



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

Sérgio Luiz Borges de Souza

**Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca
e o sistema β -adrenérgico miocárdico 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 Dr. Antonio Carlos Cicogna

**Botucatu
2017**

Sérgio Luiz Borges de Souza

Influência do treinamento físico sobre a função
cardíaca e o sistema β -adrenérgico miocárdico 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 Dr. Antonio Carlos Cicogna.

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sousa, Sérgio Luis Borges de.

Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca e o sistema β -adrenérgico miocárdico em ratos com disfunção ventricular / Sérgio Luis Borges de Sousa. - Botucatu, 2017

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

1. Estenose da válvula aórtica. 2. Testes funcionais do coração. 3. Remodelação ventricular. 4. Receptores adrenérgicos. 5. Exercícios físicos. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estenose aórtica supravalvar; Função cardíaca; Ratos; Sistema β -adrenérgico; Treinamento físico.

Dedicatória

Algumas pessoas nos acompanham durante toda a vida, vigiando, segurando nossas mãos e nos equilibrando, enquanto aprendemos como se deve viver. Outras, porém, se vão cedo demais; contrariam a ordem natural da vida. De início nos parece cruel a perda, e com o tempo percebemos que foi realmente cruel. O desamparo que se experimenta, a ausência sempre presente, a saudade corrosiva... ao tempo que nos angustia, também impõem o entendimento de que perdemos um pilar, mas ganhamos um anjo. Dos exemplos que ficaram, nenhum é maior e mais sublime do que sua bondade. Foi incrivelmente bom e indiscutivelmente humano.

Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam). De algum lugar certamente vivenciou e compartilhou deste sonho comigo, e hoje se alegra como eu por tê-lo concretizado.

Agradecimentos

A Deus, pela existência e por me permitir caminhar.

Ao meu orientador, Professor Antonio Carlos Cicogna. Seus ensinamentos e dedicação incessantes me fortaleceram como aprendiz e ser humano. Obrigado pela oportunidade!

À minha mãe, irmã e demais familiares, sempre ao meu lado, pelo amor incondicional. Vocês são a minha motivação. Obrigado por tudo!

Ao professor Mário Sugizaki, primeiro incentivador da minha caminhada científica.

Ao professor André Nascimento, pelo imprescindível apoio no início dessa jornada.

À Profa. Silmeia Garcia e ao Prof. Carlos Roberto Padovani, pela colaboração e prontidão com que sempre atenderam as necessidades deste estudo.

Aos professores e amigos Camila Correa e André Mueller, pela disposição e valiosas contribuições.

Ao amigo Gustavo Mota, "Mineiro". Sua amizade e parceria desde o início fizeram parte do meu crescimento.

Ao amigo Dijon, pelo conhecimento compartilhado e colaboração desde o início.

Aos amigos de laboratório, Damiana Pierini, Daniela Vileigas, Loreta Casquel, Paula Grippa e Vitor Loureiro, pela amizade e colaboração constante. Vocês tornaram possível e mais prazeroso este trabalho. Minha particular gratidão a todos!

Aos frateros, Aline Tomal, Aline Castilho, Meires, Rosa e Waldir. O carinho e compreensão de vocês foi fundamental durante essa jornada.

Aos servidores do Departamento de Clínica Médica, da Secretaria de Pós-graduação e da Comissão de Ética em Experimentação animal da FMB, pela eficiência e atenção prestada.

Aos servidores da UNIPEX, pela colaboração e solicitude de sempre.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, possibilitando a realização deste trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram e tornaram possível o desenvolvimento deste estudo. Minha eterna gratidão!

“Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco. Necessitamos mais de humanidade que de máquinas, mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá”.

Charlie Chaplin

RESUMO

Introdução: A remodelação cardíaca compreende mudanças no fenótipo cardíaco, determinadas por alterações na expressão gênica em resposta a estresse biomecânico de etiologia fisiológica ou patológica. A RC, eventualmente, pode evoluir para um quadro de disfunção e posteriormente insuficiência cardíaca grave (ICG); alterações no sistema β -adrenérgico podem estar envolvidas nesse processo. Medidas não farmacológicas, como o treinamento físico (TF) são empregadas no manejo das cardiopatias, e entre os efeitos benéficos dessa terapia está a modulação do sistema β -adrenérgico. Apesar das evidências de que o TF impacta positivamente a sinalização β -adrenérgica e a função cardíaca, não encontramos na literatura trabalhos que avaliaram a associação entre treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, sistema β -adrenérgico e função cardíaca em ratos com sobrecarga pressórica e disfunção ventricular. **Objetivo:** Testar a hipótese de que o TF atenua as alterações β -adrenérgicas miocárdicas e a deterioração do desempenho cardíaco em ratos com sobrecarga pressórica e disfunção ventricular previamente instalada.

Métodos: Ratos *Wistar* machos (70-90 g), submetidos à cirurgia de estenose aórtica supravalvar (EAo), foram inicialmente divididos em dois grupos: Controle operado (Sham) e estenose aórtica (EAo). Após 18 semanas do procedimento cirúrgico, foi realizada análise da função cardíaca para redistribuição dos grupos: não expostos ao treinamento físico (Sham, n= 18 e EAo, n= 18) e treinados (ShamTF, n= 23 e EAoTF, n= 26) durante 10 semanas. O protocolo de TF foi complementado com teste de esforço para ajuste de carga e avaliação da capacidade funcional, aplicado antes do início do programa de treinamento, após a 3ª e 7ª semana e ao fim do protocolo. A remodelação cardíaca foi caracterizada *in vivo* pela análise estrutural e funcional por ecocardiograma na 18ª e 28ª semana, *in vitro*, pelo músculo papilar isolado e pelo

estudo macroscópico *post mortem*. O sistema β -adrenérgico foi avaliado pela expressão proteica dos β -adrenoceptores β -1 e β -2, adenilato ciclase e proteína quinase A, e pela manobra com agonista β -adrenérgico, isoproterenol, no músculo papilar isolado. **Resultados:** Na 18ª semana, antes de iniciar o TF, os animais EAo apresentavam hipertrofia ventricular esquerda concêntrica, disfunção diastólica e sistólica e prejuízo da capacidade funcional. Após o período de TF, os grupos ShamTF e EAoTF apresentaram aumento da capacidade funcional, visualizado pela tolerância e desempenho no exercício, e redução na ocorrência e intensidade dos sinais de insuficiência cardíaca. Na 28ª semana, o grupo EAo manteve a disfunção diastólica e sistólica, enquanto que o grupo EAoTF mostrou atenuação do prejuízo diastólico em ambas as análises, *in vivo* e *in vitro*. Não houve diferença entre os grupos na expressão proteica dos componentes do sistema β -adrenérgico; entretanto, os grupos EAo e EAoTF mostraram capacidade reduzida de resposta à estimulação por isoproterenol *in vitro*. **Conclusão:** Em conclusão, a exposição ao treinamento físico atenuou a disfunção diastólica e não alterou os os níveis proteicos dos componentes do sistema β -adrenérgico miocárdico, que não se modificaram com o processo de remodelação cardíaca.

Palavras-chave: estenose aórtica supravalvar, treinamento físico, função cardíaca, sistema β -adrenérgico, ratos.

ABSTRACT

Introduction: Cardiac remodeling comprises changes in the cardiac phenotype, determined by changes in genic expression in response to biomechanical stress of physiological or pathological etiology. CR can eventually evolve into a condition of dysfunction and subsequently severe heart failure (GCI); Alterations in the β -adrenergic system may be involved in this process. Non-pharmacological measures such as physical training (PT) are used in the management of heart diseases, and among the beneficial effects of this therapy is the β -adrenergic system modulation. Despite the evidence that TF has a positive effect on β -adrenergic signaling and cardiac function, we did not find in the literature studies that evaluate the association between low-intensity aerobic physical exercise, β -adrenergic system and cardiac function in rats with pressure overload and ventricular dysfunction. **Objective:** To test the hypothesis that PT attenuates myocardial β -adrenergic alterations and deterioration of cardiac performance in rats with pressure overload and previously installed ventricular dysfunction. **METHODS:** Male Wistar rats (70-90 g) submitted to supralvalvular aortic stenosis surgery (AS), were initially divided into two groups: Operated control (Sham) and aortic stenosis (AS). After 18 weeks of the surgical procedure, cardiac function analysis was performed for redistribution of the groups: non-exposed to physical training (Sham, n = 18 and AS, n = 18) and trained (TFSham, n = 23 and PTAS, n = 26) for 10 weeks. The PT protocol was complemented with an exercise test for load adjustment and functional capacity assessment, applied before the start of the training program, after the 3rd and 7th week and at the end of the protocol. Cardiac remodeling was characterized in vivo by structural and functional analysis by echocardiogram at the 18th and 28th week, in vitro by the isolated papillary muscle and by the macroscopic post mortem study. The β -adrenergic system was

evaluated by protein expression of β -1 and β -2 adrenoceptors, adenylate cyclase and protein kinase A, and by adding the isoproterenol β -adrenergic agonist in the isolated papillary muscle. **Results:** At the 18th week, before starting PT, the AS animals presented concentric left ventricular hypertrophy, diastolic and systolic dysfunction and impairment of functional capacity. After the PT period, the PTSham and PTAS groups showed increased functional capacity, visualized by tolerance and exercise performance, and reduction in the occurrence and intensity of the signs of heart failure. At week 28, the AS group maintained diastolic and systolic dysfunction, whereas the PTAS group showed attenuation of diastolic damage in both analyzes, both in vivo and in vitro. There was no difference between groups in the protein expression of β -adrenergic system components; However, the AS and PTAS groups showed reduced ability to respond to isoproterenol stimulation in vitro. **Conclusion:** In conclusion, exposure to physical training attenuated diastolic dysfunction and did not alter the protein levels of components of the myocardial β -adrenergic system, which did not change with the cardiac remodeling process.

Key words: supralvalvular aortic stenosis, physical training, cardiac function, β -adrenergic system, rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de esforço máximo progressivo.....	45
Tabela 2. Sinais de insuficiência cardíaca dos grupos EAo e EAoTF.....	47
Tabela 3. Relação peso úmido/seco dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.	49
Tabela 4. Perfil morfológico cardíaco <i>post mortem</i>	50
Tabela 5. Dados ecocardiográficos da 18ª semana.....	51
Tabela 6. Dados ecocardiográficos da 18ª e 28ª semana.....	53
Tabela 7. Contração isométrica basal.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do β -adrenoceptor adrenérgico.....	20
Figura 2. Delineamento experimental.....	26
Figura 3. Representação esquemática da curva de contração isométrica.....	36
Figura 4. Teste de esforço máximo progressivo.....	46
Figura 5. Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca.....	48
Figura 6. Efeitos do aumento da frequência cardíaca sobre a função miocárdica	56
Figura 7. Efeitos da adição de isoproterenol sobre a função miocárdica.....	58
Figura 8. Expressão proteica dos receptores β -1 e β -2, AC e PKA.....	60

LISTA DE QUADROS

Figura 1. Protocolo de treinamento físico.....	28
---	----

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 - Hipótese.....	23
1.2 Objetivo.....	23
1.2.1- Objetivo geral.....	23
1.2.1 Objetivos específicos	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 - Animais	25
2.2 - Delineamento experimental	25
2.3 - Indução de estenose aórtica supravalvar.....	26
2.4 - Protocolo de treinamento físico.....	27
2.5 - Teste de esforço máximo progressivo	28
2.6 - Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca.....	29
2.7 - Determinação do teor de água cardíaco, pulmonar e hepático.....	29
2.8 - Caracterização da remodelação cardíaca.....	30
2.8.1 - Análise estrutural e funcional do coração in vivo	30
2.8.2 - Análise da função miocárdica in vitro	31
2.8.3 - Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	38
2.8.4 - Análise da expressão proteica do sistema β -adrenérgico	38
2.9 - Análise estatística	41
3. RESULTADOS.....	44
3.1- Teste de esforço	45
3.2 - Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca.....	46
3.3 - Relação peso úmido/seco nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	48
3.3 - Perfil morfológico cardíaco <i>post mortem</i>	49
3.4 - Ecocardiograma.....	51
3.3 - Músculo papilar isolado.....	54
3.6 - Expressão proteica por Western Blot.....	59
4. DISCUSSÃO	62

4.1- Estrutura e função cardíaca na 18ª semana	62
4.2 - Treinamento físico e capacidade funcional	63
4.3 - Dados anatômicos <i>post mortem</i> e sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca	64
4.4 - Treinamento físico e função cardíaca	65
4.5 - Treinamento físico e sistema β -adrenérgico	67
4.6 - Treinamento físico, sistema β -adrenérgico e função cardíaca.....	68
4.7 - Limitações do estudo	68
5. CONCLUSÃO	71
4. REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Remodelação cardíaca (RC) foi o conceito proposto, inicialmente, para descrever alterações na anatomia ventricular esquerda após isquemia miocárdica (1); atualmente, é considerada um processo que compreende mudanças estrutural, elétrica, metabólica e funcional do coração, determinadas por alterações na expressão gênica em resposta a estresse de etiologia fisiológica ou patológica (2,3).

A RC fisiológica exibe um caráter reversível, sendo uma adequação do sistema cardiovascular à demanda corporal aumentada (4) por estímulos como, o exercício (5,6). Por outro lado, aumento do trabalho cardíaco em condições adversas como sobrecarga de volume ou de pressão podem levar ao estado patológico da RC (2,7). O caráter da remodelação, fisiológico ou patológico, é determinado por três aspectos: 1. integridade e equilíbrio entre os diferentes constituintes do tecido miocárdico; 2. relação entre a espessura da parede e a geometria da cavidade e 3. quadro bioenergético e funcional (8). Essa mudança no fenótipo cardíaco, consequente às alterações moleculares, tem como finalidade normalizar o estresse parietal e, consequentemente, a deformação miocárdica (9). Entretanto, a manutenção de uma agressão com potencial patológico, acarreta deterioração da função, progressão para insuficiência cardíaca (IC) e maior risco de morte súbita (9–11).

Em estudos experimentais, são utilizados diferentes modelos de agressão como, por exemplo, a sobrecarga pressórica, cujos principais representantes são rato espontaneamente hipertenso (SHR) (12), e estenose das artérias renal (13), abdominal (14–16) e torácica (3,17–21). O modelo de estenose aórtica supralvar (EAO) é empregado em função do desenvolvimento gradual da RC, proporcional ao crescimento do animal (3,17–20,22,23).

Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo mostram hipertrofia acentuada, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica ventricular esquerda na 6ª semana pós indução de EAO em ratos jovens; nas semanas subsequentes, há progressão do prejuízo diastólico e tendência à deterioração do desempenho sistólico, que se estabelecem com maior gravidade na fase de insuficiência cardíaca, que ocorre a partir da 18ª semana (20,21,24–26). Estes estudos têm a finalidade de elucidar os aspectos moleculares, elétricos, morfológicos e metabólicos envolvidos no desenvolvimento da disfunção cardíaca e na transição para falência; adicionalmente, contribuem para a investigação de tratamentos capazes de atenuar os prejuízos para o coração (3,19,20,22,24).

Os mecanismos responsáveis pela deterioração da função cardíaca permanecem incertos. No modelo experimental de sobrecarga de pressão, diversos fatores podem estar envolvidos: alteração na geometria das câmaras, na quantidade e qualidade das proteínas, contráteis e não contráteis, e da matriz extracelular, no aporte de oxigênio e de substrato energético, anormalidades no trânsito de cálcio intracelular e no suporte neuro-hormonal (2,7,9,13,26,27).

O sistema β -adrenérgico desempenha importante papel na regulação neuroendócrina da função cardíaca, em condição basal ou sob estresse fisiológico ou patológico (28). Esse sistema é constituído, basicamente, pelos receptores com sete domínios transmembrana, adrenoceptores beta-adrenérgicos (β -AR), pela proteína heterotrimérica de ligação à guanosina difosfato e trifosfato (proteína G), adenilato ciclase (AC), adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e proteína quinase A (PKA) (28,29). No coração, existem três subtipos distintos dos β -AR: β_1 , β_2 e β_3 . Os subtipos predominantes são o β_1 -AR (70-80%), que é o principal responsável pela regulação do desempenho cardíaco, seguido pelo β_2 -AR (20-30%), com participação limitada

nesse processo (30,31). Quando estimulados pelos agonistas, adrenalina ou noradrenalina, os β_1 -ARs e β_2 -ARs desencadeiam aumento na frequência cardíaca, contratilidade e velocidade de relaxamento miocárdico, devido aos seus efeitos cronotrópico, inotrópico e lusitrópico positivos (30,31). Os β_3 -ARs (2-3%), atuam na mediação da atividade inotrópica negativa e encontra-se, predominantemente, inativo em condições fisiológicas basais (32).

A ativação do β -AR por um agonista promove o acoplamento do receptor com a proteína G, que ativa a AC para a formação de AMPc a partir de adenosina trifosfato (ATP). A proteína G, composta pelo trímero $\alpha\beta\gamma$, possui interação com os nucleotídeos de guanosina na subunidade α , da qual se desliga a molécula de GDP para a ligação do GTP. Após essa conversão, o complexo α -GTP ativa a AC e forma AMPc. Podendo a proteína G existir nas formas estimulatória (G_s) e inibitória (G_i), a formação de AMPc fica condicionada ao recrutamento da isoforma estimulatória, cuja ação é inibida pela G_i , impedindo a ativação da AC (33,34). O acúmulo de AMPc é responsável pela maior ativação da PKA. Essa proteína fosforila diversas outras proteínas atuantes na função cardíaca, como os canais lentos de Ca^{+2} , fosfolambam, troponina I e os receptores de rianodina, influenciando o ciclo de cálcio intracelular e, portanto, o desempenho do coração (34).

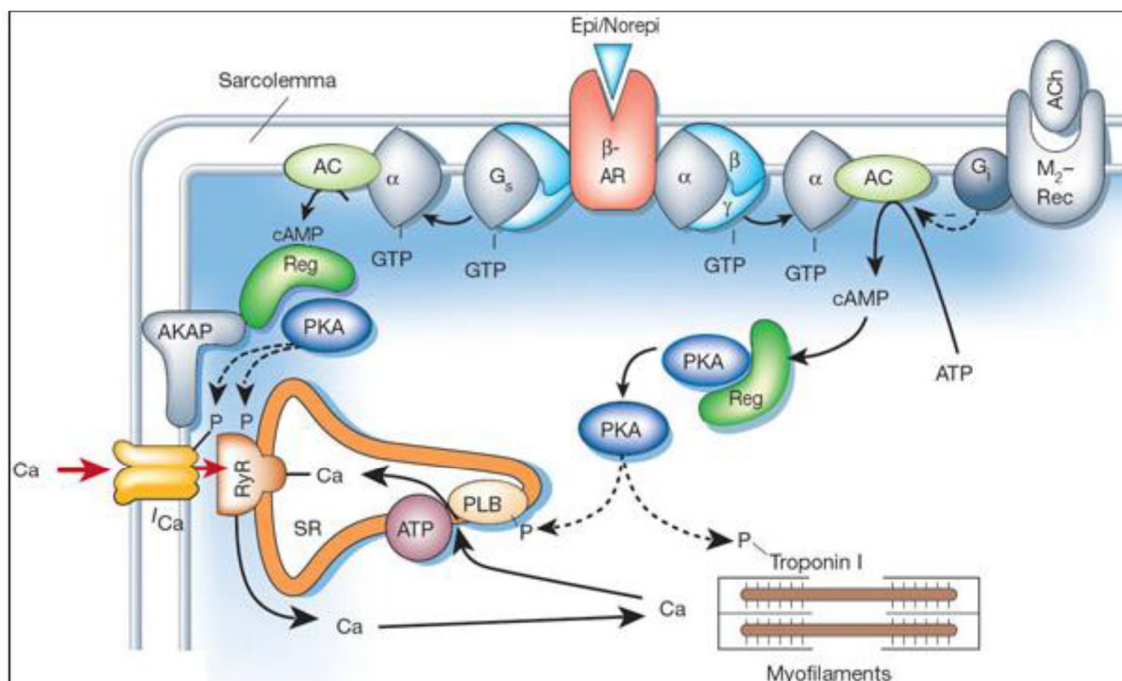


Figura 1. Ativação do receptor β -adrenérgico e fosforilação de alvos relevantes para o acoplamento excitação-contracção. AC – adenilato ciclase; ACh – acetilcolina; AKAP – proteína de ancoragem quinase A; β -AR – receptor beta-adrenérgico; M2-Rec – receptor muscarínico-M2; PLB – Fosfolambam; Reg – subunidade regulatória da PKA; SR – retículo sarcoplasmático. Bers (34).

Alterações intrínsecas da função miocárdica acarretam maior liberação de noradrenalina, resultando em maior ativação da sinalização β -adrenérgica e, portanto, aumento da frequência cardíaca e contratilidade (35). Entretanto, exposição a elevados níveis de catecolaminas gera repercussões adversas no miocárdio, na biologia do cardiomiócito e na transdução de sinal dos β -ARs, acarretando a progressão da disfunção miocárdica e necessidade de intervenção terapêutica (36,37).

Diferentes alterações na nos receptores β -adrenérgicos foram documentadas na doença cardiovascular (36); entretanto, em sobrecarga pressórica, a abordagem do comportamento do sistema β -adrenérgica é limitada. Estudos em seres humanos com estenose aórtica e função ventricular preservada mostram

redução na densidade dos β -ARs (38,39). Resultado semelhante é reportado por estudos em cães com a mesma patologia (40) e SHR(41,42), ambos sem falência cardíaca. Adicionalmente, foi constatada redução na densidade dos receptores em cães com estenose aórtica e insuficiência ventricular (43). Em relação à Adenilato ciclase, foi documentado uma regulação inversa da expressão proteica, aumento da isoforma 5 e redução da isoforma 6, em camundongos com sobrecarga pressórica (44); enquanto Tse *et al.* (43) verificaram redução na atividade dessa proteína em cães com disfunção ventricular. Estudos em corações humanos insuficientes reportaram que a PKA sofre influência do processo de remodelação cardíaca nos níveis de expressão e atividade (45).

Adicionalmente às medidas farmacológicas habitualmente utilizadas, o treinamento físico (TF) surge como uma importante abordagem para diversas doenças crônicas (46), e atualmente tem sido amplamente empregado com o intuito de restaurar a performance ventricular (24,47).

O treinamento físico compreende uma rotina programada e sistematizada de atividades, resistida (ex. musculação) ou aeróbia (ex. corrida), com o objetivo de aprimorar o condicionamento físico e mental (46,48). No mundo contemporâneo, o TF desempenha papel singular na otimização das atividades cotidianas (49), prevenção de patologias e atenuação dos efeitos da senilidade (50) e de doenças vigentes (24,25,51).

A literatura tem evidenciado uma relação inversa entre o TF e o risco cardiovascular, e propõe que esse hábito pode ser adotado não apenas como prevenção primária, mas também secundária, atuando como tratamento de cardiopatias (46,52,53). O TF promove melhoria da função do coração, atenuando os sinais e sintomas clínicos e elevando a sobrevida de cardiopatas (46,47,54,55). É

estabelecido que o TF acarreta remodelação fisiológica, resultando em melhoria da performance do coração (56); uma adaptação importante é a redução da frequência cardíaca, em repouso ou cargas submáximas, permitindo que para um mesmo volume de trabalho seja dispendido um menor gasto energético (57). Esse fenômeno é resultante da adaptação do sistema nervoso autonômico, caracterizada por aumento da atividade parassimpática e inibição da excitação simpática, conseqüente à diminuição dos níveis de catecolaminas circulantes (58,59). Além disso, foi demonstrado que o TF pode não alterar (60), elevar ou diminuir a densidade e atividade dos β -ARs (61) e de outras proteínas como a G_s (62), apontando um potencial efeito do TF na adequação do sistema β -adrenérgico à demanda funcional.

Embora permaneçam controversos os mecanismos pelos quais o TF atua na restauração da função ventricular (36), essa ferramenta não farmacológica tem demonstrado importante papel na atenuação da disfunção cardíaca por sobrecarga pressórica (24–26). Além disso, também contribui no reestabelecimento da responsividade do miocárdio à ativação β -adrenérgica, culminando em melhora das reservas inotrópica e lusitrópica em modelos de sobrecarga de volume (63) e de pressão (58).

Considerando que o TF acarreta alterações benéficas, podemos aventar que a melhoria da função cardíaca em resposta ao TF é mediada pela contraposição aos estímulos patológicos, como alteração no sistema neuro-hormonal, que desencadeiam os mecanismos responsáveis pela deterioração da função cardíaca. Apesar das evidências de que TF atenua a hiperestimulação catecolaminérgica em corações disfuncionantes e modula os componentes do sistema β -adrenérgico (36), não encontramos na literatura trabalhos que avaliaram os efeitos do TF sobre a

sinalização β -adrenérgica miocárdica e a função cardíaca em modelo de sobrecarga pressórica com disfunção ventricular previamente instalada.

O presente estudo se propõe a contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na evolução da disfunção cardíaca e fornecer suporte, em nível experimental, para a segurança e eficácia do treinamento físico como uma estratégia acessível e de amplo espectro terapêutico para as cardiopatias.

1.1 - Hipótese

A hipótese desse estudo é que o treinamento físico atenua as alterações β -adrenérgicas miocárdicas e a deterioração do desempenho cardíaco em ratos com sobrecarga pressórica e disfunção ventricular previamente instalada.

1.2 Objetivo

1.2.1- Objetivo geral

Avaliar os componentes do sistema β -adrenérgico e a função cardíaca em ratos com remodelação e disfunção ventricular por sobrecarga pressórica submetidos a treinamento físico.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a estrutura e função cardíaca *in vivo* pelo ecocardiograma;
- Avaliar a função miocárdica e a responsividade do sistema β -adrenérgico miocárdico *in vitro* pelo músculo papilar isolado;
- Avaliar a expressão proteica do sistema β -adrenérgica por Western Blot.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas coletivas (quatro ratos por caixa) de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada; temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. A oferta de água e ração foi *ad libitum* e, o peso corporal 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 submetidos à aprovação pela “Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP”, sob o n. 1192/2016.

2.2 - Delineamento experimental

Inicialmente, foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supralvar (EAo). Após 18 semanas do procedimento cirúrgico, período em que os animais com EAo apresentam disfunção do VE (24), 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); estenose aórtica supralvar (EAo); controle operado submetido ao exercício físico (ShamTF) e estenose aórtica

supravalvar submetido ao exercício físico (EAoTF). O delineamento experimental, deste projeto, foi proposto em virtude de trabalhos anteriores terem evidenciado influência benéfica do exercício físico em ratos com EAo apresentando disfunção ventricular (24–26).

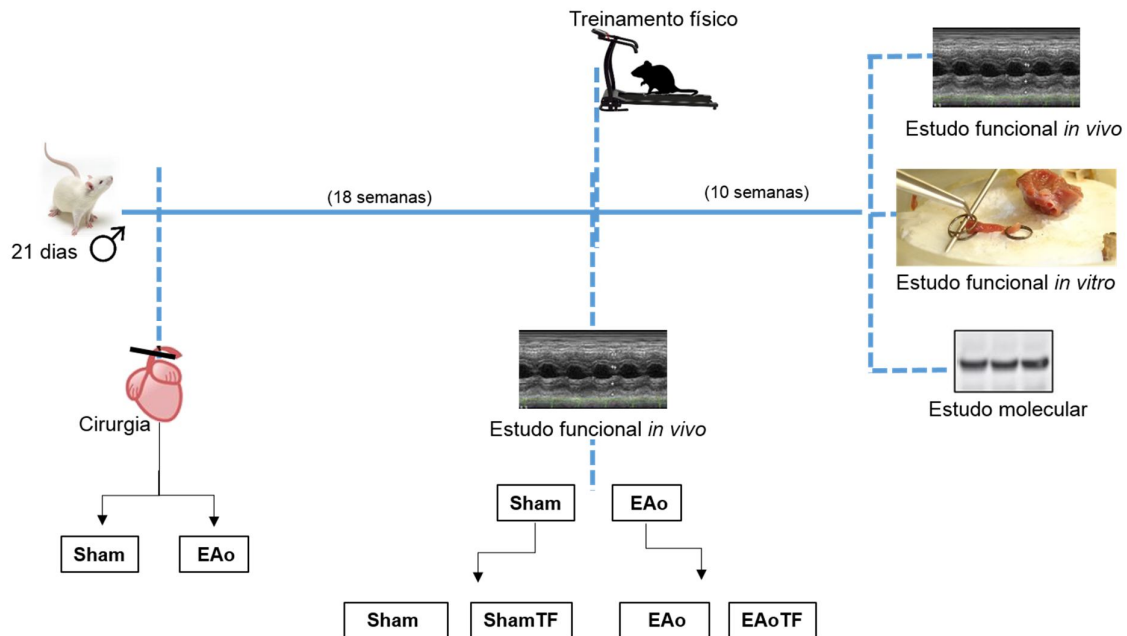


Figura 2. Delineamento experimental

2.3 - Indução de estenose aórtica supravalvar

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (3). Os animais com três a quatro semanas de vida, pesando de 70 a 90 gramas, após anestesia com cloridrato de ketamina (60 mg/kg/ip Dopalen®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip Anasedan®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal, foram submetidos à toracotomia mediana, dissecação da aorta ascendente e colocação de um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi

fechada utilizando-se fio *mononylon* 5.0 para suturar as estruturas da parede. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente por pressão positiva com oxigênio a 100%. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, exceto pela colocação do clipe. Concluído o ato cirúrgico, os ratos receberam solução isotônica (2 ml/kg, Soro fisiológico®, ADV Farma, Nova Odessa, São Paulo, Brasil) aquecido, por via subcutânea e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Após os efeitos do anestésico os animais foram medicados com Metamizol Sódico® (30 mg/kg), Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) via oral. O pós-operatório consistiu na limpeza das gaiolas, administração de antibiótico e analgésico, e antissepsia da ferida cirúrgica com Digliconato de Clorexidina 1% (10mg/ml, Riohex 1%®, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) diariamente, durante 5 dias.

2.4 - Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico foi adaptado de Pacagnelli e cols. (2014)(24) ; 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 (24). 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 (TE) (Item 2.5), realizado antes do início do treinamento e após 3 e 7 semanas desta intervenção. 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 foi acrescido, progressivamente, de 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).

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.

2.5 - Teste de esforço máximo 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 e cols. (2007) (64). O teste consistiu em corrida com velocidade inicial de 6m/min e incremento de 3m/min a cada três minutos, até exaustão. O critério de exaustão adotado para avaliação nesse ergômetro foi a não manutenção da corrida na velocidade proposta por 5 segundos. As variáveis analisadas foram velocidade de exaustão (VEx, m/min), Tempo total (Tt, min) e Distância percorrida (DP, m).

2.6 - Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca

Os animais submetidos à indução de estenose aórtica podem apresentar sinais de insuficiência cardíaca. A avaliação desses sinais ocorreu por inspeção dos animais pelo mesmo investigador. Os sinais avaliados foram: taquipneia, *in vivo*, ascite, derrame pleural, trombo em átrio esquerdo e congestão hepática, *post mortem*. Para determinar a ocorrência e classificar a intensidade dos sinais, foi adotada a categorização semi-quantitativa; na ocorrência do sinal, este foi classificado de acordo com o grau de intensidade detectado: leve (+); moderado (++); grave (+++).

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

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

2.8 - Caracterização da remodelação cardíaca

2.8.1 - Análise estrutural e funcional do coração *in vivo*

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada *in vivo* por meio do ecocardiograma, após 18 e 28 semanas da indução de EAo. O estudo ao final da 18ª semana teve como finalidade, caracterizar, estrutural e funcionalmente, os ratos Sham e EAo, a fim de formar grupos homogêneos com EAo (EAo e EAoTF) e Sham (Sham e ShamTF). A análise à 28ª semana avaliou a influência do exercício físico por 10 semanas sobre a estrutura e função cardíaca. O ecocardiograma representa uma alternativa para o estudo da função ventricular e pode oferecer importantes informações sobre desempenho cardíaco em roedores (65). Ele permite avaliar: 1) a morfologia e a função do coração (19,22,23); 2) a evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão(66) e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração (19). É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriais (67). É um processo que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que técnicas invasivas, como a hemodinâmica (68). É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício (69).

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 ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo-M com o feixe de ultra-som, orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo

(VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. 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, $\Delta D \text{ meso} \{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + EDSIV)\}$, e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. 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, consequente 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 será realizada no monitor do ecocardiógrafo (70).

2.8.2 - Análise da função miocárdica in vitro

A função do miocárdio foi analisada *in vitro* por meio da técnica de músculo papilar isolado. A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo,

realizada rotineiramente em nosso laboratório (71,72), avalia a função mecânica do miocárdio *in vitro*. Esta preparação permite detectar alterações na contração e no relaxamento do músculo cardíaco, independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, o que é difícil de ser obtido na avaliação do coração *in vivo*. Além disso, como a adaptação do sistema cardiovascular à sobrecarga pressórica pode causar efeitos indiretos no coração, o estudo com músculo papilar isolado tem a vantagem de possibilitar a análise direta da função miocárdica. O estudo funcional do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foi realizado conforme técnica descrita abaixo.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), eutanasiados por decapitação e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 24,88 NaHCO₃, previamente aerados durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) e mantidos à temperatura de 28°C. Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular; este foi dividido a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar a lesão

das extremidades dos músculos papilares. Estes, após terem suas extremidades presas aos anéis, foram rapidamente transferidos para a câmara de vidro contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante (Refrigerating/Heating -20°C to 150°C, PolyScience Division of Preston Industries, Inc., Niles, IL, USA). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacement Transducer, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA). O fio de aço atravessa uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que é ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Sobre esta extremidade existe um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. nº 463, USA) que controla a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, semelhante aos anteriores, um peso de 5,0 g, denominado pré-carga, que tem por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar. A alavanca é constituída de alumínio ou bronze, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha (Grass E8, GRASS Technologies, Na astro-Med, Ic. Product Group, West Warwick, RI, USA), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a um estimulador elétrico (Grass S48, GRASS Technologies, Na astro-Med, Ic. Product Group, West Warwick, RI, USA) que emite estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de

estímulo utilizada foi de 12 a 15 volts, aproximadamente, 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução foi mantido entre 7,38 e 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução entre 550 a 600 mmHg.

Após um período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraem contra a pré-carga sem desenvolver força, contração isotônica, foi colocado uma carga adicional de 50 g, denominada *pós-carga*, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pré-carga acrescida da pós-carga, impede que os músculos encurtem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impede a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, aproximadamente 15 minutos, este foi progressivamente estirado com auxílio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se L_{max} . Após atingir o L_{max} , o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para determinação final de L_{max} . O registro das variáveis foi iniciado após verificação de que o músculo permanece estável em contração isométrica durante 15 minutos. Este trabalho consistiu na avaliação da função miocárdica em condição basal e de manobras lusitrópicas e inotrópicas. Após o término da avaliação mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados da preparação e utilizados para a avaliação da área seccional (AS). Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares são: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm²). O comprimento in vitro (L_{max}), medido com

auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em L_{max} . Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentarem comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentarem afastamento superior a 1,96 desvios padrão da média. Os músculos papilares que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,5 mm² foram utilizados no experimento.

2.8.2.1 - Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados de curvas obtidas durante contração isométrica: tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm²), tensão de repouso (TR, g/mm²), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm²/s) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, g/mm²/s). A curva de contração isométrica obtida durante os experimentos foi representada conforme ilustração abaixo, na Figura 3.

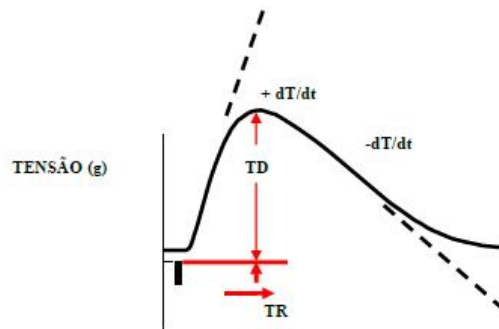


Figura 3. Representação esquemática da curva de contração isométrica.

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Bárbara, CA, USA). A análise das curvas permite determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram normalizados pela AS do músculo papilar. Este processo de normalização permite comparar o desempenho de músculos papilares de diferentes tamanhos. Os dados obtidos foram apresentados em valores absolutos.

2.8.2.2 - Protocolo funcional

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

2.8.2.2.1 - Protocolo funcional em condição basal

A obtenção dos dados em condição basal foi realizada com concentração de cálcio de 2,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e estimulação elétrica dos músculos numa frequência constante de 0,2 Hz.

2.8.2.2.2 - Manobras inotrópicas e lusitrópicas

A alteração da frequência cardíaca e estímulo do sistema β -adrenérgico foram realizados como manobras inotrópicas e lusitrópicas miocárdicas.

2.8.2.2.2.1 - Alteração da frequência cardíaca

A relação entre frequência de batimentos e função cardíaca permite avaliar o transito de cálcio intracelular e o acoplamento-excitação-contração (73). Esta manobra foi realizada com concentração de cálcio de 1,0 mM na solução de Krebs-Henseleit e após uma alteração sequencial da frequência de estímulo de 0,2 para 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 Hz, com intervalos de cinco minutos entre cada alteração.

2.8.2.2.2.2 - Estímulo do sistema β -adrenérgico

Os receptores β -adrenérgicos (β AR) do miocárdio apresentam um importante papel na regulação da função cardíaca, por meio da ligação de agonistas β AR, como isoproterenol. Nesta manobra, foi determinada a relação dose-resposta entre o isoproterenol e os parâmetros mecânicos convencionais do músculo papilar em Lmax. O isoproterenol (Sigma®-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi adicionado progressivamente ao banho nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} mol/L, na

presença de Ca^{2+} a 1.0 mM. A resposta contrátil estabilizou-se 10 minutos após a adição de cada dose de isoproterenol.

2.8.3 - Análise macroscópica do coração *post mortem*

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

2.8.4 - Análise da expressão proteica do sistema β -adrenérgico

A expressão proteica dos receptores β -adrenérgicos ($\beta 1$ e $\beta 2$), da PKA e da Adenilato ciclase foi realizada pela técnica de Western Blot. Adicionalmente, foi realizada a expressão da proteína de normalização, β -actina.

2.8.4.1 - Técnica de Western Blot

Este método é frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico (74) 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 (75). A metodologia de Western Blot está descrita abaixo.

2.8.4.1.1 - Extração das proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron Ultra Turrax™ T25 Basic (IKA Works, Wilmington, NC, USA) com tampão de lise RIPA (Amresco, Solon, OH, USA) contendo inibidores de protease e fosfatase (Roche, Indianapolis, IN, USA). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

2.8.4.1.2 - Eletroforese em gel

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

CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por aproximadamente 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.8.4.1.3 - Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCl 20mM pH 7,6 e NaCl 137 mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M, pH 2,8; NaCl 5M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 90 minutos sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream

Health, Rochester, NY, USA) e as análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo software Image J software (NIH, Bethesda, MD).

2.8.4.1.4 - Anticorpos primários utilizados

- β 1-adrenergic receptors (AR), rabbit IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA);
- β 2-adrenergic receptors (AR), rabbit IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA);
- Adenilato-ciclase, rabbit IgG (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA);
- PKA, mouse IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA).

2.8.4.1.5 - Anticorpo de normalização

- β -actin, rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

2.8.4.1.6 - Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase (anti-mouse IgG ou anti-rabbit IgG), anti-anticorpos primários, foram utilizados na titulação de 1:10000.

2.9 - 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, 28ª semana, foram realizadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para o esquema de dois fatores (quando não paramétrico, Kruskal-Wallis) complementada com os testes de comparações múltiplas de Bonferroni (quando não-paramétrico, Dunn). As variáveis relacionadas ao estudo funcional cardíaco por ecocardiograma, e

pelo músculo papilar isolado após a realização das manobras foram estudadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. A análise dos sinais de insuficiência cardíaca foi realizada pelo teste de associação de Goodman. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados do teste de esforço máximo progressivo realizado com os quatro grupos experimentais. No decorrer do protocolo de treinamento físico, o teste de esforço foi realizado para avaliar a capacidade funcional dos animais e ajustar a carga do treinamento. As variáveis analisadas foram: velocidade de exaustão (VEx); tempo total (Tt) e distância percorrida (DP).

No momento T1, não houve diferença intragrupo, Sham e EAo, nas variáveis VEx e Tt; entretanto, o grupo ShamTF, apresentou menor DP em relação ao Sham. Nos momentos T2, T3 e T4, os grupos ShamTF e EAoTF apresentaram valores significativamente maiores de VEx, Tt e DP, em relação aos respectivos controles. Na comparação intergrupo, os grupos EAo apresentaram valores menores do que os dos grupos Sham nas três variáveis analisadas, nos momentos T2, T3 e T4. A comparação entre os diferentes momentos mostrou que T2, T3 e T4 foram semelhantes entre si e diferentes de T1 nas três variáveis nos grupos treinados.

3.1- Teste de esforço

Tabela 1. Teste de esforço máximo progressivo

Variável	Cirurgia	TF	Momentos de avaliação				Valor <i>p</i>
			T1	T2	T3	T4	
VEx (m/min)	Sham	Ausente	26,0 ± 3,6 ^{aB}	25,5 ± 5,6 ^{aB}	24,0 ± 4,1 ^{aB}	24,2 ± 6,5 ^{aB}	>0,05
		Presente	23,9 ± 4,7 ^{aBα}	31,7 ± 5,6 ^{bBβ}	33,1 ± 6,0 ^{bBβ}	34,8 ± 7,7 ^{bBβ}	<0,01
	EAo	Ausente	17,1 ± 2,6 ^{aA}	15,0 ± 4,6 ^{aA}	15,4 ± 3,9 ^{aA}	15,0 ± 4,4 ^{aA}	>0,05
		Presente	17,6 ± 3,8 ^{aAα}	21,2 ± 3,6 ^{bAβ}	21,8 ± 2,7 ^{bAβ}	21,6 ± 4,6 ^{bAβ}	<0,01
Valor <i>p</i>			<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	
Tt (mim)	Sham	Ausente	23,3 ± 3,9 ^{aB}	22,4 ± 5,2 ^{aB}	21,1 ± 4,2 ^{aB}	21,8 ± 6,6 ^{aB}	>0,05
		Presente	21,2 ± 4,6 ^{aBα}	29,0 ± 5,3 ^{bBβ}	30,2 ± 8,0 ^{bBβ}	32,1 ± 8,0 ^{bBβ}	<0,01
	EAo	Ausente	14,0 ± 2,9 ^{aA}	12,7 ± 4,5 ^{aA}	12,4 ± 3,5 ^{aA}	12,3 ± 3,9 ^{aA}	>0,05
		Presente	15,2 ± 3,7 ^{aAα}	18,6 ± 3,7 ^{bAβ}	19,0 ± 2,7 ^{bAβ}	19,3 ± 4,3 ^{bAβ}	<0,01
Valor <i>p</i>			<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	
DP (m)	Sham	Ausente	394 ± 97 ^{bB}	371 ± 131 ^{aB}	324 ± 108 ^{aB}	351 ± 175 ^{aB}	>0,05
		Presente	331 ± 120 ^{aBα}	566 ± 199 ^{bBβ}	607 ± 215 ^{bBβ}	688 ± 330 ^{bBβ}	<0,01
	EAo	Ausente	156 ± 61 ^{aA}	128 ± 66 ^{aA}	132 ± 64 ^{aA}	140 ± 74 ^{aA}	>0,05
		Presente	191 ± 83 ^{aAα}	266 ± 92 ^{bAβ}	280 ± 85 ^{bAβ}	283 ± 105 ^{bAβ}	<0,01
Valor <i>p</i>			<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	

TF: Treinamento físico. TE: Teste de esforço. Sham Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia simulada não submetidos ao TF; Sham Presente (n=23): animais submetidos à cirurgia simulada e ao TF; EAo Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e não submetidos ao TF; EAo Presente (n=26): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao TF. T1: TE inicial, previamente ao protocolo de TF; T2: TE realizado após três semanas de TF; T3: TE realizado após sete semanas de TF; T4: TE final, realizado após 10 semanas de TF. VEx: Velocidade de exaustão atingida no TE; Tt: Tempo total do teste; DP: Distância percorrida. Letras minúsculas: comparação entre ausente vs presente fixado a cirurgia; Letras maiúsculas: comparação entre Sham e EAo fixado o treinamento. Letras gregas: comparação dos momentos fixado cirurgia e treinamento. Anova para o modelo de medidas repetidas no esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni, $p < 0,05$.

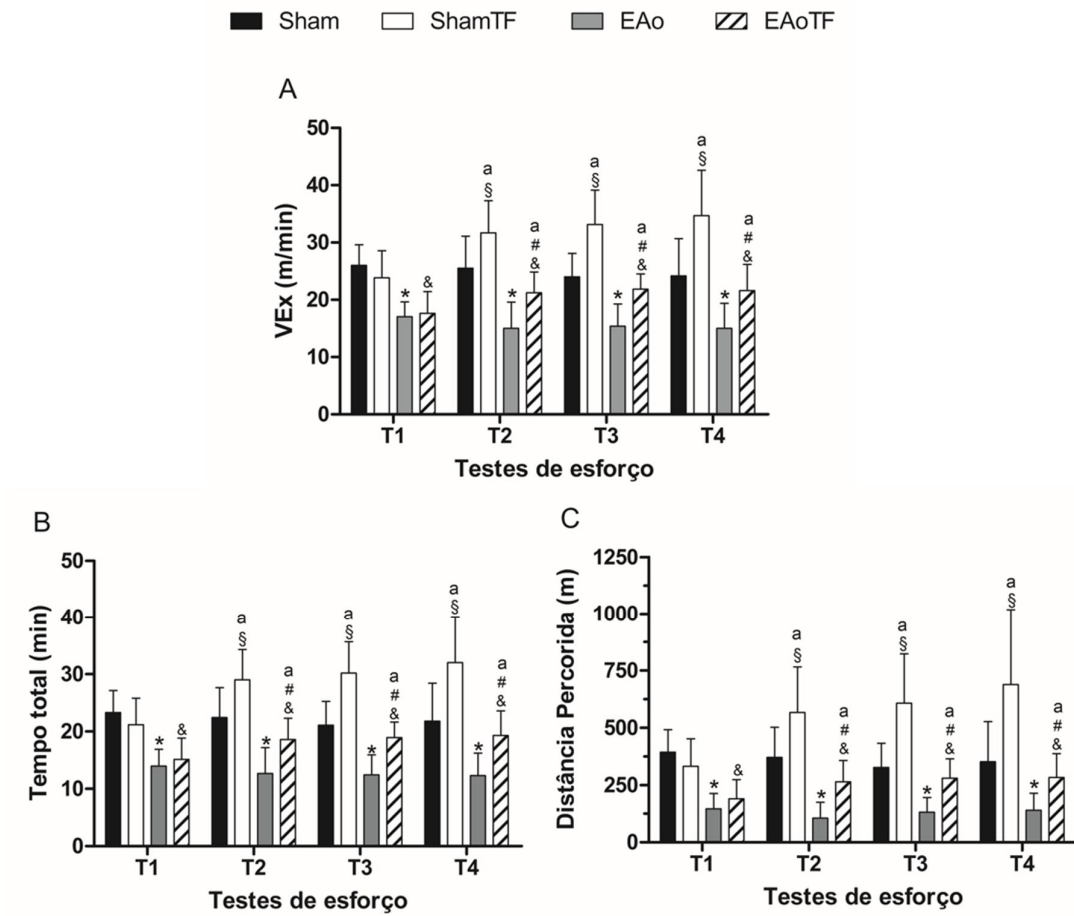


Figura 4. Sham Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia simulada não submetidos ao TF; Sham Presente (n=23): animais submetidos à cirurgia simulada e ao TF; EAo Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e não submetidos ao TF; EAo Presente (n=26): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao TF. T1: TE inicial, previamente ao protocolo de TF; T2: TE realizado após três semanas de TF; T3: TE realizado após sete semanas de TF; T4: TE final, realizado após 10 semanas de TF. VEx: Velocidade de exaustão atingida no TE; Tt: Tempo total do teste; DP: Distância percorrida. Símbolos representam diferenças estatísticas entre os grupos, fixado o momento. Letra representa diferença estatística entre os momentos, fixado o grupo.

*: $p < 0,05$, EAo vs Sham;
 §: $p < 0,05$ ShamTF vs Sham;
 &: $p < 0,05$ EAoTF vs ShamTF;
 #: $p < 0,05$ EAo vs EAoTF;
 a: $p < 0,05$ vs T1.

3.2 - Sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca

Os sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca dos grupos EAo e EAoTF estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 5. O grupo EAoTF apresentou redução significativa da ocorrência de ascite, taquipneia, derrame pleural, trombo em átrio e congestão hepática em relação ao grupo EAo.

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

Grupos	Ascite (%)				Total
	Não	+	++	+++	
EAo	8 (44,5) ^{aB}	8 (44,5) ^{aB}	2 (11,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	18
EAoTF	23 (92,0) ^{bB}	2 (8,0) ^{bA}	0 (0,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	25
	Taquipnéia (%)				
	Não	+	++	+++	
EAo	0 (0,0) ^{aA}	5 (27,8) ^{aB}	11(61,2) ^{bB}	2(11,0) ^{aA}	18
EAoTF	11 (44,0) ^{bB}	13 (52,0) ^{bB}	1 (4,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	25
	Derrame pleural (%)				
	Não	+	++	+++	
EAo	0 (0,0) ^{aA}	4 (22,3) ^{aA}	12 (66,7) ^{bB}	2 (11,0) ^{aA}	18
EAoTF	9 (36,0) ^{bB}	14 (56,0) ^{bB}	2 (8,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	25
	Trombo (%)				
	Não	+	++	+++	
EAo	7 (38,9) ^{aA}	4 (22,3) ^{aA}	5 (27,8) ^{bA}	2 (11,0) ^{aA}	18
EAoTF	23 (92,0) ^{bB}	2 (8,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	25
	Fígado (%)				
	Não	+	++	+++	
EAo	6 (33,3) ^{aB}	6 (33,3) ^{aB}	5 (27,8) ^{aB}	1 (5,6) ^{aA}	18
EAoTF	21 (84,0) ^{bB}	2 (8,0) ^{aA}	2 (8,0) ^{aA}	0 (0,0) ^{aA}	25

EAo: animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica (n=18); EAoTF: animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico (n=25). Dados expressos em frequência relativa (%). Não= não apresentou sinal; + = 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.

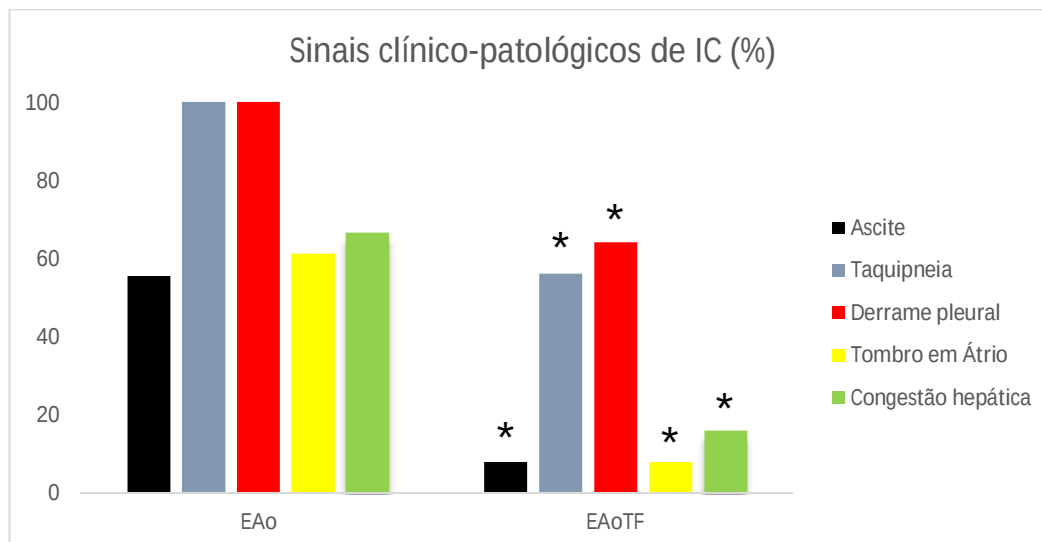


Figura 5. Sinais clínico-patológicos de IC. EAO: animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica (n=18); EAoTF: animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao treinamento físico (n=25). Dados expressos em frequência relativa (%). Teste de associação de Goodman. *: Diferença estatística EAoTF vs EAO.

3.3 - Relação peso úmido/seco nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A relação peso úmido/seco dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos grupos Sham, ShamTF, EAO e EAoTF está apresentada na Tabela 3. O grupo EAO apresentou maior umidade que o grupo Sham no VE, VD e fígado. Na comparação entre os grupos treinados, foram verificados valores maiores no VD e Pulmão, no grupo EAoTF em relação ao ShamTF. O grupo EAoTF mostrou valor menor de umidade do que o grupo EAO apenas no fígado.

Tabela 3. Relação peso úmido/seco dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Variável	Grupo	Treinamento Físico		Valor <i>p</i>
		Ausente	Presente	
VE	Sham	76,3 ± (75,1-77,0)	76,9 ± (75,9-77,6)	>0,05
	EAo	78,1 ± (77,6; 79,0)	77,2 ± (75,9; 79,0)	>0,05
Valor <i>p</i>		<0,05	>0,05	
VD	Sham	75,6 (74,3-76,8)	76,0 (74,9-76,7)	>0,05
	EAo	77,9 (77,2-78,6)	77,1 (76,1-77,8)	>0,05
Valor <i>p</i>		<0,001	<0,001	
AT	Sham	77,7 (75,5-78,8)	77,5 (75,6-78,4)	>0,05
	EAo	79,0 (78,1-79,4)	78,4 (77,9-79,0)	>0,05
Valor <i>p</i>		>0,05	>0,05	
Fígado	Sham	66,9 (66,6-67,3)	67,3 (66,6-67,8)	>0,05
	EAo	69,4 (68,2-70,2)	67,7 (67,1-68,6)	<0,001
Valor <i>p</i>		<0,001	>0,05	
Pulmão	Sham	78,3 (77,3-78,9)	77,6 (76,9-78,2)	>0,05
	EAo	79,6 (77,8-80,3)	79,6 (78,2-80,8)	>0,05
Valor <i>p</i>		>0,05	<0,001	

TF: Treinamento físico. Sham Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia simulada não submetidos ao TF; Sham Presente (n=23): animais submetidos à cirurgia simulada e ao TF; EAo Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e não submetidos ao TF; EAo Presente (n=26): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao TF; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrios. Dados expressos em mediana (percentis 25 e 75). Kruskal-Wallis complementado com Dunn. *p*<0,05.

3.3 - Perfil morfológico cardíaco *post mortem*

A Tabela 4 apresenta os resultados da análise macroscópica do perfil morfológico cardíaco *post mortem*. Os grupos EAo apresentaram menor peso corporal (PC) em relação aos respectivos controles. Os grupos EAo e EAoTF apresentaram maior peso do VE, VD e AT, e suas respectivas relações com a tíbia. O treinamento físico somente promoveu alteração no VD, na comparação entre EAoTF e EAo.

Tabela 4. Perfil morfológico cardíaco *post mortem*

Variável	Grupo	Treinamento Físico		Valor p
		Ausente	Presente	
PC (g)*	Sham	551 ± 69	523 ± 82	>0,05
	EAo	477 ± 38	461 ± 51	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
VE (g)	Sham	0,95 (0,87-1,06)	0,88 (0,82-0,98)	>0,05
	EAo	1,47 (1,25-1,67)	1,49 (1,31-1,57)	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
VD (g)*	Sham	0,25 ± 0,04	0,24 ± 0,03	>0,05
	EAo	0,48 ± 0,07	0,43 ± 0,12	<0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
AT (g)	Sham	0,12 (0,12-0,14)	0,12 (0,10-0,13)	>0,05
	EAo	0,43 (0,34-0,50)	0,40 (0,30-0,44)	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
Tíbia (cm)	Sham	4,51 (4,39-4,62)	4,46 (4,41-4,60)	>0,05
	EAo	4,42 (4,38-4,46)	4,39 (4,34-4,50)	>0,05
Valor p		>0,05	>0,05	
VE/tíbia (g/cm)	Sham	0,21 (0,19-0,23)	0,20 (0,18-0,21)	>0,05
	EAo	0,34 (0,29-0,37)	0,34 (0,30-0,36)	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
VD/tíbia (g/cm)	Sham	0,05 (0,05-0,06)	0,05 (0,05-0,06)	>0,05
	EAo	0,11 (0,10-0,12)	0,10 (0,08-0,12)	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	
AT/tíbia (g/cm)	Sham	0,03 (0,03-0,03)	0,03 (0,02-0,03)	>0,05
	EAo	0,09 (0,08-0,11)	0,09 (0,07-0,10)	>0,05
Valor p		<0,001	<0,001	

TF: Treinamento físico. Sham Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia simulada não submetidos ao TF; Sham Presente (n=23): animais submetidos à cirurgia simulada e ao TF; EAo Ausente (n=18): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e não submetidos ao TF; EAo Presente (n=26): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica e ao TF; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrios; 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 mediana (percentis 25 e 75). Kruskal-Wallis complementado com Dunn. *Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova complementada com Bonferroni. $p < 0,05$.

3.4 - Ecocardiograma

Os dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo após 18 semanas de cirurgia estão apresentados na Tabela 5. Os animais do grupo EAo apresentaram diminuição significativa do PC, FE, %Enc. Meso e VEPP, e aumento da Esp. Rel. VE, AE, AE/AO, Onda E e E/A em relação ao grupo Sham.

Tabela 5. Dados ecocardiográficos da 18ª semana

Variáveis	Grupos		Valor de p
	Sham	EAo	
PC (g)*	503 ± 63,7	433±47,0	<0,001
FC (bpm)	312 (285-353)	312(290-338)	>0,05
DDVE (mm)*	7,38 ± 0,546	7,69 ± 0,930	>0,05
Esp.rel.VE	0,44 (0,41-0,47)	0,73 (0,65-0,85)	<0,001
AE (mm)	4,85 (4,71-5,15)	8,18 (7,41-8,69)	<0,001
AE/AO*	1,29 ± 0,17	2,03 ± 0,27	<0,001
FE (%)	92 (91-94)	90 (85-92)	<0,05
% Enc. Meso*	27,7 ± 3,42	25,4 ± 4,09	<0,05
VEPP (mm/s)*	58,5 ± 7,08	40,19 ± 7,74	<0,001
Onda E (cm/s)	84,5 (79,3-89,0)	130 (96,7-148)	<0,001
E/A	1,47 (1,39-1,56)	4,83 (1,98-6,08)	<0,001

Sham (n=41): animais submetidos à cirurgia simulada; EAo (n= 41): animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supraválvar. PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; Esp. Rel. VE: relação entre a espessura da parede e o diâmetro do ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Onda E: velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce; E/A: relação entre as velocidades de fluxo transmitral nas fases de enchimento ventricular precoce e de contração atrial. Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75, teste de Mann-Whitney. *: Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste "t" de Student. $p < 0,05$.

A Tabela 6 mostra o estudo ecocardiográfico dos quatro grupos experimentais na 18ª semana, previamente ao treinamento físico, e na 28ª semana, após o protocolo de treinamento. A coluna da 18ª semana indica que os grupos Sham e EAo, na presença ou ausência do TF, são homogêneos. Neste momento, a comparação entre os grupos EAo e Sham, independentemente do treinamento físico, apresentou diferença em todas as variáveis analisadas, exceto FC e DDVE, e %Enc. Meso, esta última, apenas na comparação entre EAoTF e ShamTF. O grupo ShamTF apresentou valores de FE, %Enc. Meso e VEPP maiores do que o grupo Sham. Na avaliação à 28ª semana, o grupo EAoTF mostrou atenuação da disfunção diastólica, verificada pela relação E/A em comparação com o grupo EAo.

Tabela 6. Dados ecocardiográficos da 18ª e 28ª semana

Variável	Cirurgia	TF	Momento		Valor p
			18 semanas	28 semanas	
FC (bpm)	Sham	Ausente	323 ± 59	306 ± 41	>0,05
		Presente	324 ± 45	329 ± 43	>0,05
	EAo	Ausente	315 ± 43	311 ± 35	>0,05
		Presente	314 ± 31	310 ± 34	>0,05
Valor p			>0,05	>0,05	
DDVE (mm)	Sham	Ausente	7,29 ± 0,60	7,65 ± 0,64 ^{aA}	<0,05
		Presente	7,46 ± 0,50	7,65 ± 0,38 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	7,62 ± 0,82	7,97 ± 0,53 ^{aA}	>0,05
		Presente	7,75 ± 1,00	8,29 ± 0,99 ^{aB}	>0,05
Valor p			>0,05	<0,01	
Esp. Rel. VE	Sham	Ausente	0,44 ± 0,04 ^{aA}	0,43 ± 0,04 ^{aA}	>0,05
		Presente	0,44 ± 0,04 ^{aA}	0,43 ± 0,03 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	0,79 ± 0,14 ^{aB}	0,75 ± 0,08 ^{aB}	>0,05
		Presente	0,75 ± 0,14 ^{aB}	0,70 ± 0,14 ^{aB}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
AE (mm)	Sham	Ausente	5,01 ± 0,37 ^{aA}	4,97 ± 0,32 ^{aA}	>0,05
		Presente	4,98 ± 0,37 ^{aA}	4,95 ± 0,24 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	8,11 ± 1,08 ^{aB}	8,31 ± 0,84 ^{aB}	>0,05
		Presente	8,06 ± 1,07 ^{aB}	7,85 ± 1,19 ^{aB}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
AE/AO	Sham	Ausente	1,30 ± 0,10 ^{aA}	1,27 ± 0,12 ^{aA}	>0,05
		Presente	1,28 ± 0,13 ^{aA}	1,24 ± 0,09 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	2,05 ± 0,29 ^{aB}	1,97 ± 0,16 ^{aB}	>0,05
		Presente	2,01 ± 0,26 ^{aB}	1,92 ± 0,29 ^{aB}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
% FE	Sham	Ausente	92 ± 2,3 ^{aB}	90 ± 3,4 ^{aB}	>0,05
		Presente	92 ± 2,2 ^{aB}	93 ± 1,1 ^{aB}	<0,05
	EAo	Ausente	87 ± 6,0 ^{aA}	88 ± 5,7 ^{aA}	>0,05
		Presente	89 ± 4,6 ^{aA}	88 ± 3,6 ^{aA}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
% Enc. meso	Sham	Ausente	27,7 ± 2,4 ^{aB}	25,8 ± 3,0 ^{aA}	<0,05
		Presente	27,9 ± 4,1 ^{aA}	29,5 ± 2,9 ^{bB}	>0,05
	EAo	Ausente	24,6 ± 4,1 ^{aA}	24,9 ± 4,3 ^{aA}	>0,05
		Presente	25,9 ± 4,1 ^{aA}	24,0 ± 2,6 ^{aA}	<0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
VEPP (mm/s)	Sham	Ausente	57,3 ± 8,2 ^{aB}	57,7 ± 5,3 ^{aB}	>0,05
		Presente	59,5 ± 6,0 ^{aB}	63,9 ± 7,2 ^{bB}	>0,05
	EAo	Ausente	38,1 ± 7,4 ^{aA}	40,6 ± 9,0 ^{aA}	>0,05
		Presente	41,5 ± 7,8 ^{aA}	42,1 ± 9,7 ^{aA}	>0,05

Tabela 6. Dados ecocardiográficos da 18ª e 28ª semana “continua”					
Valor p			<0,01	<0,01	
Onda E (cm/s)	Sham	Ausente	80,9 ± 7,7 ^{aA}	82,0 ± 11,7 ^{aA}	>0,05
		Presente	88,4 ± 12,7 ^{aA}	88,3 ± 13,9 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	130,2 ± 30,1 ^{aB}	131,5 ± 28,8 ^{aB}	>0,05
		Presente	122,3 ± 34,6 ^{aB}	133,5 ± 27,4 ^{aB}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	
E/A	Sham	Ausente	1,47 ± 0,15 ^{aA}	1,48 ± 0,19 ^{aA}	>0,05
		Presente	1,47 ± 0,12 ^{aA}	1,49 ± 0,14 ^{aA}	>0,05
	EAo	Ausente	4,80 ± 2,29 ^{aB}	5,42 ± 1,57 ^{bB}	>0,05
		Presente	4,28 ± 2,37 ^{aB}	4,35 ± 1,86 ^{aB}	>0,05
Valor p			<0,01	<0,01	

Sham (n=18): animais submetidos à cirurgia simulada; ShamTF (n=21): animais submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAO (n=16): animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica; EAO TF (n=26): 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: porcentagem de fração de ejeção; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; Onda E: velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce; E/A: relação entre as velocidades de fluxo transmitral nas fases de enchimento ventricular precoce e de contração atrial. Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni, $p < 0,05$.

3.3 - Músculo papilar isolado

O estudo da função miocárdica *in vitro* pelo músculo papilar isolado em condição basal está apresentado na Tabela 7. O grupo EAO apresentou valores basais menores de TD e +dT/dt, e maiores de TR e TPT em relação ao grupo Sham. A TD e TPT foram maiores e a +dT/dt menor no grupo EAO TF em relação ao grupo Sham TF. O grupo EAO TF mostrou valor basal de TR menor do que o grupo EAO; o treinamento físico não promoveu alterações nas outras variáveis.

Tabela 7 - Contração isométrica basal

Variáveis	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
TD (g/mm ²)	7,12 ± 1,42	6,35 ± 1,60	5,18 ± 1,23*	5,70 ± 1,31
TR (g/mm ²)	0,64 ± 0,14	0,56 ± 0,16	0,88 ± 0,23*	0,75 ± 0,17 ^{&#}
+ dT/dt (g/mm ² /s)	78,6 ± 18,3	71,9 ± 20,7	45,0 ± 13,2*	54,0 ± 13,8 ^{&}
- dT/dt (g/mm ² /s)	24,7 ± 4,40	24,3 ± 5,20	23,3 ± 4,92	25,9 ± 6,90
TPT (ms)	183 ± 10,7	179 ± 20,6	216 ± 22,3*	208 ± 18,0 ^{&}
AS (mm ²)	1,10 ± 0,21	1,10 ± 0,20	1,17 ± 0,25	1,21 ± 0,27

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 18); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 23); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 18); EAO TF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 26). TD: tensão máxima desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico de tensão; AS: área seccional do músculo papilar. Dados expressos em média ± desvio-padrão. *: EAO vs Sham; [&]: EAO TF vs ShamTF; [#]: EAO TF vs EAO. Anova de duas vias para modelo de dois fatores complementada com Bonferroni, p<0,05.

A Figura 6 mostra os resultados da elevação da frequência cardíaca na resposta inotrópica dos quatro grupos experimentais. O grupo EAO apresentou valor menor de TD em relação ao Sham em condição basal e nas frequências 0,1 Hz e 0,2 Hz. Na +dT/dt, o grupo EAO mostrou pior desempenho, comparado ao Sham, na condição basal e nas frequências 0,1 Hz, 0,2 Hz, 0,4 Hz e 1,0 Hz; esse comportamento também foi observado na comparação entre EAO TF e ShamTF, na condição basal e frequências 0,1 Hz e 0,2 Hz. A elevação da frequência cardíaca reduziu o valor de -dT/dt do grupo EAO, comparado ao Sham, apenas na frequência 0,1 Hz. A análise intragrupo mostrou que a elevação da frequência de estímulo, de modo geral, provocou diminuição da capacidade de resposta de todos os grupos nas três variáveis analisadas.

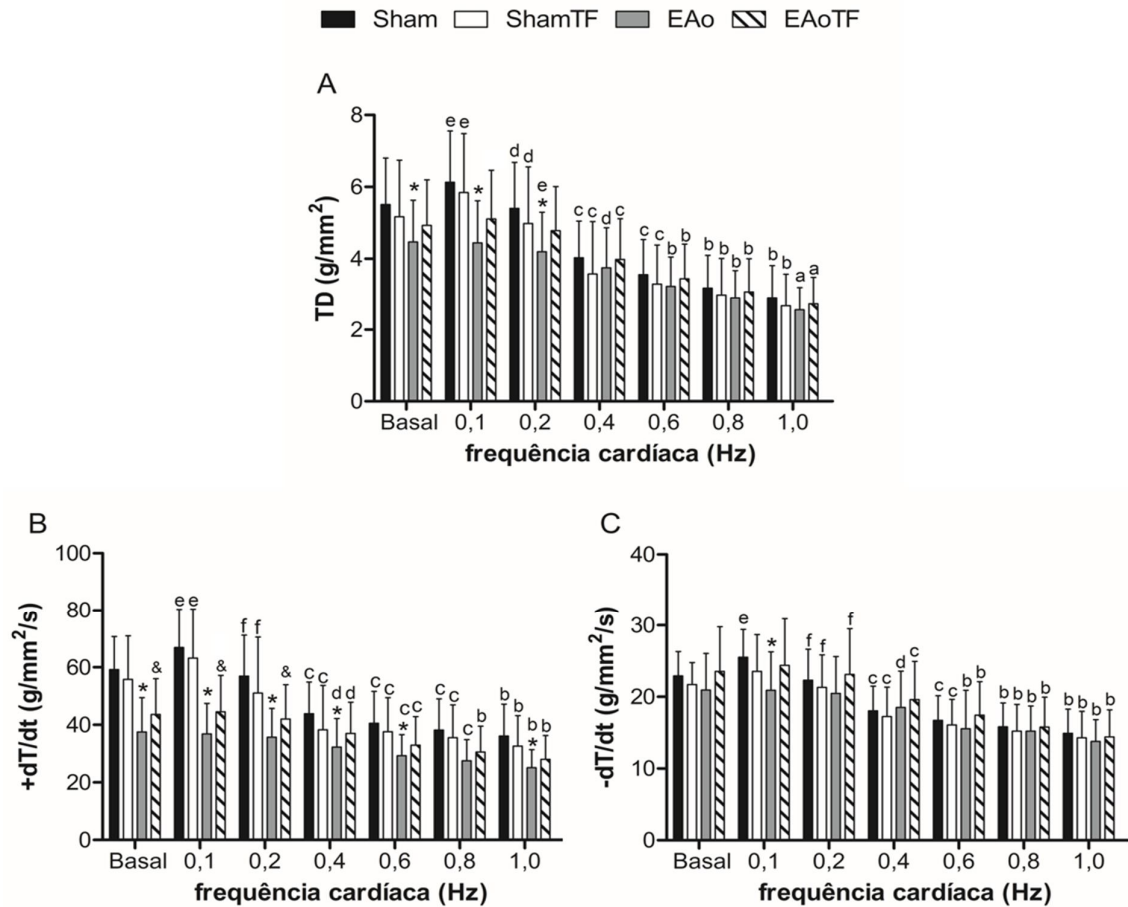


Figura 6. Efeitos do aumento da frequência cardíaca sobre a função miocárdica. Sham (n= 18): ratos submetidos à cirurgia simulada; ShamTF (n= 23): ratos submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAo (n= 18): ratos submetidos à estenose aórtica supralvar; EAoTF (n= 26): ratos submetidos à estenose aórtica supralvar e ao treinamento físico; A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: +dT/dt - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; C: -dT/dt - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Letras expressam as diferenças estatísticas entre os momentos fixado o grupo. Símbolos expressam as diferenças estatísticas entre os grupos fixado o momento. Anova de duas vias para o modelo de medidas repetidas e grupos independentes complementada com Bonferroni, $p < 0,05$.

^a $p < 0,05$ vs 0,6 Hz, 0,4 Hz, 0,2 Hz, 0,1 Hz e Basal;

^b $p < 0,05$ vs 0,4 Hz, 0,2 Hz, 0,1 Hz e Basal;

^c $p < 0,05$ vs 0,2 Hz, 0,1 Hz e Basal;

^d $p < 0,05$ vs 0,1 Hz e Basal;

^e $p < 0,05$ vs Basal;

^f $p < 0,05$ vs 0,1 Hz.

*: EAo vs Sham;

&: EAoTF vs ShamTF.

A Figura 7 apresenta os resultados da manobra de estimulação do sistema beta adrenérgico pelo isoproterenol nos quatro grupos experimentais. O grupo EAo apresentou valores de TD menores que os do Sham a partir da concentração 10^{-8} , até 10^{-6} ; entretanto, o grupo EAoTF só sofreu prejuízo com as concentrações 10^{-7} e 10^{-6} , na comparação com ShamTF nessa mesma variável. Os grupos EAo apresentaram redução da $+dT/dt$ em condição basal e em todas as concentrações de isoproterenol, em relação aos respectivos controles. No estudo da $-dT/dt$, foi observado menor desempenho em EAo e EAoTF em relação a Sham e ShamTF, respectivamente, nas concentrações 10^{-7} e 10^{-6} . Na comparação intragrupo, a estimulação do sistema β -adrenérgico com o Isoproterenol mostrou que os grupos EAo e EAoTF apresentaram pior resposta em relação aos respectivos controles.

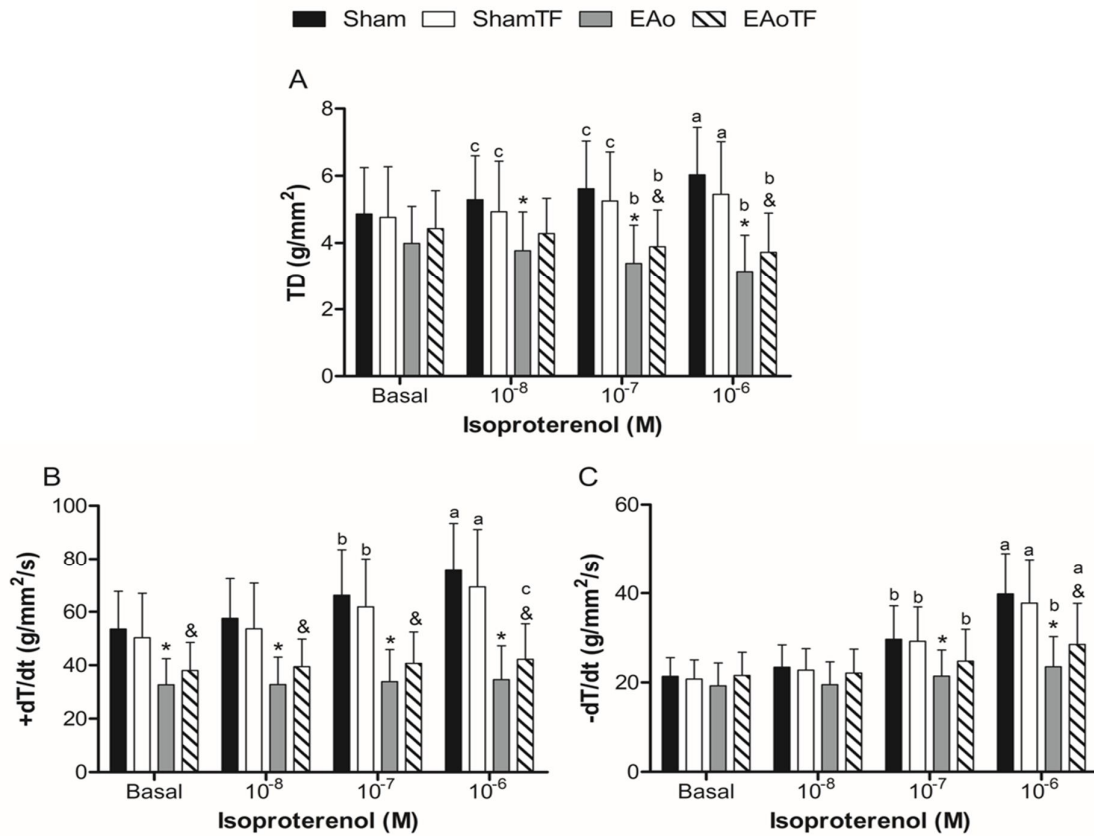


Figura 7. Efeitos da adição de isoproterenol sobre a função dos músculos papilares. Sham (n= 18): ratos submetidos à cirurgia simulada; ShamTF (n= 23): ratos submetidos à cirurgia simulada e ao treinamento físico; EAo (n= 18): ratos submetidos à estenose aórtica supravalvar; EAoTF (n= 26): ratos submetidos à estenose aórtica supravalvar e ao treinamento físico. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: +dT/dt - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; C: -dT/dt - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Letras expressam as diferenças estatísticas entre os momentos fixado o grupo. Símbolos expressam as diferenças estatísticas entre os grupos fixado o momento. Anova de duas vias para o modelo de medidas repetidas e grupos independentes complementada com Bonferroni, $p < 0,05$.

^a $p < 0,05$ vs 10^{-7} M, 10^{-8} M e Basal;

^b $p < 0,05$ vs 10^{-8} M e Basal;

^c $p < 0,05$ vs Basal;

*: EAo vs Sham;

&: EAoTF vs ShamTF.

3.6 - Expressão proteica por Western Blot

A expressão proteica dos componentes do sistema β -adrenérgico está apresentada na Figura 8. A estenose aórtica não alterou os níveis proteicos de nenhum dos componentes desse sistema avaliados: β -1 **(A)**; β -2 **(B)**, PKA **(C)** e AC **(D)**. O treinamento físico também não acarretou mudanças na expressão proteica, independentemente da ausência ou presença de estenose aórtica.

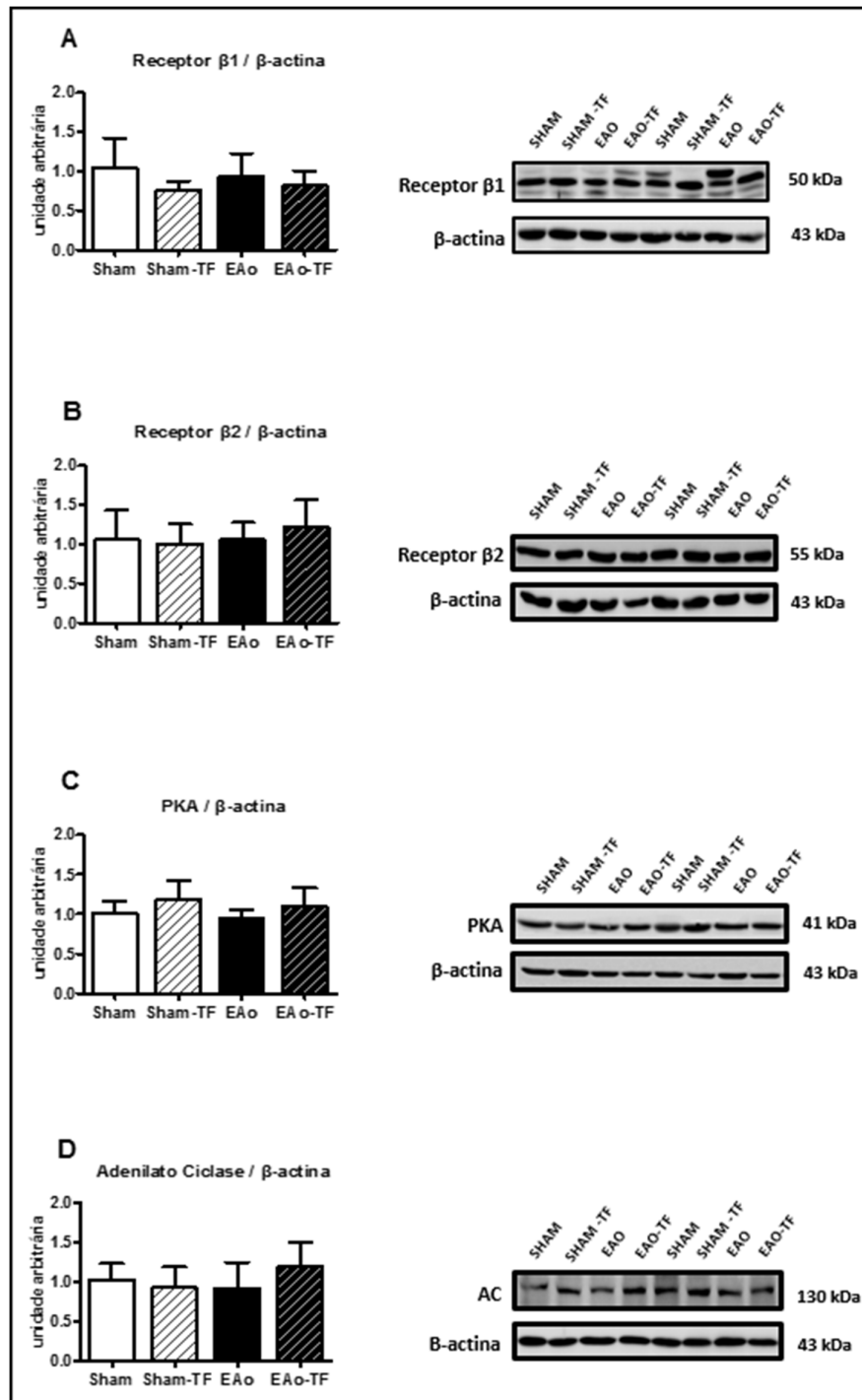


Figura 8. Expressão proteica dos receptores β -1 (A) e β -2-adrenérgicos (B), PKA – Proteína quinase A (C), e AC – Adenilato ciclase (D) normalizadas pela beta-actina. (Sham, n=7; ShamTF, n=7; EAo, n=7 e EAoTF, n=7). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Anova de duas vias para modelo de dois fatores complementado com Bonferroni. $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1- Estrutura e função cardíaca na 18ª semana

A proposta deste estudo foi iniciar a intervenção com o treinamento físico em animais com estenose aórtica e disfunção ventricular previamente instalada. Desse modo, tornou-se necessário a avaliação *in vivo* na 18ª semana pós indução de EAo, a fim de confirmar a remodelação e prejuízo funcional. A escolha da 18ª para a primeira avaliação se deu em detrimento de trabalhos já realizados pelo grupo terem mostrado o estabelecimento das alterações nesse período (20,24,26). Em concordância com estes estudos, nossos resultados mostraram que a EAo promoveu remodelação estrutural e deterioração funcional, diastólica e sistólica, após 18 semanas da cirurgia. Esses resultados (Tabela 1) foram evidenciados pelo aumento da Esp. Rel. VE, AE, AE/AO, indicativos de remodelação estrutural. O quadro de disfunção é representado pela elevação dos valores de Onda E, VEPP e E/A, relativos à função diastólica, e queda nos valores de FE e %Enc. Meso, relativos à função sistólica. Estes dados corroboram com os achados de outros autores que também verificaram prejuízo funcional diastólico (24–26), e sistólico (76) com 18 semanas de sobrecarga pressórica. A remodelação cardíaca do tipo concêntrica, observada nas sobrecargas pressóricas, têm como finalidade normalizar o estresse parietal sistólico, determinante do grau de encurtamento da fibra cardíaca, isto é, ejeção ventricular; entretanto, a adição de sarcômero em paralelo aumenta a espessura do miócito e pode, na dependência do grau de área transversa do cardiomiócito, provocar prejuízo no estiramento celular e, conseqüentemente, no enchimento ventricular. Os mecanismos fisiopatológicos determinantes da disfunção ventricular estão relacionados com o desequilíbrio entre os constituintes do tecido miocárdico e com a

remodelação adversa da geometria da câmara (77). A instalação de disfunção sistólica à 18ª semana é evento incomum no modelo de EAo, e pode ser resultante da variabilidade biológica das populações de animais estudadas e da maior agressividade do dispositivo implantado.

4.2 - Treinamento físico e capacidade funcional

O teste de tolerância ao esforço ergométrico é uma ferramenta não invasiva de avaliação da doença cardíaca, e sua ampla utilização se dá em virtude de possibilitar a detecção de distúrbios funcionais não observáveis em repouso (59). A medida da tolerância ao esforço físico é um indicador do condicionamento cardiorrespiratório e da capacidade funcional, que são reduzidos pelas cardiopatias (59,78,79). Em nosso estudo, o TE foi implementado para avaliar o panorama da capacidade aeróbica dos animais, possibilitando o ajuste individualizado da carga do treinamento físico com base no grau de comprometimento cardíaco de cada animal. Os resultados do TE (Tabela 2) mostraram que a EAo impactou em redução da tolerância ao exercício na comparação com o grupo controle, nas três variáveis analisadas (VEx, Tt e DP). Outros autores também detectaram intolerância ao esforço em animais com EAo e disfunção diastólica isolada ou acompanhada de disfunção sistólica (25,26,76). Contudo, estudo pioneiro na investigação da capacidade funcional por teste de esforço máximo em ratos com EAo(3), não foram observadas quaisquer alterações no TE na 18ª semana; essa discordância pode ser atribuída ao grau de remodelamento estrutural e funcional mais brandos, e à baixa VEx do grupo controle encontrados pelo autor. Em nosso experimento, após o protocolo de treinamento físico, a capacidade funcional de ambos os grupos foi aumentada; esse achado está de acordo com o de outros investigadores que verificaram melhorias sobre a

capacidade funcional de ratos saudáveis e com disfunção ventricular por sobrecarga pressórica submetidos a treinamento físico de baixa intensidade (24,25,77).

Possivelmente, o ganho de condicionamento físico desses animais teve como mecanismo a normalização da ativação neuro-hormonal, da função endotelial e do metabolismo muscular esquelético (80) .

4.3 - Dados anatômicos *post mortem* e sinais clínico-patológicos de insuficiência cardíaca

A análise macroscópica da morfologia cardíaca *post mortem* (Tabela 4) revelou que a EAo acarretou aumento da massa das câmaras cardíacas e suas respectivas relações com a Tíbia após 28 semanas de EAo; esses resultados são compatíveis com os de outros investigadores (24–26). Entretanto, ainda existem discordâncias quanto aos efeitos do TF sobre a morfologia cardíaca de ratos com EAo. Nossos resultados mostram que o TF apenas reduziu o peso do VD, enquanto que Pacagnelli *et al* (24) encontram redução significativa também no AE. Souza *et al* (26) documentaram valores de VD iguais aos do grupo Sham e redução significativa do AE nos ratos EAo. Quanto à relação peso úmido/seco, o grupo EAoTF só mostrou redução de umidade no fígado.

A avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca é usualmente realizada em estudos experimentais de sobrecarga pressórica (24,26,81). Essa análise fornece um indicativo do grau de comprometimento funcional cardíaco, visto que as variáveis analisadas dizem respeito à órgãos cuja integridade, são dependentes do desempenho funcional cardíaco ótimo. Em nosso estudo (Tabela 2), a estenose aórtica refletiu em alteração de todas as variáveis analisadas (ascite, taquipneia, derrame pleural, trombo em átrio e congestão hepática), sinalizando que esses

animais estavam em franca transição para insuficiência cardíaca grave. Em contraste com o grupo EAo, o grupo EAoTF mostrou redução significativa na ocorrência e intensidade das alterações observadas, o que nos permite inferir que o TF atuou como uma estratégia importante na manutenção de sistemas periféricos, frente à agressão cardiovascular. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores que avaliaram os efeitos do TF em ratos com sobrecarga pressórica (24–26,76,81).

4.4 - Treinamento físico e função cardíaca

A segunda avaliação ecocardiográfica foi realizada após o protocolo de treinamento físico, na 28ª semana, com o objetivo de analisar os efeitos do TF sobre a função cardíaca. O treinamento aeróbio de baixa intensidade foi efetivo em gerar melhoria da função em ratos saudáveis, conforme verificado nas medidas de FE e %Enc. Meso, relativas à função sistólica. Em ratos com sobrecarga pressórica, este estudo mostrou que o TF foi capaz de atenuar a disfunção diastólica, evidenciado pela redução da relação E/A no grupo EAoTF comparado ao EAo. Resultado compatível foi documentado em outros trabalhos, utilizando modelo experimental semelhante (24–26). Entretanto, esses mesmos autores também verificaram um efeito benéfico do treinamento sobre a função sistólica, contrastando com o nosso experimento, que não revelou alteração na fase de ejeção. Essa variação de resposta na função sistólica pode estar relacionada ao grau de comprometimento à 18ª semana, ponto de partida do TF. Nesse momento, nossos animais já apresentavam disfunção sistólica, evidenciada por prejuízo na FE e %Enc. Meso, enquanto que os demais estudos iniciaram o treinamento em ratos com função sistólica preservada.

Os mecanismos responsáveis pela melhoria da função cardíaca dos animais ShamTF podem estar relacionados a fatores intrínsecos e extrínsecos ao

coração, como redução do estresse parietal sistólico por redução da resistência vascular periférica; aumento da contratilidade miocárdica, secundária à maior distensibilidade do sarcômero e sensibilidade ao cálcio, e adaptação neuro-hormonal, por ativação intermitente do sistema nervoso simpático (82).

Os fatores determinantes para o prejuízo na complacência muscular miocárdica, isto é, na fase de estiramento, podem estar relacionados à redução na expressão (83) e atividade (84) da SERCA2A, excesso de outras proteínas, como a titina, componentes da matriz extracelular e citoesqueleto, e a disposição em paralelo de novos sarcômeros. Evidências suportam a teoria de que o treinamento físico previne alterações mal adaptativas nessas estruturas durante a agressão cardíaca; estudo recente sugere que a titina, importante componente estrutural do sarcômero, sofre menor fosforilação no ventrículo esquerdo, diminuindo a rigidez e tornando o miócito mais flexível (85). Outra vertente é apoiada pelo efeito salutar do TF no restabelecimento da homeostase do cálcio citosólico durante a diástole, mediado pela recuperação da atividade da SERCA2A (86). Tomadas em conjunto, essas evidências podem explicar o desfecho positivo da função diastólica observada no grupo EAoTF comparado ao EAo, em decorrência do treinamento aeróbio.

A avaliação *in vitro* da função miocárdica, realizada pela técnica do músculo papilar isolado, teve como finalidade investigar a repercussão da EAo e do TF sobre o miocárdio, isolando a influência de outros sistemas que poderiam interferir na função. Adicionalmente, essa técnica possibilitou a realização de manobras capazes de identificar alterações funcionais, não detectáveis em condição basal.

Os dados obtidos mostram que a EAo acarretou prejuízo na função sistólica e diastólica do músculo isolado na condição basal, e o TF promoveu redução na tensão de repouso no grupo EAoTF. A manobra de aumento da frequência cardíaca

confirmou os resultados observados em condição basal e revelou que, provavelmente, não houve alteração no trânsito de cálcio entre os dois grupos estenose. Sob influência farmacológica do isoproterenol, o desempenho foi significativamente menor no grupo estenose aórtica, e o treinamento físico não melhorou essa resposta. Os mecanismos envolvidos na depressão da função do músculo hipertrofiado no grupo EAO poderiam estar relacionados à diminuição do número de miócitos, alteração no trânsito de cálcio, matriz extracelular, citoesqueleto e déficit energético (2,7,9,26). Os fatores determinantes da menor resposta ao isoproterenol seriam dependentes da dessensibilização do sistema β -adrenérgico, que ocorrem no músculo hipertrofiado e disfuncionante (36).

4.5 - Treinamento físico e sistema β -adrenérgico

O presente estudo mostrou que a estenose aórtica não implicou em redução da expressão proteica dos componentes β -adrenérgicos miocárdicos avaliados. Esses dados contrastam com outros trabalhos que apontam uma redução na densidade dos β -receptores, em condições de sobrecarga pressórica com função cardíaca preservada (38–42) ou falência (43); também foi verificada diminuição da AC na hipertrofia cardíaca (44) e da PKA na insuficiência (45). Nosso estudo também mostrou que a exposição ao treinamento físico não foi determinante para a modulação da expressão proteica em ratos saudáveis ou com disfunção ventricular, concordando com Moore e cols. (60) e se contrapondo aos resultados de outros autores (61). Embora não tenhamos avaliado os níveis de catecolaminas circulantes, esses β -agonistas são observados em altas concentrações na insuficiência cardíaca grave (87), condição funcional não observada nos animais utilizados nesse estudo. Como a hiperestimulação por catecolaminas é considerada o principal mecanismo da

dessensibilização do sistema β -adrenérgico na IC (87), podemos hipotetizar que a preservação dos níveis proteicos nos grupos EAo foi devido à provável manutenção do nível basal, ou próximo do basal, desses hormônios na circulação.

4.6 - Treinamento físico, sistema β -adrenérgico e função cardíaca

A proposta do presente estudo foi investigar se o desfecho do treinamento físico sobre a função cardíaca está associado à mudanças, em nível molecular, no sistema β -adrenérgico miocárdico. Embora o treinamento físico tenha atenuado a disfunção diastólica, avaliada *in vivo* e *in vitro*, os resultados da expressão proteica dos componentes β -adrenérgicos analisados nos permite hipotetizar que os níveis de expressão dessas proteínas, não têm associação com o desfecho positivo do TF na fase de relaxamento miocárdico. Contudo, como a função cardíaca sofre influência das alterações na sensibilidade dos β -receptores e na atividade das outras proteínas, AC e PKA, não podemos afirmar que a atenuação na função diastólica esteja completamente dissociada do sistema β -adrenérgico.

4.7 - Limitações do estudo

A técnica de Western Blot é amplamente utilizada na determinação de níveis proteicos em diversos tecidos; entretanto, o emprego isolado deste modelo de análise nos permitiu apenas concluir sobre o nível total de proteínas no tecido, sem qualquer inferência sobre a densidade proteica na membrana celular. Além disso, o anticorpo utilizado para mensurar a expressão da adenilato ciclase não tem especificidade para as isoformas miocárdicas dessa proteína. Outra limitação prende-se no fato de que não foram medidas as atividades de proteínas importante na

sinalização β -adrenérgica, adenilato ciclase e proteína quinase A, o que poderia fornecer informações relevantes sobre a integridade do sistema.

Embora seja frequentemente utilizado em estudos experimentais (3,81,88), o teste de esforço máximo progressivo possui algumas restrições, como a ausência de parâmetros funcionais e laboratoriais que estimem a intensidade do exercício durante o teste (frequência cardíaca, pressão arterial, consumo de oxigênio) (59); outro aspecto importante do método é que o animal pode realizar esforço submáximo ou supramáximo, visto que a determinação da exaustão é estrita ao investigador, portanto, subjetiva.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a exposição ao treinamento físico atenuou a disfunção diastólica e não alterou os níveis proteicos dos componentes do sistema β -adrenérgico miocárdico, que não se modificaram com o processo de remodelação cardíaca.

REFERÊNCIAS

4. REFERÊNCIAS

1. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. 1982 Jun;65(7):1446–50.
2. Muhl C, Dassen WRM, Kuipers H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth. Heart J*. 2008 Apr;16(4):129–33.
3. 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 Jan;94(1):62–70.
4. Urhausen A, Kindermann W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. *Sports Med*. 1999 Oct;28(4):237–44.
5. Ventura-Clapier R, Mettauer B, Bigard X. Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure. *Cardiovasc. Res*. 2007 Jan 1;73(1):10–8.
6. Elahi M, Mahmood M, Shahbaz A, Malick N, Sajid J, Asopa S, et al. Current concepts underlying benefits of exercise training in congestive heart failure patients. *Curr. Cardiol. Rev*. 2010 May;6(2):104–11.
7. Cohn JN, Ferrari R SN. 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.
8. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol*. Elsevier Inc.; 2003 Jan;65(1):45–79.
9. Frey N1 OE. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003 Jan;65:45–79.
10. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003 Oct 14;100(21):12355–60.
11. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2007 Apr;34(4):255–62.
12. 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. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 1999 Jan;33(1):60–5.
13. Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 1997 Sep;30(9):1135–44.
 14. Bregagnollo EA, Rodrigues MA, Montenegro MR, Curi PR, Tucci PJ. [Temporal evolution of structural and functional parameters of cardiac hypertrophy induced in Wistar rats by abdominal aorta constriction]. *Arq. Bras. Cardiol.* 1986 Jan;46(1):9–17.
 15. Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am. Heart J.* 1992 Sep;124(3):700–9.
 16. Rodrigues MA, Bregagnollo EA, Montenegro MR, Tucci PJ. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int. J. Cardiol.* 1992 May;35(2):253–7.
 17. 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 Sep;90(3):1410–22.
 18. 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 Apr;84(4):304–8.
 19. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. [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 Mar;84(3):225–32.
 20. 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 Apr 12;117(1):109–14.
 21. 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 supralvalvar aortic stenosis. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007 Feb;88(2):225–33.
 22. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, Padovani CR, Aragon FF CA. O Bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina Atenua a Remodelação Cardíaca de Ratos Submetidos a Estenose Aórtica. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(4):304–8.

23. 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 May 15;91(10):2642–54.
24. Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF, et al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(8):3887–905.
25. 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 Jul;30(7):801–11.
26. 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 Jan;9(10):e110020.
27. Rengo G. The adrenergic system in cardiovascular pathophysiology: a translational science point of view. *Front. Physiol*. 2014 Jan;5(356):356.
28. Saucerman JJ, McCulloch AD. Cardiac beta-adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2006 Oct;1080:348–61.
29. Barros Rde A, Okoshi MP CA. Beta-adrenergic pathway in healthy and hypertrophied hearts. *Arq Bras Cardiol*. 1999;72(5):641–56.
30. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 2002 Nov;27(7):683–90.
31. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol. Elsevier Inc.*; 2009 Nov 3;54(19):1747–62.
32. Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Kaumann AJ. Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. *Br. J. Pharmacol*. 2002 May;136(2):217–29.
33. Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*. 1988 May 12;333(6169):129–34.
34. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198–205.

35. Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation*. 1997 Jan 7;95(1):169–75.
36. Najafi A, Sequeira V, Kuster DWD, van der Velden J. β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur. J. Clin. Invest.* 2016 Apr;46(4):362–74.
37. Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation*. 1996 Nov 1;94(9):2285–96.
38. Galinier M, Sénard JM, Dréan G, Valet P, Glock Y, Dalous P, et al. [Myocardial beta-adrenergic receptors and left ventricular hypertrophy induced by pressure overload in man]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 1992 Aug;85(8):1113–7.
39. Guzzetti S, Mennini T, Cagnotto A, Di Biasi P, Scrofani R, Mezzetti S, et al. Myocardial beta-adrenergic and muscarinic receptor density in cardiac pressure or volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998 Oct;30(10):2095–102.
40. Scholz PM, Upsher ME, Eliades D, Kedem J, Weiss HR. Alterations in the regional beta adrenergic system in experimental left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 1990 Jan;24(1):65–71.
41. Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, Koch WJ. The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):402–7.
42. Limas C, Limas CJ. Reduced number of beta-adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978 Jul 28;83(2):710–4.
43. Tse J, Huang MW, Leone RJ, Weiss HR, He YQ, Scholz PM. Down regulation of myocardial beta1-adrenoceptor signal transduction system in pacing-induced failure in dogs with aortic stenosis-induced left ventricular hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 2000 Feb;205(1-2):67–73.
44. Hu C-L, Chandra R, Ge H, Pain J, Yan L, Babu G, et al. Adenylyl cyclase type 5 protein expression during cardiac development and stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009 Nov;297(5):H1776–82.
45. Han YS, Arroyo J, Ogut O. Human heart failure is accompanied by altered protein kinase A subunit expression and post-translational state. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013 Oct 1;538(1):25–33.
46. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2015 Dec;25 Suppl 3:1–72.

47. Medeiros A, Rolim NPL, Oliveira RSF, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, et al. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J. Appl. Physiol.* 2008 Jan;104(1):103–9.
48. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 100(2):126–31.
49. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):162–84.
50. Sager K. Senior Fitness-For the Health of It. *Phys. Sportsmed.* 1983 Oct;11(10):31–6.
51. Ichige MHA, Santos CR, Jordão CP, Ceroni A, Negrão CE, Michelini LC. Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. *J. Physiol.* 2016 Jul 22;
52. 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 Aug 20;128(8):873–934.
53. Kiliszek M, Mackiewicz U, Maczewski M, Burzynska B. Molecular evidence that exercise training has beneficial effects on cardiac performance. *Ann. Transl. Med.* 2016 Jun;4(11):228.
54. Passino C, Severino S, Poletti R, Piepoli MF, Mammini C, Clerico A, et al. Aerobic training decreases B-type natriuretic peptide expression and adrenergic activation in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006 May 2;47(9):1835–9.
55. Brum PC, Bacurau AVN, Medeiros A, Ferreira JCB, Vanzelli AS, Negrão CE. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Brazilian J. Med. Biol.* 2011 Sep;44(9):827–35.
56. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.* 2010 Apr;61(4):269–80.
57. Kanakis C, Hickson RC. Left ventricular responses to a program of lower-limb strength training. *Chest.* 1980 Oct;78(4):618–21.
58. MacDonnell SM, Kubo H, Crabbe DL, Renna BF, Reger PO, Mohara J, et al. Improved myocardial beta-adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation.* 2005 Jun 28;111(25):3420–8.
59. Brunjes DL, Kennel PJ, Christian Schulze P. Exercise capacity, physical activity, and morbidity. *Heart Fail. Rev.* 2017 Jan 16;

60. Moore RL, Riedy M, Gollnick PD. Effect of training on beta-adrenergic receptor number in rat heart. *J. Appl. Physiol.* 1982 May;52(5):1133–7.
61. Barbier J, Rannou-Bekono F, Marchais J, Berthon P-M, Delamarche P, Carré F. Effect of training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004 Jun;36(6):949–54.
62. Hammond HK, Ransnas LA, Insel PA. Noncoordinate regulation of cardiac Gs protein and beta-adrenergic receptors by a physiological stimulus, chronic dynamic exercise. *J. Clin. Invest.* 1988 Dec;82(6):2168–71.
63. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc. Res.* 2008 May 1;78(2):385–94.
64. 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 Jan;6:38.
65. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J. Appl. Physiol.* 2000 Oct;89(4):1445–54.
66. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000 Oct;279(4):H1534–9.
67. Ono K, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Sakata Y, Nishikawa N, et al. Echo doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):109–17.
68. 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 Sep 1;94(5):1109–17.
69. Cantor EJF, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005 May;38(5):777–86.
70. 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 Jun;284(6):H2242–6.
71. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am. J. Med. Sci.* 2000 Oct;320(4):244–8.

72. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DHS, Luvizotto R de AM, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J. Cell. Physiol.* 2011 Nov;226(11):2934–42.
73. Layland J, Kentish JC. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am. J. Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):H9–H18.
74. 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 May 11;29(3):246–52.
75. 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 Jun;87(6):426–31.
76. 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 Jan;2016:8695716.
77. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am. J. Med.* 2001 May 7;110 Suppl:37S–46S.
78. Cohen MC, Stafford RS, Misra B. Stress testing: national patterns and predictors of test ordering. *Am. Heart J.* 1999 Dec;138(6 Pt 1):1019–24.
79. Araújo CGS. Teste de exercício: terminologia e algumas considerações sobre passado, presente e futuro baseadas em evidências. *Rev Bras Med Esporte.* 2000;6(3):77–84.
80. Kraus WE. Exercise in Heart Failure. In: Mann DL, editor. *Heart Fail.* 2nd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2010. p. 839–40.
81. Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Bonomo C, Campos DHS, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015 Jan;36(1):61–74.
82. Naylor M, Vasan RS. Preventing heart failure: the role of physical activity. *Curr. Opin. Cardiol.* 2015 Sep;30(5):543–50.
83. Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, et al. Heart failure after long-term supravalvular aortic constriction in rats. *Am. J. Hypertens.* 2005 Feb;18(2 Pt 1):202–12.
84. Chaudhri BB, del Monte F, Harding SE, Hajjar RJ. Gene transfer in cardiac myocytes. *Surg. Clin. North Am.* 2004 Mar;84(1):141–59, ix–x.

85. Hidalgo C, Saripalli C, Granzier HL. Effect of exercise training on post-translational and post-transcriptional regulation of titin stiffness in striated muscle of wild type and IG KO mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014 Jun 15;552-553:100–7.
86. Høydal MA, Stølen TO, Kettlewell S, Maier LS, Brown JH, Sowa T, et al. Exercise training reverses myocardial dysfunction induced by CaMKII δ C overexpression by restoring Ca²⁺ homeostasis. *J. Appl. Physiol.* 2016 Jul 1;121(1):212–20.
87. White CM. Catecholamines and their blockade in congestive heart failure. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 1998 Apr 1;55(7):676–82.
88. Rossoni L V, Oliveira RAF, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2011 Dec;29(12):2349–58.