAα}	<i>p</i> <0,01
		Presente	221 ± 111 ^{aAα}	285 ± 113 ^{bAαβ}	348 ± 134 ^{bAβ}	324 ± 123 ^{bAβ}	<i>p</i> <0,01

TF: Treinamento físico; Sham TF ausente (n=20): animais submetidos à cirurgia simulada; Sham TF presente (n=20): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAo TF ausente (n=19): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAo TF presente (n=15): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico. T1: teste realizado após a semana de adaptação; T2: teste realizado após 3 semanas de TF; T3: teste realizado após 7 semanas de TF; T4: teste realizado após encerramento do protocolo de treinamento físico. Letras minúsculas: comparação entre ausente vs presente fixado a cirurgia; Letras maiúsculas: comparação entre Sham e EAo fixado o treinamento. Considerando cada momento de análise isolado; Letras gregas: em 2 momentos não foram colocados; mais de 2 momentos: comparação dos tempos fixado cirurgia e treinamento. Técnica de análise de variância para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *p*<0,05.

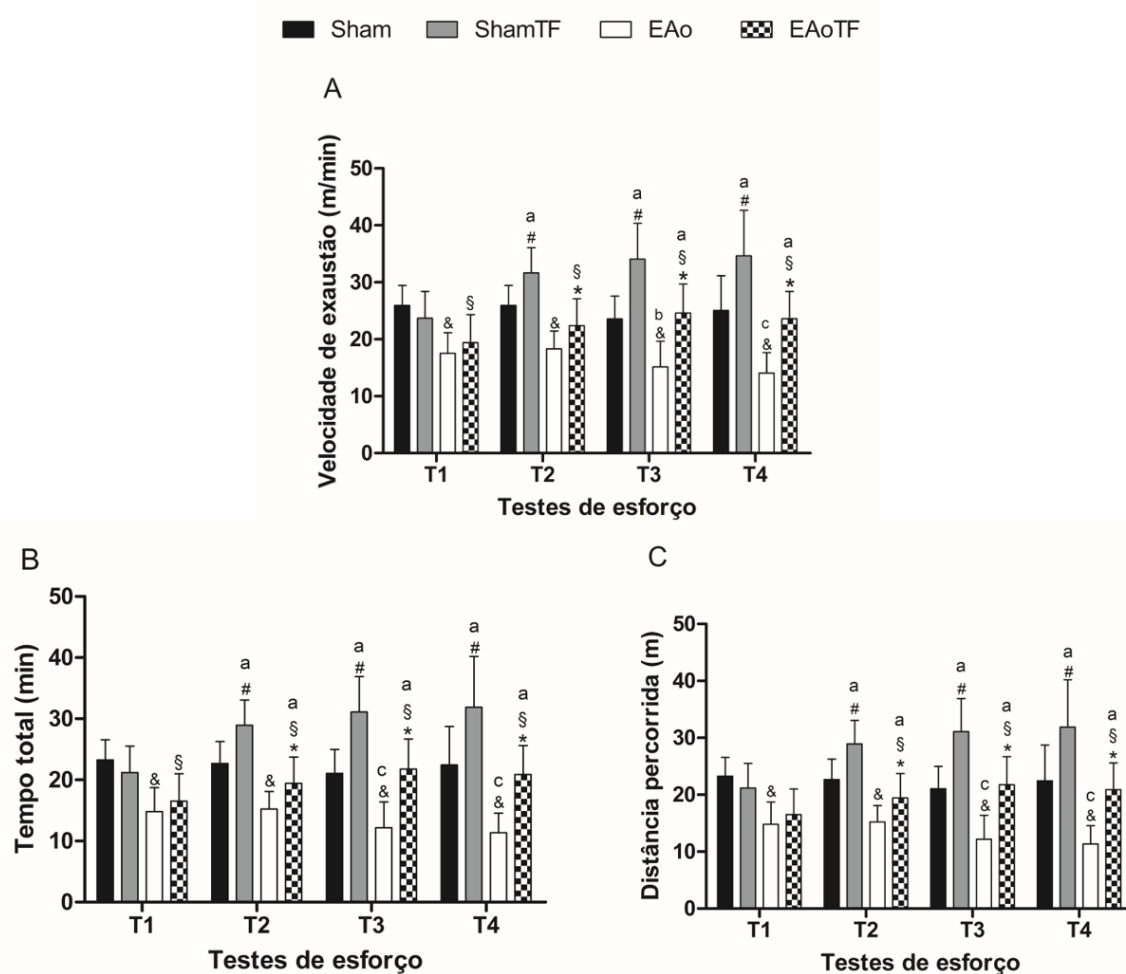


Figura 5. Velocidade de exaustão (A), tempo total (B) e distância percorrida (C) nos testes de esforço (TE) dos animais Sham (n=20), ShamTF (n=20), EAo (n=19) e EAoTF (n=15) durante o protocolo de treinamento físico (TF). T1: TE realizado após a semana de adaptação; T2: TE realizado após 3 semanas de TF; T3: TE realizado após 7 semanas de TF; T4: TE realizado após encerramento do protocolo de treinamento físico. Símbolos: * = EAo vs EAoTF; & = Sham vs EAo; § = ShamTF vs EAoTF; # = Sham vs ShamTF. Letras minúsculas: a = $p < 0,05$ vs T1; b = $p < 0,05$ vs T2; c = $p < 0,05$ vs T1 e T2. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Técnica de análise de variância para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $p < 0,05$.

3.2 - Sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca

Os sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca dos grupos EAo e EAoTF estão apresentadas na Tabela 2 e na Figura 6. Após 28 semanas de cirurgia, o grupo EAoTF apresentou diminuição da ocorrência de ascite, taquipnéia, derrame pleural, trombo no átrio esquerdo e congestão hepática, em relação ao grupo EAo.

Tabela 2. Sinais de insuficiência cardíaca nos grupos EAo e EAoTF

Grupos	Ascite (%)				Total
	Ausente	+	++	+++	
EAo	10 (52,6) ^{aB}	8 (42,1) ^{bB}	1 (5,3) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	19
EAoTF	14 (93,3) ^{bB}	1 (6,7) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	15
Taquipneia (%)					
	Ausente	+	++	+++	
EAo	1 (5,3) ^{aA}	10 (52,6) ^{aB}	7 (36,8) ^{bB}	1 (5,3) ^{aA}	19
EAoTF	7 (46,7) ^{bB}	7 (46,7) ^{aB}	1 (6,6) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	15
Derrame (%)					
	Ausente	+	++	+++	
EAo	0 (0,0) ^{aA}	5 (26,3) ^{aB}	10 (52,6) ^{aB}	4 (21,1) ^{bAB}	19
EAoTF	6 (40,0) ^{bB}	5 (33,3) ^{aB}	4 (26,7) ^{aAB}	0 (0,0) ^{aA}	15
Trombo (%)					
	Ausente	+	++	+++	
EAo	7 (36,8) ^{aA}	5 (26,3) ^{aA}	4 (21,1) ^{bA}	3 (15,8) ^{aA}	19
EAoTF	12 (80,0) ^{bB}	3 (20,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	15
Fígado (%)					
	Ausente	+	++	+++	
EAo	10 (52,6) ^{aB}	6 (31,6) ^{aAB}	2 (10,5) ^{aA}	1 (5,3) ^{aA}	19
EAoTF	13 (86,6) ^{aB}	1 (6,7) ^{aA}	1 (6,7) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	15

EAo (n=19): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAoTF (n=15): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico. Dados expressos em frequência relativa (%). Intensidade do sintoma: Ausente = ausência do sintoma; + = leve; ++ = moderado; +++ = grave. Letras minúsculas: representam a comparação entre os grupos fixado a frequência de sinais. Letras maiúsculas: representam a comparação entre a frequência de sinais fixado o grupo. Teste de associação de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinominais.

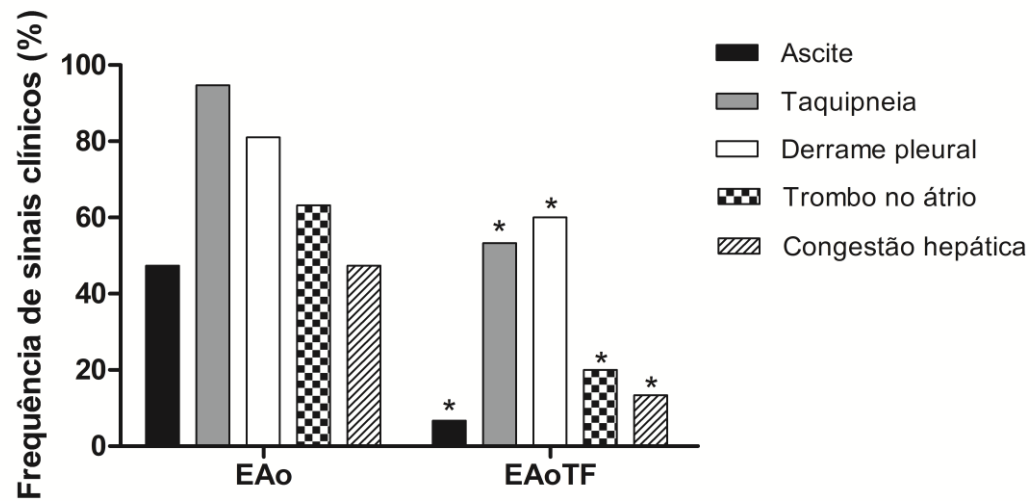


Figura 6. Sinais clínico-patológicos de IC. EAo (n=19): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAoTF (n=15): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico. Dados expressos em frequência relativa (%). Teste de associação de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinominais.

3.3- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A avaliação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos grupos Sham, ShamTF, EAo e EAoTF estão apresentados na Tabela 3. Os animais EAo apresentaram teor de água do VE e fígado significativamente maior que os animais Sham.

Tabela 3. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos

Variável	Cirurgia	Treinamento Físico		Valor <i>p</i>
		Ausente	Presente	
VE	Sham	76,7 (75,0;76,9)	76,3 (75,6;77,4)	<i>p</i> >0,05
	EAo	78,2 (77,6;79,0)	76,8 (74,6;77,5)	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>		<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	
VD*	Sham	76,5 (75,6;76,8)	76,1 (75,9;76,9)	<i>p</i> >0,05
	EAo	77,6 (76,6;78,9)	76,8 (76,5;77,4)	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>		<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	
AT	Sham	77,6 (77,0;78,3)	79,0 (76,9;80,1)	<i>p</i> >0,05
	EAo	78,9 (78,2;79,8)	78,5 (77,4;79,0)	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>		<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	
Fígado	Sham	67,2 (66,9;67,4)	67,2 (66,0;67,7)	<i>p</i> >0,05
	EAo	70,0 (67,8;70,1)	67,7 (67,1;68,8)	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>		<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	
Pulmão	Sham	78,4 (77,9;79,0)	77,5 (75,5;78,3)	<i>p</i> >0,05
	EAo	78,7 (77,1;80,1)	79,0 (77,8;79,6)	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>		<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	

Sham TF ausente (n=10): animais submetidos à cirurgia simulada; Sham TF presente (n=10): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAo TF ausente (n=10): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAo TF presente (n=10): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrios. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Kruskal-Wallis complementado com Dunn, *p*<0,05.

3.4 – Caracterização da remodelação cardíaca

3.4.1- Análise macroscópica do coração *post mortem*

Os dados de estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos quatro grupos estudados estão apresentados na Tabela 4. A estenose aórtica supraválvular provocou alterações em todas as variáveis cardíacas analisadas independente do treinamento. O treinamento físico não acarretou mudanças nas variáveis cardíacas nos grupos Sham e EAo.

Tabela 4. Dados anatômicos e análise macroscópica cardíaca *post mortem*

Variável	Cirurgia	Treinamento Físico		Valor p
		Ausente	Presente	
PCF(g)	Sham	543 ± 57,4	521 ± 55,3	<i>p</i> >0,05
	EAO	480 ± 43,4	451 ± 58,2	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,01	<0,01	
VE (g)	Sham	1,05 ± 0,19	0,86 ± 0,32	<i>p</i> >0,05
	EAO	1,46 ± 0,24	1,42 ± 0,43	<i>p</i> >0,05
Valor p		0,006	<0,001	
VD (g)	Sham	0,26 ± 0,04	0,25 ± 0,04	<i>p</i> >0,05
	EAO	0,43 ± 0,11	0,40 ± 0,14	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
AT (g)	Sham	0,13 (0,11;0,14)	0,11 (0,10;0,14)	<i>p</i> >0,05
	EAO	0,45 (0,25;0,49)	0,41 (0,29;0,45)	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
Tíbia (cm)	Sham	4,50 ± 0,11	4,43 ± 0,14	<i>p</i> >0,05
	EAO	4,54 ± 0,26	4,35 ± 0,13	<i>p</i> <0,05
Valor p		<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	
VE/tíbia (g/cm)	Sham	1,75 (1,69;1,84)	1,68 (1,54;1,83)	<i>p</i> >0,05
	EAO	3,01 (2,64;3,45)	3,23 (2,64;3,47)	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
VD/tíbia (g/cm)	Sham	0,057 ± 0,009	0,056 ± 0,010	<i>p</i> >0,05
	EAO	0,095 ± 0,024	0,100 ± 0,033	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
AT/tíbia (g/cm)	Sham	0,03 (0,02;0,03)	0,02 (0,02;0,03)	<i>p</i> >0,05
	EAO	0,09 (0,05;0,11)	0,09 (0,06;0,10)	<i>p</i> >0,05
Valor p		<0,001	<0,001	

Sham TF ausente (n=10): animais submetidos à cirurgia simulada; Sham TF presente (n=10): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAO TF ausente (n=10): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAO TF presente (n=10): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico. PCF: peso corporal final; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/tíbia: relação do peso do VE pela tíbia; VD/tíbia: relação do peso do VD pela tíbia; AT/tíbia: relação do peso do AT pela tíbia. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, *p*<0,05.

3.4.2 - Ecocardiograma dos grupos Sham e EAO na 18ª semana

Os dados ecocardiográficos dos grupos obtidos na 18ª semana após a cirurgia estão apresentados na Tabela 5. Os animais dos grupos EAO apresentaram

aumento da Esp. rel. VE, AE, AE/AO, E mitral e E/A, e diminuição da fração de ejeção, % Enc. Meso, e VEPP em relação ao grupo Sham.

Tabela 5. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 18ª semana

Variáveis	Grupos		Valor p
	Sham	EAo	
FC (bpm) [#]	323 ± 50,3	304 ± 42,1	<i>p</i> >0,05
DDVE (mm)	7,41 (6,90-7,66)	7,77 (6,90-8,18)	<i>p</i> >0,05
Esp.rel.VE	0,45 (0,41-0,46)	0,79 (0,70-0,87)	<i>p</i> <0,01
AE (mm)	4,85 (4,71-5,11)	8,18 (7,66-8,69)	<i>p</i> <0,01
AE/AO	1,24 (1,21-1,30)	1,99 (1,82-2,18)	<i>p</i> <0,01
FE	0,92 (0,90-0,94)	0,90 (0,87-0,92)	<i>p</i> <0,05
% Enc. meso[#]	28,0 ± 4,25	24,9 ± 4,47	<i>p</i> <0,05
VEPP (mm/s)	58,5 (54,0-62,0)	39,0 (35,0-47,0)	<i>p</i> <0,01
E mitral (cm/s)	84,8 (78,4-89,6)	130 ± (108-141)	<i>p</i> <0,01
E/A	1,42 (1,37-1,52)	4,69 (1,79-6,18)	<i>p</i> <0,01

Sham (n=40): animais submetidos à cirurgia simulada; EAo (n=34): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica. FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); Esp. rel. VE: espessura relativa da parede do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo (AE); AE/AO: relação entre AE e diâmetro da aorta; FE: fração de ejeção; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E mitral: onda E do fluxo transmitral; E/A: razão entre ondas E e A. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo, teste de Mann-Whitney. [#] Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste “t” de Student.

3.4.3 – Estrutura e função do coração por ecocardiograma na 18ª e 28ª semanas

Na Tabela 6 estão apresentados os dados ecocardiográficos dos grupos analisados na 18ª semana, antes do início do treinamento físico, e na 28ª semana, após o período de TF. A coluna da 18ª semana indica que os grupos Sham e EAo, na presença ou ausência do TF, são homogêneos; além disso, esta coluna mostra diferença em todas as variáveis cardiológicas, com exceção da FC e DDVE, entre os grupos Sham e EAo. Com relação ao efeito do treinamento físico, no grupo Sham

observa-se que o TF acarretou um aumento significativo nos valores da FE e VEPP; além disso, houve uma diminuição significativa na % Enc. meso nos animais sedentários, o que não ocorreu no grupo ShamTF. Em relação ao grupo EAo, pode se verificar que, em relação ao DDVE, a Esp.rel.VE e AE, o TF apresentou efeito benéfico; assim, enquanto o grupo EAo apresentou um aumento significativo do DDVE, na 28ª semana em relação a 18ª semana, no grupo EAoTF os animais tiveram uma redução na Esp. Rel. VE e no AE, e um aumento na FE e % de Enc. Meso.

Tabela 6. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª e 28ª semanas

Variável	Cirurgia	TF	Momento		Valor p
			18 semanas	28 semanas	
FC (bpm)	Sham	Ausente	324 ± 62	303 ± 42	p>0,05
		Presente	321 ± 37	327 ± 44	p>0,05
	EAo	Ausente	310 ± 48	308 ± 41	p>0,05
		Presente	297 ± 33	305 ± 28	p>0,05
Valor p			p>0,05	p>0,05	
DDVE (mm)	Sham	Ausente	7,29 ± 0,52	7,68 ± 0,66	p>0,05
		Presente	7,42 ± 0,47	7,61 ± 0,36	p>0,05
	EAo	Ausente	7,51 ± 0,98	8,03 ± 0,88	p<0,01
		Presente	7,50 ± 0,99	7,89 ± 0,87	p>0,05
Valor p			p>0,05	p>0,05	
Esp. Rel. VE	Sham	Ausente	0,45 ± 0,04 ^{aA}	0,43 ± 0,04 ^{aA}	p>0,05
		Presente	0,45 ± 0,04 ^{aA}	0,43 ± 0,03 ^{aA}	p>0,05
	EAo	Ausente	0,82 ± 0,12 ^{aB}	0,76 ± 0,12 ^{bB}	p<0,01
		Presente	0,77 ± 0,14 ^{aB}	0,71 ± 0,12 ^{aB}	p>0,05
Valor p			p<0,05	p<0,05	
AE (mm)	Sham	Ausente	4,88 ± 0,25 ^{aA}	4,95 ± 0,27 ^{aA}	p>0,05
		Presente	4,94 ± 0,25 ^{aA}	4,92 ± 0,23 ^{aA}	p>0,05
	EAo	Ausente	7,91 ± 1,12 ^{aB}	8,49 ± 0,94 ^{bB}	p<0,01
		Presente	8,14 ± 1,09 ^{aB}	7,64 ± 1,56 ^{aB}	p>0,05
Valor p			p<0,05	p<0,05	

Tabela 6. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18^a e 28^a semanas “continua”

AE/AO	Sham	Ausente	1,26 ± 0,08 ^{aA}	1,27 ± 0,11 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	1,26 ± 0,08 ^{aA}	1,24 ± 0,08 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
	EAo	Ausente	2,00 ± 0,30 ^{aB}	1,92 ± 0,46 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	2,00 ± 0,23 ^{aB}	1,86 ± 0,35 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	
FE	Sham	Ausente	0,93 ± 0,02 ^{aB}	0,91 ± 0,03 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	0,92 ± 0,02 ^{aB}	0,93 ± 0,01 ^{bB}	<i>p</i> <0,05
	EAo	Ausente	0,88 ± 0,06 ^{aA}	0,88 ± 0,04 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	0,89 ± 0,04 ^{aA}	0,91 ± 0,04 ^{bA}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	
% Enc. meso	Sham	Ausente	27,6 ± 3,23 ^{aB}	25,9 ± 2,34 ^{aA}	<i>p</i> <0,05
		Presente	28,5 ± 5,13 ^{aA}	29,2 ± 2,95 ^{bB}	<i>p</i> >0,05
	EAo	Ausente	23,9 ± 4,80 ^{aA}	24,8 ± 2,87 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	26,1 ± 3,82 ^{aA}	26,7 ± 3,24 ^{bA}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	
VEPP (mm/s)	Sham	Ausente	59,7 ± 6,59 ^{aB}	59,5 ± 5,76 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	58,2 ± 5,41 ^{aB}	65,7 ± 6,11 ^{bB}	<i>p</i> <0,001
	EAo	Ausente	39,9 ± 8,54 ^{aA}	40,0 ± 11,7 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	40,4 ± 7,59 ^{aA}	44,8 ± 11,4 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	
E mitral (cm/s)	Sham	Ausente	82,8 ± 6,70 ^{aA}	84,3 ± 10,2 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	87,3 ± 12,6 ^{aA}	87,8 ± 15,0 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
	EAo	Ausente	129 ± 27,2 ^{aB}	137 ± 29,9 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	124 ± 31,3 ^{aB}	130 ± 26,9 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	
E/A	Sham	Ausente	1,45 ± 0,14 ^{aA}	1,44 ± 0,18 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
		Presente	1,45 ± 0,13 ^{aA}	1,47 ± 0,13 ^{aA}	<i>p</i> >0,05
	EAo	Ausente	4,39 ± 2,28 ^{aB}	5,01 ± 1,67 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
		Presente	4,42 ± 2,43 ^{aB}	4,22 ± 2,26 ^{aB}	<i>p</i> >0,05
Valor <i>p</i>			<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	

Sham TF ausente (n=20): animais submetidos à cirurgia simulada; Sham TF presente (n=20): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAO TF ausente (n=19): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAO TF presente (n=15): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico. FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo (AE); AE/AO: relação entre AE e diâmetro da aorta; FE: fração de ejeção; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E mitral: onda E do fluxo transmitral; E/A: razão entre ondas E e A. Dados expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas: comparação entre ausente vs presente fixado a cirurgia; Letras maiúsculas: comparação entre Sham e EAO fixado o treinamento. Técnica de análise de variância para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $p < 0,05$.

3.5- Análise da proliferação dos cardiomiócitos

Para avaliar se o TF acarreta proliferação de cardiomiócitos, foi analisado o conteúdo de DNA nas seguintes fases do ciclo celular: SubG1, G1, S e G2/M nos quatro grupos analisados. A análise dos dados, visualizadas na Tabela 7 e na Figura 7 mostram que não houve diferença estatística entre os grupos nas quatro fases que constituem o ciclo celular. Entretanto, foi observado no grupo ShamTF diferença significativa das fases SubG1 e G1 em relação a fase S; no entanto, as fases Sub G1, G1 e G2/M não foram diferentes estatisticamente. No grupo EAo verificou-se que as fases Sub G1 e G1, foram diferentes da fase S e G2/M.

Tabela 7. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular

Cirurgia	TF	Fases do ciclo celular				Valor p
		SubG1	G1	S	G2/M	
Sham	Ausente	28,3 (11,2; 34,3)	49,5 (24,6; 64,1)	7,63 (3,80; 14,9)	17,9 (1,35; 44,2)	$p>0,05$
	Presente	30,3 (7,26; 48,1) ^β	51,1 (26,3; 62,1) ^β	6,10 (2,56; 14,5) ^α	13,3 (1,15; 52,6) ^{αβ}	$p<0,05$
EAo	Ausente	29,1 (23,9; 47,6) ^β	46,9 (38,5; 63,7) ^β	7,11(3,70; 16,9) ^β	2,94 (1,20; 19,6) ^α	$p<0,05$
	Presente	40,3 (10,9; 52,5)	40,6 (30,4; 57,8)	11,0 (2,62; 25,4)	9,06 (0,55; 34,5)	$p>0,05$
Valor p		$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	

TF: Treinamento físico; Sham TF ausente (n=8): animais submetidos à cirurgia simulada; Sham TF presente (n=6): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAo TF ausente (n=9): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAo TF presente (n=6): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; Sub G1: apoptose; G1: crescimento celular; Fase S: síntese de DNA; G2/M: mitose. Letras gregas distintas mostram diferença estatística entre as fases. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com teste de comparações múltiplas de Dunn, $p<0,05$.

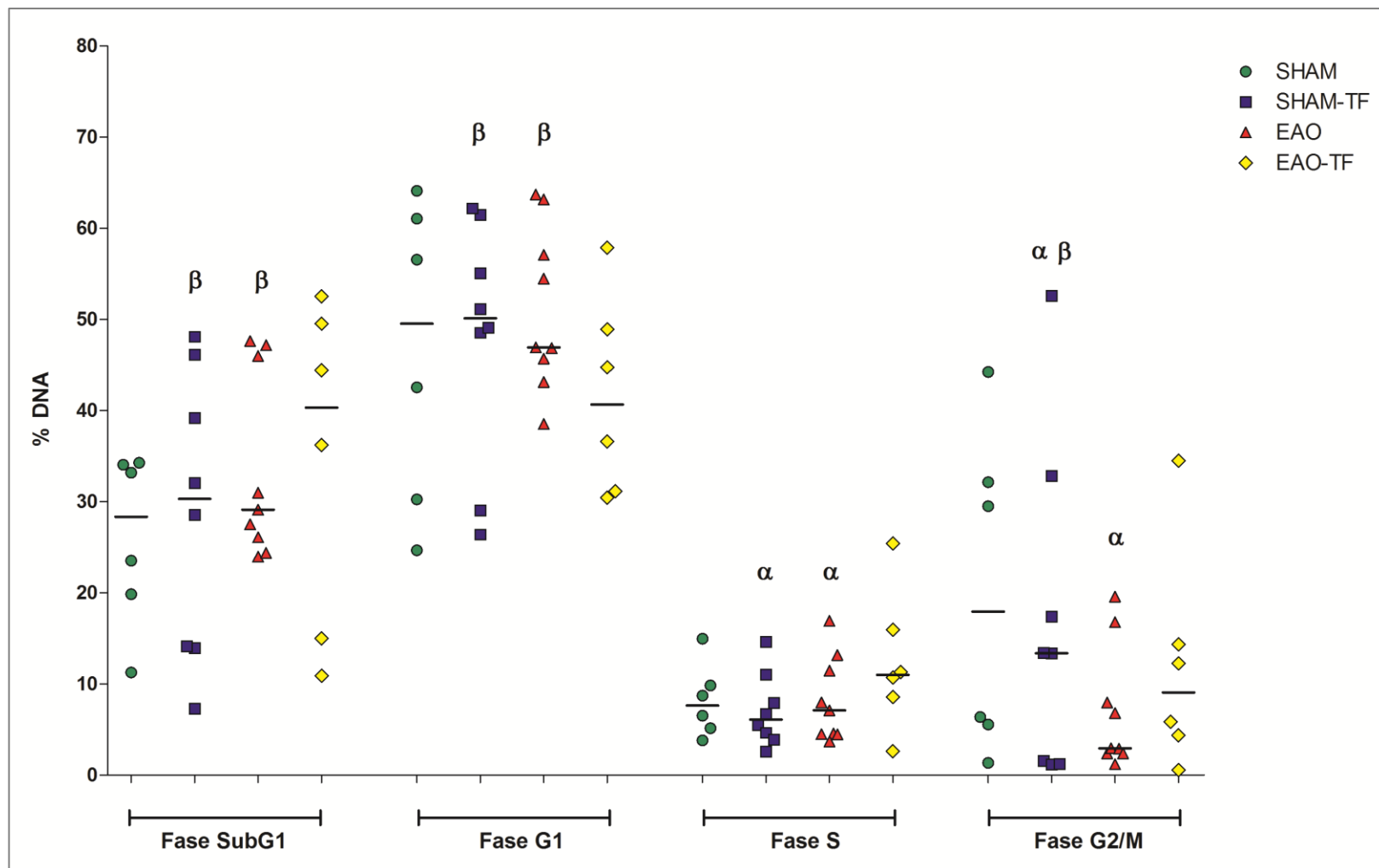


Figura 7. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular. TF: Treinamento físico; Sham (n=8): animais submetidos à cirurgia simulada, Sham TF (n=6): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico, EAo (n=9): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica, EAo TF (n=6): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e submetidos ao treinamento físico; Fase Sub G1: apoptose; Fase G1: crescimento celular; Fase S: síntese de DNA; Fase G2/M: mitose. Letras distintas mostram diferença estatística entre as fases. Dados expressos em mediana. Técnica de análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, $p < 0,05$.

3.6 – Expressão proteica pela técnica de Western Blot

A expressão proteica dos receptores AT1 e *Mas* está apresentada na Figura 8. A expressão do receptor AT1 foi menor no grupo EAo e EAoTF em relação ao Sham e ShamTF (Figura 8A). Não houve diferença estatística entre os quatro grupos na expressão do receptor *Mas* (Figura 8B).

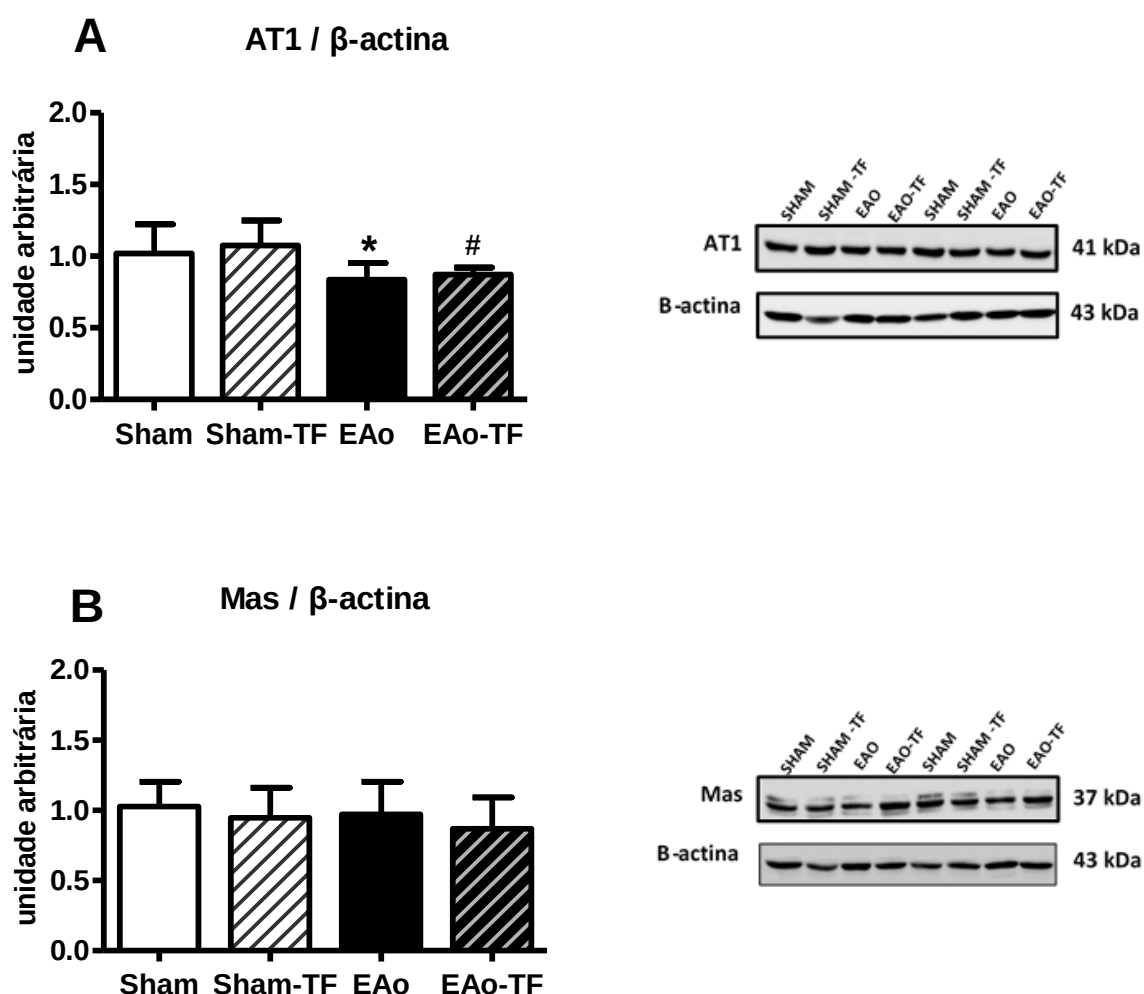


Figura 8. Expressão proteica do receptor AT1 e do receptor *Mas*. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n=7); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico (n=7); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n=7); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao treinamento físico (n=7). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, $p < 0,05$.

Discussão

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar se o treinamento físico atenua a queda do desempenho cardíaco, acarreta proliferação de cardiomiócitos e eleva os níveis de Ang-(1-7) e do receptor *Mas* miocárdicos em ratos com sobrecarga pressórica e disfunção ventricular. Os principais achados obtidos foram, melhora estrutural e funcional sistólica no coração de animais com EAo treinados, diminuição da expressão dos receptores AT1 em animais EAo sedentários e treinados e ausência de proliferação de cardiomiócitos.

4.1 - Análise da capacidade funcional dos animais durante o treinamento físico

A prática do treinamento físico tem sido grande alvo de estudos. Pesquisadores têm investigado as respostas adaptativas benéficas, estruturais e funcionais, proporcionadas pela prática do TF, em vários sistemas orgânicos, entre eles, o cardiovascular (102,103). O maior benefício da prática do TF é se tratar de uma terapia não-farmacológica que previne prejuízos proporcionados ao coração por diversos tipos de agressão, entre elas; estenose aórtica, obesidade, infarto do miocárdio (74,104–106).

Neste trabalho foi utilizado um protocolo de TF de baixa intensidade e adaptado de um modelo empregado anteriormente em ratos com sobrecarga pressórica (74). Mesmo com baixa intensidade, este protocolo foi benéfico pois apresentou melhora na capacidade funcional dos animais ShamTF e EAoTF, conforme demonstrado na Tabela 1. A velocidade de exaustão, o tempo total de permanência na esteira e a distância percorrida foram significativamente maiores

nos animais treinados em relação aos sedentários. Estes achados estão de acordo com estudos que avaliaram a capacidade funcional de animais com EAo (75–77).

4.2 - Dados anatômicos *post mortem* e sinais clínicos de insuficiência cardíaca

A análise macroscópica cardíaca *post mortem* realizada na 28ª semana (Tabela 7), permitiu avaliar com eficiência as alterações estruturais. O resultado dessa avaliação mostrou hipertrofia ventricular esquerda e atrial nos animais com EAo, o que está de acordo com outro trabalho (74). No entanto, o treinamento físico não acarretou mudanças significativas nas variáveis cardíacas nos grupos Sham e EAo. O modelo de EAo expõe o VE à sobrecarga de pressão prolongada levando-o à hipertrofia concêntrica, mecanismo compensatório para preservar a função sistólica. Inicialmente, a remodelação consegue contrabalancear o aumento da tensão sistólica da parede do VE, entretanto, se esse processo persistir, a RC acarreta deterioração da função do coração. O estímulo para a RC pode ocorrer por fatores mecânicos e bioquímicos que agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes na membrana sarcolemal, por sinalizadores bioquímicos citosólicos que acarretam alterações na expressão gênica e desencadeiam maior síntese de proteica miocárdica (7,15).

Após 28 semanas de experimento, a maioria dos animais EAo apresentaram sinais de IC (Tabela 2). O diagnóstico da IC foi baseado na presença de taquipnéia e confirmado por achados *post mortem* como, trombo no átrio esquerdo, derrame pleural, ascite e congestão hepática; os roedores que praticaram o TF evidenciaram menor intensidade e frequência destes achados, demonstrando claramente que a terapêutica influenciou no desenvolvimento de IC nestes animais. Outros autores verificaram redução de sinais de IC em animais EAo treinados(74–76), no entanto,

estes resultados divergem de Gomes et al. (77) que não observaram diferença entre os grupos sedentário e treinado.

A insuficiência ventricular esquerda se manifesta principalmente por congestão pulmonar e, posteriormente, hepática. Neste estudo não foi observado incremento do teor de água pulmonar; entretanto, foi observado aumento do teor de água no ventrículo esquerdo e no fígado, o que não ocorreu nos animais treinados. Não encontramos explicações para os resultados deste trabalho não terem sido semelhantes ao que, comumente, encontra-se na falência cardíaca esquerda em que a congestão pulmonar é frequente.

4.3 - Estrutura e função por ecocardiograma na 18ª semana

Como o objetivo foi avaliar a função e estrutura cardíaca de ratos com disfunção ventricular prévia submetidos ao TF, foi realizada a análise ecocardiográfica *in vivo* destes animais na 18ª semana, com a finalidade de comprovar que a estenose aórtica supralvar foi efetiva em promover a remodelação do coração. Os dados do ecocardiograma (Tabela 5) evidenciaram que a EAO ocasionou hipertrofia ventricular do tipo concêntrica, caracterizada pelo aumento da Esp. Rel. VE; disfunção sistólica, definida pela diminuição da FE e disfunção diastólica, determinada pelo aumento da onda E/A. As variáveis estruturais e as medidas relacionadas à função diastólica, estão de acordo com o resultado de diversos outros autores (74–77). Os dados relacionados com a função sistólica foram semelhantes aos resultados de Gomes et al. (77) e diferiram de outros autores (74–76), em que a função sistólica não mostrou alteração nos animais EAO na 18ª semana. Antes do início do TF em animais com EAO, foram formados dois grupos homogêneos (Tabela 5) para garantir que as possíveis

diferenças nos resultados ao final do experimento na 28ª semana não tenham sido consequência de grupos diferentes.

4.4 - Estrutura e função por ecocardiograma na 28ª semana

Após 10 semanas de treinamento físico, foi observado uma melhora da função sistólica, avaliada pela FE, % ENC.MESO e VEPP, no grupo ShamTF além de não ter ocorrido diminuição na % de encurtamento mesocárdico, como foi visto nos animais sedentários. Os possíveis mecanismos relacionados com a melhora da função sistólica não estão totalmente elucidados; poderiam estar relacionados com a redução da pós-carga pela diminuição da pressão arterial e incremento da contratilidade miocárdica pelo aumento do estiramento do cardiomiócito e uma melhor performance do trânsito de cálcio (107). Em relação ao grupo EAO TF, houve uma melhora estrutural e funcional sistólica do coração, caracterizada pela diminuição da Esp.rel.VE e valor absoluto do AE e um aumento na FE e % de Enc. Meso. Embora o grupo EAO apresentou um aumento significativo do DDVE no intervalo entre 18 e 28 semanas, o TF acarretou o desaparecimento desta diferença; esta mudança de comportamento evidencia o efeito benéfico do TF sobre esta variável. Estas alterações estruturais utilizando o mesmo modelo experimental foram semelhantes com estes autores (74–76), e destoante com este trabalho (77).

Neste estudo o treinamento físico não acarretou alteração na disfunção diastólica e melhorou a função sistólica observada em nossos roedores com estenose aórtica; este resultado é divergente de outros trabalhos que não evidenciaram a melhora da função sistólica e diastólica (77,79). Entretanto os nossos dados são parcialmente semelhantes com outros autores que mostraram melhora da função sistólica e diastólica (74–76). Este resultado parcialmente

divergente pode ser consequente de três fatores: o protocolo de treinamento físico, modelo experimental e resposta biológica dos animais. Em relação ao fator TF, acreditamos que a realização de diferentes métodos para ajustes de carga pode ter interferido no resultado; neste trabalho utilizou-se a velocidade máxima de exaustão e os outros autores empregaram o limiar de lactato. Com relação ao modelo experimental, nesse trabalho a remodelação cardíaca patológica apresentou características que permite afirmar que a lesão do miocárdio foi mais grave nos nossos animais em comparação com os outros estudos (74–76); enquanto os nossos roedores apresentaram disfunção sistólica na 18 semana, o mesmo não ocorreu nos trabalhos que tiveram melhora da função cardíaca pelo treinamento físico. O terceiro fator a ser considerado é a individualidade biológica dos animais estudados, em número restrito, que apesar de pertencer a mesma cepa respondem de forma diferente a um mesmo estímulo.

O aumento da capacidade funcional do grupo EAoTF foi resultante de uma melhora da função cardíaca e da musculatura esquelética; consequente à uma redistribuição mais adequada do fluxo sanguíneo (108,109) e mudança parcial dos tipos de fibras musculares, II para I, acarretando em uma melhor capacidade oxidativa muscular (110,111).

4.5 - Proliferação de cardiomiócitos

A visão tradicional de que a capacidade reparadora do coração é limitada pela incapacidade dos cardiomiócitos sofrerem divisão celular após as primeiras semanas de vida, tem sido desafiada por estudos recentes que sugerem que o coração é capaz de se auto regenerar de forma limitada(112).

A cardiologia molecular avançou de forma robusta nos últimos 90 anos. Em meados dos anos 1920, foram estabelecidos os fundamentos da noção de que o coração é um órgão estático incapaz de regeneração. Uma publicação relevante em 1925 alegou que a mitose não era detectável em cardiomiócitos humanos, e que por isso tinha de ser considerado como células irreversivelmente retiradas do ciclo celular (113). Após 50 anos, com o avanço das abordagens metodológicas de citogenética, alguns investigadores mostraram que havia sim, a possibilidade de regeneração do tecido cardíaco (114). Atualmente a comunidade científica está voltada para três principais estratégias para a regeneração do coração: uso de células tronco (35), inibição de genes que regulam o sistema de controle do ciclo celular (28) e o aperfeiçoamento de mecanismos endógenos (23). A estimulação de vias de sinalização é um exemplo da terceira estratégia citada e que permite os cardiomiócitos adultos reentrarem no ciclo celular e se dividirem (22). A proposta deste trabalho foi utilizar o treinamento físico como fator estimulatório para a proliferação de células miocitárias, pois como demonstrado por Guatimosim et al. (41) a Ang-(1-7) estimula a proliferação de cardiomiócitos via receptor *Mas*. Além disso, a literatura nos mostra que o TF promove uma cardioproteção e aumenta os níveis deste peptídeo em animais com sobrecarga de pressão (42,70). De acordo com nossos resultados, o treinamento físico não estimulou a reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular, contrariando a hipótese aventada. Não encontramos trabalhos na literatura com delineamento experimental semelhante à deste estudo para fins de comparação. Nos artigos que utilizaram a citometria de fluxo em cardiomiócitos, um analisou o ciclo celular pela marcação do núcleo (115) e o outro não avaliou o ciclo celular (116). Vários investigadores que avaliaram o efeito do TF

em pacientes com insuficiência cardíaca, utilizando citometria de fluxo, analisaram outro tipo de população de células, não as cardíacas (117–121).

4.6 - Sistema renina angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um dos principais determinantes da função cardiovascular e renal; neste sentido, a literatura mostra que após uma lesão cardíaca, como a estenose aórtica supravalvar, há uma diminuição do débito cardíaco; contra regulando esta queda, há um aumento na atividade simpática a qual incrementa a frequência cardíaca, o volume sistólico e o débito cardíaco (122). No entanto, com a elevação do sistema simpático, ocorre uma vasoconstrição periférica que acarreta uma diminuição do fluxo renal (123), ocasionando liberação de renina pelas células renais e ativando o SRA. O resultado deste ajuste hemodinâmico e neuro-humoral, promove remodelação cardíaca patológica (122). De acordo com a literatura, níveis de Ang II miocárdicos estão elevados na condição de insuficiência cardíaca (112); a maioria das ações deletérias deste peptídeo tem sido atribuída à interação com o receptor AT1, que é o receptor predominante em tecidos adultos, como o coração. Vários pesquisadores vêm demonstrando que os efeitos deletérios da Ang II podem ser contra regulados pelas ações da Ang-(1-7); os seus efeitos benéficos são intermediados pelo receptor *Mas*. Os estudos relacionados com o receptor *Mas* são recentes, portanto os efeitos do TF neste receptor são menos conhecidos. Os resultados observados no grupo controle não mostraram alteração da expressão deste receptor com o treinamento físico. Dias Peixoto et al. (124) sugeriram que a variação na expressão do receptor *Mas* em ratos saudáveis é dependente do tipo e intensidade do TF. Não foram observadas diferenças na expressão do receptor *Mas* nos grupos EAo e EAoTF. Diferente destes resultados,

Filho et al. (70) mostraram aumento da expressão deste receptor em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) treinados, enquanto que animais normotensos não apresentaram alterações na expressão com o TF. Outro estudo, utilizando modelo de hipertensão renal, também mostrou aumento do receptor *Mas* em animais treinados; ainda na mesma investigação, em outro grupo experimental, foi infundida Ang-(1-7) e submetido ao TF, o que resultou em maior expressão do receptor *Mas* (72). Desse modo, observa-se um sinergismo entre este peptídeo e o treinamento. Estes resultados divergem dos encontrados em nosso estudo, e evidenciam que a expressão do receptor *Mas* no coração é regulada, provavelmente, de acordo com o estímulo que o animal é submetido como, estenose aórtica, hipertensão arterial, infarto do miocárdio e treinamento físico, e estado funcional do aparelho cardiovascular (124).

Nesta investigação, no grupo com EAO foi observada diminuição da expressão proteica dos receptores AT1. Há informação limitada e conflituosa sobre o comportamento do receptor AT1 miocárdico; em situação de insuficiência cardíaca crônica em seres humanos, enquanto alguns autores constataram diminuição (125,126), outros não verificaram alteração da densidade desses receptores (127). Não encontramos investigações que avaliaram o número de receptores AT1 cardíaco em sobrecarga pressórica. Os autores que encontraram redução da densidade, sugerem que o aumento das concentrações de angiotensina II é o responsável por este comportamento (126). Neste experimento, o TF não alterou a expressão dos receptores AT1 no miocárdio hipertrofiado e no grupo Sham. Estudos utilizando infarto do miocárdio em ratos (128) e em ratas ovariectomizadas (129) observaram diminuição dos receptores AT1 após o TF. Diferentes autores

mostraram que animais saudáveis submetidos ao treinamento resistido (130) e natação (71) apresentaram aumento deste receptor, divergindo desta investigação.

4.7 - Limitações do estudo

Embora conste na metodologia a quantificação das angiotensinas sérica e miocárdica, que deveriam ser executadas em tempo hábil por investigadores de outras instituições, não foi possível a realização das dosagens destes peptídeos. Essa intercorrência dificulta a análise da fisiopatologia do sistema renina angiotensina no trabalho em questão.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

O treinamento físico melhorou a capacidade funcional e a função sistólica dos animais, sem repercussões benéficas sobre a função diastólica, proliferação de cardiomiócitos e expressão proteica do receptor *Mas*.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-360.
2. World Health Organization. Global Status Report on noncommunicable diseases 2014. 2014.
3. Favarato A de PM e D. Mortality due to Cardiovascular Diseases in Brazil and in the Metropolitan Region of São Paulo: A 2011 Update. *Arq Bras Cardiol*. 2012;12:755–61.
4. Filho FMA. What is the Current Scenario for Heart Failure in Brazil? *Arq Bras Cardiol*. 2005;85:155–6.
5. Mendes O de C, Campos DHS de, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(1):62–70.
6. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470–9.
7. Cicogna AC, Okoshi MP OK. Natural evolution of the myocardial remodeling: from injury to symptoms. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2000;10(1):8-16.
8. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569–82.
9. McKinsey TA, Olson EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest*. 2005;115(3):538–46.
10. NM. K. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. sixth edit. Philadelphia: Saunders Company; 2001. 941-71 p.
11. Zornoff, L A M; Cicogna, A C; Paiva, S A R; Spadaro J. Remodeling and its impact on progressive ventricular dysfunction. *Rev Soc Cardiol do Estado São Paulo*. 2002;12:371–8.
12. Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supra-aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(2):225–33.
13. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, et al. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension*. 1995;25(2):250–9.
14. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and

- function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91(10):2642–54.
15. Ribeiro, HB; Okoshi, K; Cicogna, AC; Bregagnollo, EA; Rodrigues, MAM; Padovani, CR et al. Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supraaortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81:562–8.
 16. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, et al. Direct effects of colchicine on myocardial function: studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33(1):60–5.
 17. Bregagnollo, EA; Okoshi, K; Bregagnollo, IF; Padovani, CR; Okoshi, MP; Cicogna A. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84(3):225–32.
 18. Bregagnollo EA, Zornoff LAM, Okoshi K, Sugizaki M, Mestrinel MA, Padovani CR, et al. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2007;117(1):109–14.
 19. Wang J, Panáková D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, et al. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*. 2011;138(16):3421–30.
 20. Gonzalez-Rosa JJ, Vazquez-Marrufo M, Vaquero E, Duque P, Borges M, Gomez-Gonzalez CM, et al. Cluster analysis of behavioural and event-related potentials during a contingent negative variation paradigm in remitting-relapsing and benign forms of multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2011;11:64.
 21. Van Amerongen MJ, Diehl F, Novoyatleva T, Patra C, Engel FB. E2F4 is required for cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 2010;86(1):92–102.
 22. Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009;138(2):257–70.
 23. Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang Y-S, Lebeche D, Arab S, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med*. 2007;13(8):962–9.
 24. Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010;464(7288):606–9.
 25. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 2010;464(7288):601–5.
 26. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* (80-). 2011;331(6020):1078–80.
 27. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* (80-). 2011;332(6028):458–61.

28. Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013;497(7448):249–53.
29. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cuñado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature*. 2015;525(7570):479–85.
30. Sturzu AC, Rajarajan K, Passer D, Plonowska K, Riley A, Tan TC, et al. Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss. *Circulation*. 2015;132(2):109–21.
31. Takeuchi T. Regulation of cardiomyocyte proliferation during development and regeneration. *Dev Growth Differ*. 2014;56(5):402–9.
32. Pasumarthi KBS, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*. 2002;90(10):1044–54.
33. Ahuja P, Perriard E, Pedrazzini T, Satoh S, Perriard J-C, Ehler E. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Exp Cell Res*. 2007;313(6):1270–83.
34. Mahmoud AI, Porrello ER, Kimura W, Olson EN, Sadek HA. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. *Nat Protoc*. 2014;9(2):305–11.
35. Moccetti T, Leri A, Anversa P. Controversy in myocardial regeneration. *Regen Med*. 2015;10(8):921–4.
36. Van Berlo JH, Molkentin JD. An emerging consensus on cardiac regeneration. *Nat Med*. 2014;20(12):1386–93.
37. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013;493(7432):433–6.
38. McDevitt TC, Laflamme MA, Murry CE. Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(6):865–73.
39. Lin Z, Zhou P, von Gise A, Gu F, Ma Q, Chen J, et al. Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circ Res*. 2015;116(1):35–45.
40. Xiao F, Kimura W, Sadek HA. A hippo “AKT” regulates cardiomyocyte proliferation. *Circ Res*. 2015;116(1):3–5.
41. Gomes, ER; Lara, AA; Guatimosim, SF ; Santos R. BR10201502089, Privilégio de Inovação. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Brasil; 2015.
42. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000;91(1–3):45–62.
43. Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci*. 1993;52(18):1461–80.
44. Braszko JJ, Własienko J, Koziółkiewicz W, Janecka A, Wiśniewski K. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive

- properties. *Brain Res.* 1991;542(1):49–54.
45. Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J Med Biol Res.* 1994;27(4):1033–47.
 46. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1998;31(1 Pt 2):362–7.
 47. Santos RAS, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2005;3(4):383–91.
 48. Katz A. Signal Transduction: Functional Signaling. In: *Physiology of the heart.* Fifth edit. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 179-221 p.
 49. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8258–63.
 50. Almeida AP, Frábregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian J Med Biol Res.* 2000;33(6):709–13.
 51. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, et al. Blockade of renin-angiotensin system attenuates cardiac remodeling in rats undergoing aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(4):304–8.
 52. Gomes ERM, Santos RAS, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens.* 2012;2012:493129.
 53. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(3):93–101.
 54. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med.* 2008;86(6):663–71.
 55. Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(2):122–8.
 56. Capersen CJ, Powell KE CG. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Heal Rep.* 1985;100:126–31.
 57. Egan B, Zierath JR. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab.* 2013;17(2):162–84.
 58. Warburton DE, Nicol CW BS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;174(6):801–9.
 59. Organization WH. *Global Recommendations on Physical Activity for Health.* 2010. 60 p.
 60. Services USD of H and H. *2008 Physical Activity Guideline for Americans.* 2008. 76 p.
 61. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;128(8):873–934.
 62. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing

- exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25 Suppl 3:1–72.
63. Kiliszek M, Mackiewicz U, Maczewski M, Burzynska B. Molecular evidence that exercise training has beneficial effects on cardiac performance. *Ann Transl Med*. 2016;4(11):228.
 64. Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):292–300.
 65. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128(16):1810–52.
 66. Weeks KL, Gao X, Du X-J, Boey EJH, Matsumoto A, Bernardo BC, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 α is a master regulator of exercise-induced cardioprotection and PI3K gene therapy rescues cardiac dysfunction. *Circ Heart Fail*. 2012;5(4):523–34.
 67. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2008;214(2):316–21.
 68. Vanzelli AS, Medeiros A, Rolim N, Bartholomeu JB, Cunha TF, Bechara LRG, et al. Integrative effect of carvedilol and aerobic exercise training therapies on improving cardiac contractility and remodeling in heart failure mice. *PLoS One*. 2013;8(5):e62452.
 69. Oliveira RSF, Ferreira JCB, Gomes ERM, Paixão NA, Rolim NPL, Medeiros A, et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol*. 2009;587(Pt 15):3899–910.
 70. Filho AG, Ferreira AJ, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008;93(5):589–98.
 71. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011;58(2):182–9.
 72. Shah A, Oh Y-B, Lee SH, Lim JM, Kim SH. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(11):H2372-80.
 73. Guimarães GG, Santos SHS, Oliveira ML, Pimenta-Velloso EP, Motta DF, Martins AS, et al. Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides*. 2012;38(1):54–61.
 74. Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA PC, Carvalho RF, Aguiar

- AF DPM. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(8):3887–905.
75. de Souza PAT, de Souza RWA, Soares LC, Piedade WP, Campos DHS, Carvalho RF, et al. Aerobic training attenuates nicotinic acetylcholine receptor changes in the diaphragm muscle during heart failure. *Histol Histopathol*. 2015;30(7):801–11.
 76. Souza RWA, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One*. 2014;9(10):e110020.
 77. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, et al. Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8695716.
 78. Souza RWA, Fernandez GJ, Cunha JPQ, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(10):H1629-41.
 79. van Deel ED, de Boer M, Kuster DW, Boontje NM, Holemans P, Sipido KR, et al. Exercise training does not improve cardiac function in compensated or decompensated left ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(6):1017–25.
 80. Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, et al. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell*. 2010;143(7):1072–83.
 81. Xiao J, Chen P, Qu Y, Yu P, Yao J, Wang H, et al. Telocytes in exercise-induced cardiac growth. *J Cell Mol Med*. 2016;20(5):973–9.
 82. Cai M-X, Shi X-C, Chen T, Tan Z-N, Lin Q-Q, Du S-J, et al. Exercise training activates neuregulin 1/ErbB signaling and promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model. *Life Sci*. 2016;149:1–9.
 83. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation*. 1994;90(3):1410–22.
 84. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V, Irigoyen M-C, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
 85. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1445–54.
 86. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1534-9.
 87. Ono K, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Sakata Y, Nishikawa N, et al. Echo

- doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002;15(2):109–17.
88. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*. 1996;94(5):1109–17.
 89. de Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(6):H2242-6.
 90. Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos Cruz J, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca^{2+} current. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(5):C1327-39.
 91. Li D, Wu J, Bai Y, Zhao X, Liu L. Isolation and culture of adult mouse cardiomyocytes for cell signaling and in vitro cardiac hypertrophy. *J Vis Exp*. 2014;(87).
 92. Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Morgan, D; Raff, M; Roberts K et al. The cell cycle. In: *Molecular Biology of the Cell*. Sixth Edit. Garland Science; 2015. 963-1020 p.
 93. Regula KM, Rzeszutek MJ, Baetz D, Seneviratne C, Kirshenbaum LA. Therapeutic opportunities for cell cycle re-entry and cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*. 2004;64(3):395–401.
 94. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol*. 2001;3(3):67–70.
 95. Rabinovitch P. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. Williams & Williams; 1993. 117-143 p.
 96. Rolim NPL, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007;29(3):246–52.
 97. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA de O, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(6):426–31.
 98. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
 99. Johnson RA WD. Applied multivariate statistical analysis. 6 edition. Prentice-Hall, editor. New Jersey; 2007. 773 p.
 100. Goodman LA. On Simultaneous Confidence Intervals for Multinomial Proportions. *Technometrics*; 1965. 247-254 p.
 101. Goodman LA. Simultaneous Confidence Intervals for Contrasts Among Multinomial Populations. v. 35. *Annals of Mathematical Statistics*; 1964. 716-725 p.
 102. Farid R, Azad FJ, Atri AE, Rahimi MB, Khaledan A, Talaei-Khoei M, et al. Effect of aerobic exercise training on pulmonary function and tolerance of activity in asthmatic patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2005;4(3):133–8.

103. Moinuddin I, Leehey DJ. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008;15(1):83–96.
104. Barretti DLM, Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MCC OE. Aerobic exercise training revert pathologic cardiac hypertrophy and improves the diastolic function in obese Zucker rats. *Rev Bras Educ Fís Esporte*. 2011;4(25):593–605.
105. Paulino EC, Ferreira JCB, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias W, Lima FB, et al. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca²⁺-handling protein profile in obese rats. *Hypertension*. 2010;56(4):629–35.
106. Rodrigues B, Santana AA, Santamarina AB, Oyama LM, Caperuto ÉC, de Souza CT, et al. Role of training and detraining on inflammatory and metabolic profile in infarcted rats: influences of cardiovascular autonomic nervous system. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:207131.
107. Naylor M, Vasan RS. Preventing heart failure: the role of physical activity. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30(5):543–50.
108. Selig SE, Carey MF, Menzies DG, Patterson J, Geerling RH, Williams AD, et al. Moderate-intensity resistance exercise training in patients with chronic heart failure improves strength, endurance, heart rate variability, and forearm blood flow. *J Card Fail*. 2004;10(1):21–30.
109. Magnusson G, Gordon A, Kaijser L, Sylvén C, Isberg B, Karpakka J, et al. High intensity knee extensor training, in patients with chronic heart failure. Major skeletal muscle improvement. *Eur Heart J*. 1996;17(7):1048–55.
110. Williams AD, Carey MF, Selig S, Hayes A, Krum H, Patterson J, et al. Circuit resistance training in chronic heart failure improves skeletal muscle mitochondrial ATP production rate--a randomized controlled trial. *J Card Fail*. 2007;13(2):79–85.
111. Pu CT, Johnson MT, Forman DE, Hausdorff JM, Roubenoff R, Foldvari M, et al. Randomized trial of progressive resistance training to counteract the myopathy of chronic heart failure. *J Appl Physiol*. 2001;90(6):2341–50.
112. Mann DL MFG. Cellular Basis for Myocardial Regeneration and Repair. In: *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 3rd Edition. Elsevier; 2016. 42-60 p.
113. Karsner HT, Saphir O, Todd TW. The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy. *Am J Pathol*. 1925;1(4):351–372.1.
114. Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res*. 1974;35(2):suppl II:17-26.
115. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*. 2010 Jun 1;86(3):365–73.
116. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;92:163–73.

117. Van Craenenbroeck EM, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Frederix G, Hoymans VY, et al. Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2010;31(15):1924–34.
118. Seljeflot I, Nilsson BB, Westheim AS, Bratseth V, Arnesen H. The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure. No effects of exercise training. *J Card Fail*. 2011;17(2):135–42.
119. Van Craenenbroeck EM, Bruyndonckx L, Van Berckelaer C, Hoymans VY, Vrints CJ, Conraads VM. The effect of acute exercise on endothelial progenitor cells is attenuated in chronic heart failure. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(9):2375–9.
120. Gatta L, Armani A, Iellamo F, Consoli C, Molinari F, Caminiti G, et al. Effects of a short-term exercise training on serum factors involved in ventricular remodelling in chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2012;155(3):409–13.
121. Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Paelinck BP, et al. Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(5):665–76.
122. Kemp CD, Conte J V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(5):365–71.
123. Middlekauff HR, Nguyen AH, Negrao CE, Nitzsche EU, Hoh CK, Natterson BA, et al. Impact of Acute Mental Stress on Sympathetic Nerve Activity and Regional Blood Flow in Advanced Heart Failure : Implications for ‘Triggering’ Adverse Cardiac Events. *Circulation*. 1997;96(6):1835–42.
124. Dias-Peixoto MF, Ferreira AJ, Almeida PWM, Braga VBA, Coutinho DCO, Melo DS, et al. The cardiac expression of Mas receptor is responsive to different physiological and pathological stimuli. *Peptides*. 2012;35(2):196–201.
125. Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation*. 1995;91(5):1461–71.
126. Asano K, Dutcher DL, Port JD, Minobe WA, Tremmel KD, Roden RL, et al. Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation*. 1997;95(5):1193–200.
127. Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II receptors in normal and failing human hearts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(1):54–66.
128. Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(1):114–22.
129. Almeida SA de, Claudio ERG, Mengal V, Mengal VF, Oliveira SG de, Merlo E, et al. Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9(12):e115970.
130. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(2):R381-7.

