

TATIANE DE OLIVEIRA BARRETO

Remodelamento do proteoma cardíaco em resposta ao  
treinamento aeróbico em um modelo de hipertrofia  
cardíaca.

Belo Horizonte – MG  
2017

TATIANE DE OLIVEIRA BARRETO

## Remodelamento do proteoma cardíaco em resposta ao treinamento aeróbico em um modelo de hipertrofia cardíaca.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia - Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

Co-orientadora: Prof. Dra. Suely Gomes de Figueiredo

Belo Horizonte – MG  
2017



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE TATIANE DE OLIVEIRA BARRETO.**  
 Aos dez dias do mês de fevereiro de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Remodelamento do proteoma cardíaco em resposta ao exercício físico em um modelo de hipertrofia cardíaca", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jader dos Santos Cruz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Suely Gomes de Figueiredo Co-orientadora (Universidade Federal do Espírito Santo), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mariana Torquato Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Danusa Dias Soares (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Patrícia Brum (Universidade de São Paulo - USP), aprovada; Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2017.

  
 Dra. Suely Gomes de Figueiredo Co-orientadora (Universidade Federal do Espírito Santo)

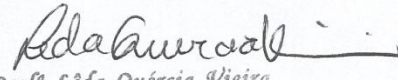
  
 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

  
 Dra. Mariana Torquato Magalhães (UFMG)

  
 Dra. Danusa Dias Soares (UFMG)

  
 Dra. Patrícia Brum (Universidade de São Paulo - USP)

  
 Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (UFMG)

  
 Prof. Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por estar sempre me abençoando, iluminando meus caminhos e guiando meus passos.

Ao meu marido e porto seguro, Daniel, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis dessa jornada, e por estar sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças para prosseguir.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo amor incondicional, incentivo, amizade e por sempre estarem presentes. Sem eles nada seria possível!

Aos amigos do LAMEX pela amizade e por proporcionarem momentos de troca de conhecimentos e de muita aprendizagem. Em especial, agradeço a minha aluna de iniciação científica e amiga, Mariana Rabelo e aos amigos Leidiane, Flávio, Rodrigo, Felipe e João que me ajudaram na execução desse trabalho.

Aos colaboradores que foram fundamentais para a execução dos experimentos, Vanessa Pinho e Albená, do Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória (Departamento de Morfologia – ICB/UFMG), Carolina Carvalho do Laboratório de Patologias das Leishmanioses (Departamento de Morfologia - ICB/UFMG), Helton do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo (Departamento de Fisiologia e Farmacologia – ICB/UFMG), professora Márcia Borges e Jaqueline do Laboratório de Proteômica do Serviço de Proteômica e Aracnídeos (Funed), Gabriella e Allan do Laboratório de Química de Proteínas (Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES), e ao Perales e André (FioCruz/RJ).

À minha co-orientadora Suely que mesmo a distância foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada por toda ajuda, orientação, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Jader Cruz pelos ensinamentos, apoio, oportunidades, paciência e amizade por todos esses anos.

E a todas as pessoas que ao longo dessa caminhada contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

## RESUMO

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio que resulta em um aumento da massa do coração e pode estar associada a um aumento no risco de morbidade e mortalidade. O treinamento aeróbio resulta em benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos, e por esse motivo tem sido utilizado como uma conduta não farmacológica na prevenção e tratamento desta patologia. Foi utilizada uma abordagem proteômica comparativa, por eletroforese em gel bidimensional (2D) acoplada à espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF), para investigar os efeitos do treinamento aeróbico no remodelamento do proteoma cardíaco, no ventrículo esquerdo de camundongos com hipertrofia cardíaca patológica induzida por isoproterenol. Camundongos C57Bl/6 foram divididos em quatro grupos experimentais: saudável sedentário (SS), saudável treinado (ST), isoproterenol sedentário (IS) e isoproterenol treinado (IT). Os animais dos grupos IS e IT receberam durante 10 dias consecutivos uma dose diária (45mg/kg/dia) de isoproterenol, a qual foi administrada via subcutânea. Todos os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo para definir a carga de treinamento e avaliar o desempenho físico individual. Os animais dos grupos ST e IT, foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio de intensidade moderada, na esteira, por um período de 8 semanas, e ao final deste período, todos os animais foram submetidos novamente ao teste de esforço máximo. A análise histológica do tecido cardíaco demonstrou integridade da arquitetura e das células do miocárdio dos animais saudáveis - SS e ST - com uma discreta hipertrofia no último grupo, evidenciando a indução da hipertrofia fisiológica pelo treinamento aeróbico. Nos animais que foram submetidos ao tratamento com isoproterenol - IS e IT - foi observada uma hipertrofia patológica no ventrículo esquerdo, com intensa desorganização das fibras e áreas de fibrose, sendo menos intensas no tecido dos animais do grupo que foi submetido ao treinamento aeróbico - IT. Estes resultados evidenciam a indução da hipertrofia patológica pelo tratamento com isoproterenol, bem como o efeito benéfico do treinamento aeróbico na hipertrofia patológica. Os animais sedentários com hipertrofia patológica apresentaram uma menor capacidade aeróbia, o que confirmou um efeito prejudicial da administração do isoproterenol no condicionamento desses animais. Já o treinamento aeróbio melhorou a capacidade aeróbia tanto dos animais saudáveis quanto dos animais com hipertrofia patológica,

o que confirma a importância do exercício físico na reabilitação cardíaca. O perfil proteico dos VE revelou diferença na expressão de 105 spots proteicos entre os grupos, e 58 proteínas foram identificadas e pertencem as seguintes classes funcionais: metabolismo energético, estresse oxidativo, proteínas de choque térmico e estruturais. A hipertrofia patológica modulou negativamente a expressão proteica das proteínas envolvidas no metabolismo energético, enquanto a hipertrofia fisiológica modulou positivamente a expressão dessas proteínas. O mesmo aconteceu nos animais com hipertrofia patológica em resposta ao treinamento aeróbio. Por outro lado, ambas as hipertrofias resultaram em um aumento na expressão de proteínas de choque térmico e estruturais. Duas proteínas identificadas – sarcalumenin e PP1 $\gamma$  - são importantes proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração, que em resposta ao treinamento aeróbico aumentam suas expressões e atuam na citoproteção cardíaca, sendo responsáveis pela melhora da função cardíaca e condicionamento dos animais com hipertrofia patológica. Diante disso, os resultados sugerem que o treinamento aeróbio induz um remodelamento do proteoma cardíaco na hipertrofia patológica que possibilita que ele seja utilizado como uma importante ferramenta de prevenção e tratamento dessa patologia.

Palavras-chave: hipertrofia patológica, hipertrofia fisiológica, proteoma, remodelamento, treinamento aeróbio, ventrículo esquerdo.

## ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is an adaptive process of the myocardium that results in an increase in heart mass and may be associated with an increased risk of morbidity and mortality. Aerobic training can promote cardiovascular, metabolic and autonomic benefits; therefore, it has been used as a non-pharmacological alternative in the prevention and treatment of this condition. A comparative proteomic approach, by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry (MALDITOF/TOF), was used to investigate the effects of aerobic exercise on cardiac proteome remodeling of pathological isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy in mice. C57Bl/6 mice were divided into four experimental groups: sedentary healthy (SH), trained healthy (TH), sedentary isoproterenol (SI) and trained isoproterenol (TI). The animals of the SI and TI groups received daily subcutaneous injection of isoproterenol for 10 consecutive days (45 mg/kg/day). All animals were submitted to a maximum treadmill stress test to determine the training load and assess individual physical performance. The animals of the TH and TI were submitted to a moderate-intensity training on the treadmill for eight weeks. After the training protocol, all animals were resubmitted to a maximum stress test. Histological analysis of the left ventricular myocardium demonstrated integrity of the architecture of the cardiac muscle and muscle cells in healthy animals - SH and TH - with a slight hypertrophy in the latter group, thus providing evidence that aerobic exercise training can induce physiological hypertrophy. In contrast, isoproterenol-treated mice - SI and TI - showed pathological hypertrophy in the left ventricle with severe myofiber disorganization and fibrosis areas, which was less severe in the tissue of animals of the group submitted to aerobic training - TI. Such results point to both the possibility of inducing pathological hypertrophy by isoproterenol and the beneficial effect of aerobic training on pathological hypertrophy. Sedentary animals with pathological hypertrophy had lower aerobic capacity, which confirmed the detrimental effect of isoproterenol administration on the conditioning of these animals. Aerobic training improved the aerobic capacity of both healthy animals and animals with pathological hypertrophy, which confirms the importance of physical exercise in cardiac rehabilitation. The protein profile of the LV revealed a different expression of 105 protein spots between the groups, and 58 proteins were identified and belong to the following functional classes: energy metabolism, oxidative stress, heat shock and

structural proteins. Pathological hypertrophy negatively modulated the expression of proteins involved in energy metabolism, while physiological hypertrophy positively modulated the expression of the same proteins. The same could be observed in animals with pathological hypertrophy in response to aerobic training. However, both hypertrophies resulted in an increase in the expression of heat shock and structural proteins. Two of the identified proteins - sarcalumenin and PP1 $\gamma$  - are important for excitation-contraction coupling, which increase in expression in response to aerobic training and act in cardiac cytoprotection, being responsible for the improvement of the cardiac function and conditioning of the animals with pathological hypertrophy. Therefore, the results suggest that aerobic training induces the remodeling of the cardiac proteome in pathological hypertrophy, thus constituting an important instrument in treating and preventing this condition.

Keywords: aerobic training, left ventricle, pathological hypertrophy, physiological hypertrophy, proteome, remodeling.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do coração: câmaras cardíacas, veias, artérias e valvas.

Figura 2 – Principais componentes da maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca.

Figura 3 – Sistema de condução elétrica do coração.

Figura 4 – Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes.

Figura 5 – Transporte de cálcio, ativação dos miofilamentos e manuseio de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito.

Figura 6 – Ação dos agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no manuseio de cálcio e na maquinaria contrátil do músculo cardíaco.

Figura 7 – Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.

Figura 8 – Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica.

Figura 9 – Esquema representativo das vias de sinalização ativadas por mecanismos de transdução mecano-bioquímicos na hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica.

Figura 10 - Delineamento experimental

Figura 11 – Sequência de comandos no Software KS300 para determinação da deposição de colágeno no miocárdio.

Figura 12 – Fluxograma das etapas experimentais utilizadas para a análise proteômica.

Figura 13 – Valores obtidos para (A) massa do coração e (B) massa do ventrículo esquerdo ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 14 – Correlação obtida da massa do coração vs comprimento da tíbia ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 15 – Correlação obtida da massa do ventrículo esquerdo vs comprimento da tíbia ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 16 – Correlação obtida da massa do ventrículo esquerdo vs massa do coração ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 17 – Análise morfométrica da área total do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 18 – Análise morfométrica do diâmetro do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 19 – Análise morfométrica da espessura do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 20 – Corte Histológico representativo do coração de camundongos dos grupos saudável sedentário (A), saudável treinado (B), isoproterenol sedentário (C) e isoproterenol treinado (D). Coloração Hematoxilina e Eosina.

Figura 21 – Corte Histológico representativo de coração de camundongos dos grupos saudável sedentário (A), saudável treinado (B), isoproterenol sedentário (C) e isoproterenol treinado (D). Coloração pelo Tricrômico de Gomori.

Figura 22 – Análise morfométrica da área de fibrose no miocárdio dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento.

Figura 23 - Acompanhamento da taxa de sobrevivência dos animais ao longo dos 10 dias de tratamento com isoproterenol e solução salina.

Figura 24 – Variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento com isoproterenol e solução salina.

Figura 25 – Variação da massa corporal dos animais no início (i) e final (f) do tratamento com isoproterenol e solução salina

Figura 26 – Variação da massa corporal dos animais no início (i) e final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 27 – Velocidade máxima atingida durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 28 – Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos saudável sedentário e isoproterenol sedentário durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 29 – Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos saudável treinado e isoproterenol treinado durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 30 – Delta da velocidade máxima atingida pelos animais durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 31 –  $VO_2$  de repouso realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 32 –  $VO_2$  máximo realizado durante exercício progressivo até a fadiga no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 33 – Parâmetros hemodinâmicos, (A) pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica, (C) pressão arterial média, no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento.

Figura 34 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo saudável sedentário.

Figura 35 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo saudável treinado.

Figura 36 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo isoproterenol sedentário.

Figura 37 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo isoproterenol treinado.

Figura 38 – Representação do géel de referência de cada grupo.

Figura 39 – Análise de fatores dos géis dos grupos experimentais.

Figura 40 – Gel bidimensional representativo, mostrando a localização dos spots que apresentaram diferença de volume entre os grupos SS, ST, IS e IT.

Figura 41 – Classificação funcional das proteínas identificadas.

Figura 42 – Rede de interações das proteínas identificadas e clusterização de acordo com suas classificações funcionais.

Figura 43 – Expressão proteica da Sarcalumenin no ventrículo esquerdo obtido de animais dos grupos saudável sedentário, saudável treinado, isoproterenol sedentário e isoproterenol treinado.

Figura 44 – Expressão proteica da PP1- $\gamma$  no ventrículo esquerdo obtido de animais dos grupos saudável sedentário, saudável treinado, isoproterenol sedentário e isoproterenol treinado.

Figura 45 – Figura ilustrativa da ação da PP1- $\gamma$  e da Sarcalumenin (Sar) no acoplamento excitação-contração do coração.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de spots observados no 2DE/SDS-PAGE para cada replicata biológica.

Tabela 2 – Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos.

Tabela 3 – Identidade dos “spots” proteicos diferentemente expressos entre os grupos SS, ST, IS e IT, e classificação funcional das proteínas identificadas.

Tabela 4 – Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e saudável treinado (ST).

Tabela 5 – Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e isoproterenol sedentário (IS).

Tabela 6 – Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável treinado (ST) e isoproterenol sedentário (IS).

Tabela 7 – Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos isoproterenol sedentário (IS) e isoproterenol treinado (IT).

Tabela 8 – Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável treinado (ST) e isoproterenol treinado (IT).

Tabela 9 – Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e isoproterenol treinado (IT).

# SUMÁRIO

## I. REVISÃO DE LITERATURA

1. FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR .....	16
1.1 Estrutura e função do coração.....	16
1.2 Microestrutura contrátil do tecido cardíaco.....	18
1.3 Excitabilidade do miocárdio.....	20
1.4 Canais iônicos e o potencial de ação.....	22
1.5 Acoplamento excitação-contração.....	24
1.6 Estimulação $\beta$ -adrenérgica.....	26
2. HIPERTROFIA CARDÍACA.....	29
2.1 O uso de agonistas dos receptores $\beta$ -adrenérgicos e a indução da hipertrofia cardíaca.....	35
3. EXERCÍCIO FÍSICO.....	37
3.1 Exercício físico e adaptações cardiovasculares.....	39
3.2 Treinamento físico no processo da reabilitação cardíaca.....	40
3.3 Benefícios do treinamento físico e ativação das cascatas de sinalização da hipertrofia fisiológica em um cenário de doenças cardíacas.....	41
4. PROTEÔMICA.....	42

## II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. JUSTIFICATIVA.....	46
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48

## III. METODOLOGIA

1. GRUPO EXPERIMENTAL.....	50
2. MENSURAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	51
3. ANÁLISES DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	52
4. ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	52
4.1 Análise morfométrica.....	52
4.2 Avaliação da fibrose tecidual.....	53
5. ANÁLISE PROTEÔMICA.....	54
5.1 Obtenção do extrato proteico do ventrículo esquerdo.....	54
5.2 Eletroforese bidimensional.....	55
5.2.1 Focalização isoeletrica.....	55
5.2.2 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas.....	55
5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	56
5.2.4 Aquisição, processamento e análise das imagens.....	56

5.2.5 Identificação das proteínas diferencialmente expressas.....	57
5.2.6 Pesquisa em banco de dados.....	58
5.2.7 Análises de bioinformática – interações proteína-proteína.....	58
6. WESTERN BLOTTING.....	59
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60

#### **IV. RESULTADOS**

1. PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS: CARACTERIZAÇÃO DA HIPERTROFIA.....	62
2. PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS: CARACTERIZAÇÃO DA HIPERTROFIA.....	64
3. EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ISOPROTERENOL NA SOBREVIDA E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	68
4. EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO NO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	70
5. EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ISOPROTERENOL E DO TREINAMENTO AERÓBICO NO CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS.....	70
6. EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ISOPROTERENOL E DO TREINAMENTO AERÓBICO NOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS DOS ANIMAIS.....	74
7. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL PROTEICO DO VE DE ANIMAIS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	75
7.1 Identificação dos spots proteicos com diferentes intensidades.....	84

#### **V. DISCUSSÃO.....101**

#### **VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....114**

#### **VII. REFERÊNCIAS.....117**

## **I. REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. FISILOGIA CARDIOVASCULAR

### 1.1 Estrutura e função do coração

O sistema circulatório é composto por dois circuitos completamente separados de sangue (oxigenado e desoxigenado) e serve para transportar e distribuir substâncias essenciais aos tecidos e remover os produtos provenientes do metabolismo. Participa da regulação homeostática do organismo, contribuindo para o controle da temperatura, para a comunicação humoral através dos tecidos e para o ajuste do suprimento de oxigênio e nutrientes em diferentes situações fisiológicas.

O sistema cardiovascular é constituído por uma bomba - o coração - uma série de vasos de distribuição e de coleta, e por um extenso sistema de finos vasos que tornam possíveis trocas rápidas entre os tecidos e os canais vasculares.

O coração é composto por quatro câmaras bombeadoras, dois átrios (superiores) e dois ventrículos (inferiores) (Figura 1). O átrio e ventrículo direito fazem parte da circulação pulmonar enquanto o átrio e ventrículo esquerdo são parte da circulação sistêmica. A espessura da parede de cada uma das câmaras é diretamente relacionada com a sua função. Os ventrículos, que desenvolvem pressões maiores, apresentam parede consideravelmente mais espessa que as dos átrios que desenvolvem baixas pressões. O ventrículo esquerdo, responsável pela alta pressão da circulação sistêmica, apresenta parede mais espessa que a do ventrículo direito, que não necessita desenvolver pressão muito elevada para bombear o sangue pela circulação pulmonar.

O funcionamento cardíaco correto depende da eficiência das quatro valvas cardíacas, responsáveis por separar suas câmaras (Figura 1), duas entre átrios e ventrículos (valvas atrioventriculares) e duas nas vias de saída dos ventrículos (valvas pulmonar e aórtica).



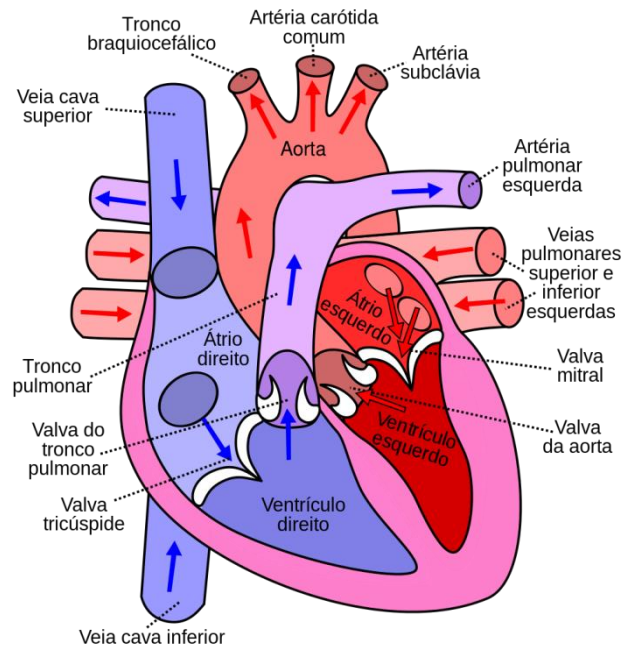


Figura 1 – Estrutura do coração: câmaras cardíacas, veias, artérias e valvas.  
(www.ideiasmodernas.com – acessado em 21/07/2016)

Na margem superior direita do coração está localizada a veia cava, que direciona o sangue vindo dos tecidos para o átrio direito, e na margem superior esquerda está a artéria pulmonar que recebe o sangue do ventrículo direito e o conduz para os pulmões. Entre esses vasos, encontra-se a artéria aorta que está diretamente conectada ao ventrículo esquerdo e leva o sangue para os tecidos. Lateralmente à aorta estão as veias pulmonares que direcionam o sangue vindo dos pulmões para o átrio esquerdo (Figura 1) (Fuster et al.,1998).

Na circulação pulmonar, o sangue venoso – desoxigenado - chega ao átrio direito pela veia cava superior e inferior, e flui pelo ventrículo direito - atravessando a valva atrioventricular tricúspide - que bombeia o sangue sequencialmente para a artéria pulmonar - atravessando a valva semilunar pulmonar - para as artérias menores e para capilares pulmonares, onde ocorre a liberação de  $\text{CO}_2$  e captação de  $\text{O}_2$ . Deste ponto, o sangue arterial – oxigenado - flui pelas veias pulmonares, retornando ao átrio esquerdo e logo depois ao ventrículo esquerdo - atravessando a valva tricúspide mitral. Já na circulação sistêmica, o sangue arterial proveniente do ventrículo esquerdo, é bombeado para a aorta - atravessando a valva semilunar aórtica - e segue para um sistema de artérias de distribuição, com término nos diversos órgãos da circulação sistêmica. Em cada órgão, as artérias se dividem em numerosas arteríolas e em seguida em capilares, onde o oxigênio e outros

metabólitos fluem através da parede dos capilares para o espaço extracelular. Produtos do metabolismo celular, por outro lado, passam para o fluido extracelular e posteriormente para o sangue. Em seguida, o sangue venoso é coletado por um sistema de vênulas e veias, que transportam o sangue de volta ao coração, através das veias cavas (Fuster et al.,1998).

## **1.2 Microestrutura contrátil do tecido cardíaco**

As propriedades mecânicas da célula muscular se devem a um especializado sistema de membranas e compartimentos intracelulares, organizados de forma a permitir uma comunicação sincronizada entre as partes da célula.

As células musculares apresentam um sistema contrátil organizado, formando uma estrutura repetitiva, o sarcômero, que é considerado a unidade contrátil básica do músculo. O sarcômero é limitado por duas linhas Z, entre as quais existem regiões claras e escuras, denominadas bandas I e A, respectivamente. A banda I é composta por filamentos finos que se ligam a linha Z e a banda A por filamentos finos e grossos. Na porção lateral da unidade sarcomérica os filamentos grossos e finos estão sobrepostos, e na região central são encontrados somente filamentos grossos, essa última região, localizada no meio da banda A, é chamada banda H (Figura 2).

## Organização da fibra muscular

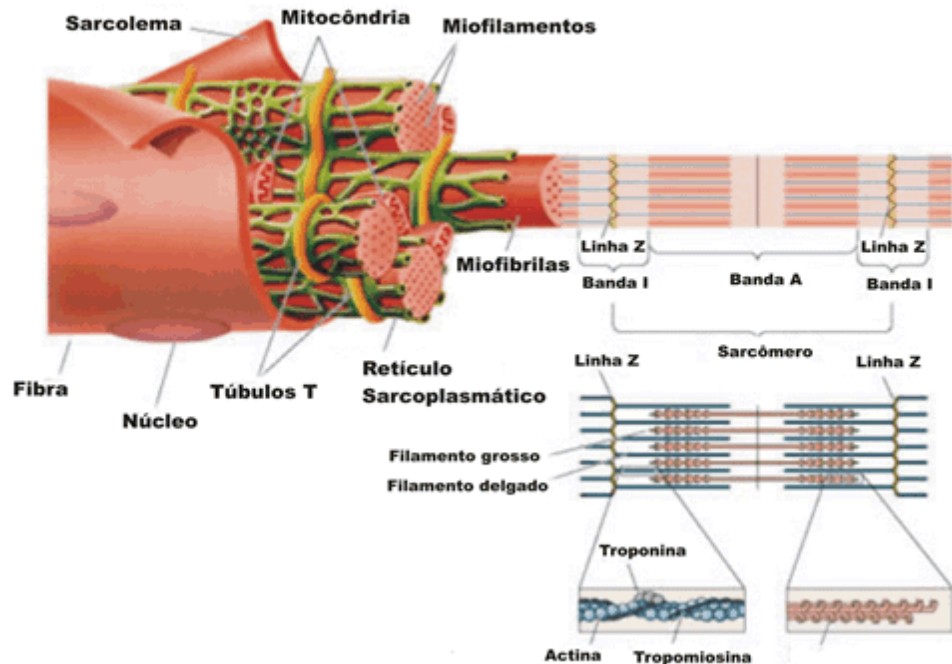


Figura 2 – Principais componentes da maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca (www.sobiologia.com.br – acessado em 28/07/2016).

A miosina e a actina, principais proteínas presentes no sarcômero, interagem entre si, favorecendo a ocorrência da contração. Os filamentos finos são constituídos de actina, tropomiosina e troponina (do tipo C, I e T), e os filamentos grossos são constituídos pela miosina (Stenger & Spiro, 1961; Katz, 1992).

A miosina apresenta duas partes estruturais, uma cauda, que forma os filamentos grossos e a cabeça que possui o sítio de hidrólise do ATP (ATPase), o qual interage com sítios de ligação da actina. A interação miosina-actina ativa a ATPase que hidrolisa ATP com consequente liberação de energia para à contração.

Os filamentos de actina apresentam uma organização complexa com outras proteínas e são sustentados pela estrutura fibrilar da tropomiosina, que tem como função estruturar e bloquear os sítios de interação actina-miosina. Ancorado a estrutura fibrilar da tropomiosina há uma organizada estrutura de diferentes troponinas, as quais possuem funções distintas. A troponina T (TnT) ancora-se na cadeia de tropomiosina e ancorada a ela está a troponina C (TnC) que possui sítios de ligação para cálcio e a troponina I (TnI), que cobre o sítio de interação da actina com a miosina (Schaub et al., 1998; Morimoto, 2008).

Em repouso, quando a concentração de cálcio intracelular é baixa (em torno de  $10^{-7}M$ ) os sítios de ligação da TnC ficam livres e assim a TnI forma um complexo com a actina e TnT, reduzindo a afinidade da actina pela miosina e mantendo a tropomiosina em uma posição que bloqueia o sítio de ligação da actina para a formação das pontes cruzadas. O desencadeamento da geração da contração é iniciado por um estímulo elétrico e resulta em um aumento na  $[Ca]_i$  ( $10^{-6}$ ~ $10^{-5}M$ ) e sua ligação com a TnC, o que resulta conseqüentemente em um aumento na ligação da TnI com a TnC, que alivia a inibição sobre a actina e leva ao deslocamento da tropomiosina - causado pela TnT - que desbloqueia os locais ativos da actina, garantindo assim a formação das pontes cruzadas - interação actina-miosina (Bers, 2008). O encurtamento do músculo cardíaco durante a contração é dado pelo deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos (Stenger & Spiro, 1961; Katz, 1992).

As proteínas que realmente realizam a atividade contrátil são actina e miosina, sendo chamadas proteínas contráteis, enquanto tropomiosina e troponina modulam sua interação, e são chamadas proteínas moduladoras da contração. O restante da célula cardíaca é densamente ocupada por mitocôndrias responsáveis por suprir o tecido com energia suficiente para realizar o bombeamento vigoroso e contínuo de sangue.

### **1.3 Excitabilidade do miocárdio**

O ciclo cardíaco - período entre o início de um batimento cardíaco até o início de um novo - é dividido em duas fases: a contração, denominada de sístole (quando ocorre a ejeção de sangue para a circulação) e o relaxamento, denominado de diástole (quando o coração se enche de sangue). A funcionalidade do coração é regulada e mantida por um sistema especializado em originar e conduzir o estímulo elétrico - constituído por um tecido muscular modificado especializado - o qual permite regular a força e a frequência dos batimentos cardíacos.

No átrio direito, nas proximidades da veia cava superior, situa-se o nodo sinusal ou nodo sinoatrial (NSA), que no coração normal, é o local de gênese da atividade elétrica cardíaca espontânea e por isso considerado o marca-passo cardíaco. A atividade autorrítima do coração é provida pelas células do marcapasso,

que geram potências de ação de forma cíclica e sem a necessidade de qualquer estímulo extrínseco.

Em situações fisiológicas, o ciclo elétrico iniciado pelas células marcapasso é conduzido pelos átrios – direito e esquerdo – através de fibras de condução atrial, causando a sístole atrial. O impulso elétrico segue então para o nodo atrioventricular (NAV) - também situado no átrio direito, próximo ao seio coronariano, na porção inferior do septo inter-atrial – onde sofre um retardo devido à baixa velocidade de condução dessa área. Em seguida, o estímulo continua através do Feixe de His - outro tecido especializado em condução que parte do NAV - que se estende para a musculatura ventricular dividindo-se em ramo direito e ramo esquerdo e forma uma extensa rede de condução intraventricular, as fibras de Purkinje, que despolarizam os ventrículos e iniciam a sístole ventricular (Figura 3). O Feixe de His e as fibras de Purkinje tem alta velocidade de condução que permite uma rápida condução do impulso por toda a extensão dos ventrículos, garantindo assim uma atividade contrátil sincronizada e maior eficiência da sístole ventricular (Katz, 1992).

Nesse complexo sistema, o NSA é responsável pelo início do sinal elétrico, e os demais componentes são responsáveis por conduzir tal sinal pelo coração.

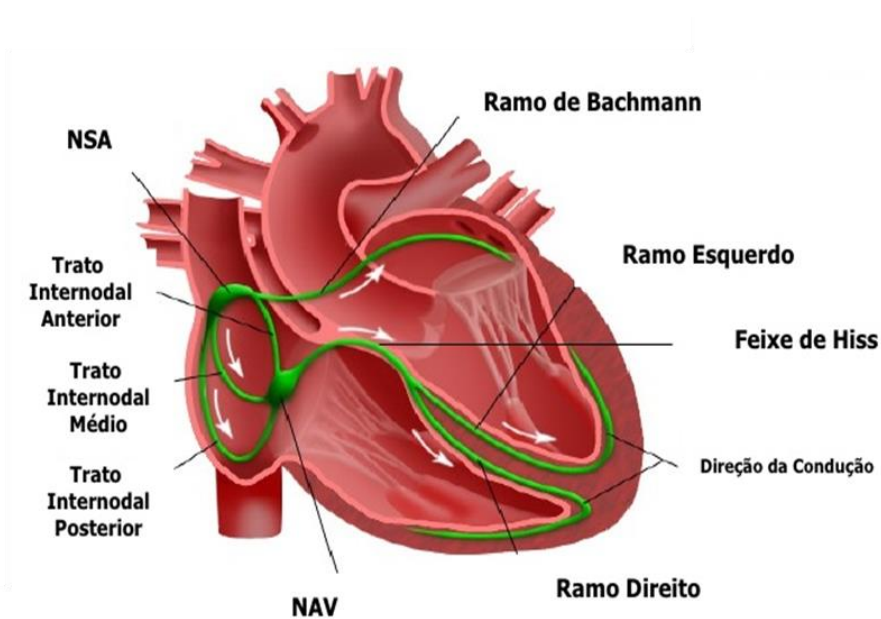


Figura 3 – Sistema de condução elétrica do coração.

([www.fisiologiaessencial.blogspot.com.br](http://www.fisiologiaessencial.blogspot.com.br) – acessado em 21/07/2016)

## 1.4 Canais iônicos e o potencial de ação

A fisiologia contrátil da célula cardíaca se deve à movimentação de íons através do sarcolema, que permite que ocorram mudanças no potencial de repouso da célula cardíaca, desta forma favorecendo a ocorrência da contração celular, decorrente da geração do potencial de ação (PA) (Hille, 2001).

O fluxo de íons através dos canais permite que estruturas especializadas dentro das células sejam ativadas e ocorra a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. O cálcio liberado ativa a maquinaria contrátil da célula, que de forma cooperativa, resulta na contração celular. O processo contrátil é finalizado pela recapturação do cálcio por sistemas especializados, os quais permitem que a contração celular seja encerrada.

Uma elaborada sequência de abertura e fechamento de canais iônicos resulta em mudanças no potencial elétrico através da membrana plasmática que, dependendo da magnitude, pode desencadear o potencial de ação (PA). O PA é caracterizado por uma alteração transitória no potencial transmembrana chegando a valores positivos e retornando posteriormente ao potencial de repouso. Diferentes estímulos, como os elétricos, mecânicos e químicos podem alterar o potencial de repouso da membrana para um valor crítico, denominado limiar, que resulta em um potencial de ação (Aidley, 1998).

O potencial de ação do coração é dividido em 5 fases (Figura 4) (Nerbonne & Kass, 2005):

Fase 0 - fase de despolarização: ocorre uma rápida despolarização da célula cardíaca, caracterizada pela abertura maciça dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) - resulta no influxo rápido de íons de  $\text{Na}^+$  para o meio intracelular e no desencadeamento do potencial de ação – e início da abertura do componente rápido da corrente transitória de saída de potássio (It<sub>of</sub>).

Fase 1 – fase de repolarização inicial: nessa fase contribuem de forma mais ativa a It<sub>of</sub> e também ocorre a inativação dos Nav. Devido a despolarização ocorrida na fase 0, tem início a ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CavL). A entrada do cálcio por estes canais é responsável pela ativação da maquinaria contrátil da célula.

Fase 2 – fase de platô: a ativação da corrente de cálcio iniciada na fase 1 é mantida na fase 2 junto com a inativação da It<sub>of</sub>, o que mantém o potencial transmembrana

despolarizado - característica principal do platô no PA cardíaco. Contudo, outros canais de potássio dependentes de voltagem com uma cinética de ativação mais lenta (IKs) começam a ser ativados.

Fase 3 – fase de repolarização final: a inativação da corrente de cálcio e o aumento na condutância ao potássio promovida pelas correntes de potássio lentas contribuem para o repolarização do PA. Além disso, próximo ao final de repolarização, já com o potencial de membrana em valores negativos, os canais de potássio retificadores de entrada (IK1) aumentam sua condutância contribuindo ainda mais para a repolarização.

Fase 4 - potencial de repouso da célula: grande parte dos canais dependentes de voltagem estão fechados e somente contribuem ativamente os IK1 e os canais de potássio sensíveis a ATP.

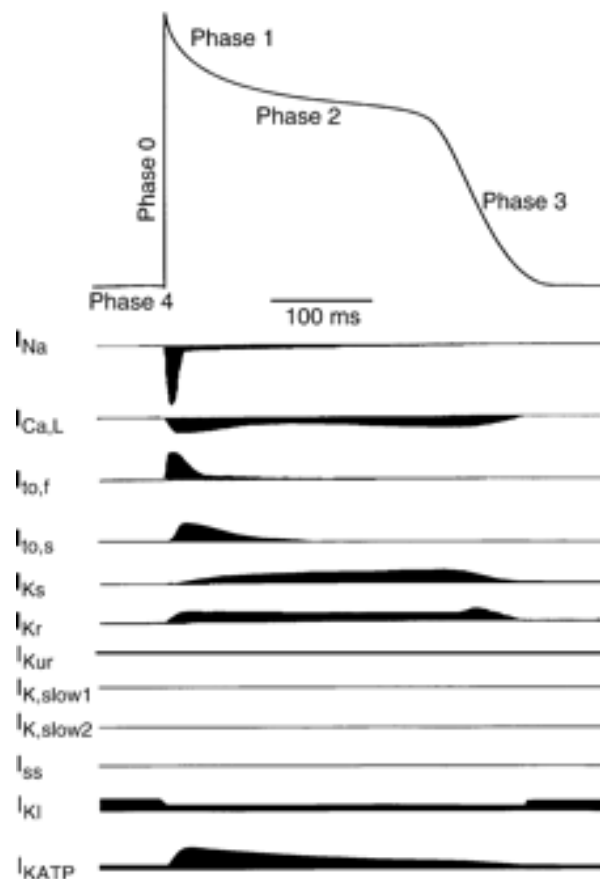


Figura 4 – Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes. Fases do potencial de ação cardíaco e as principais correntes envolvidas (traçados inferiores) em cada fase (Nerbonne e Kass, 2005).

O fluxo de íons através dos canais dependentes de voltagem além de regular os batimentos cardíacos através do potencial de ação, também são responsáveis pela despolarização do NSA e sua consequente atividade de marca-passo.

### **1.5 Acoplamento excitação-contração**

O acoplamento excitação-contração (AEC) (Figura 5), é composto por um conjunto de mecanismos que são desencadeados pela excitação elétrica do miócito, gerada pelo potencial de ação, que dispara a maquinaria contrátil e promove a contração. O acoplamento entre os processos de excitação e contração dependem basicamente dos íons de cálcio, que tem papel de mensageiro (carreador de sinal), que em resposta a excitação elétrica ativam o processo contrátil (revisado por Bers, 2002; Iribe & Kohl, 2008).

Os túbulos T (túbulos transversos) são invaginações irregulares do sarcolema que permitem que o mesmo chegue até o interior da fibra cardíaca. Sua principal função é aproximar o sarcolema das proteínas contráteis e organelas intracelulares - principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) - o que é especialmente importante devido as grandes dimensões da células cardíaca e necessidade de transmissão extremamente rápida do estímulo elétrico por toda extensão celular.

O potencial de ação propagado na membrana sarcoplasmática chega até os túbulos T, ativando canais para cálcio do tipo L dependentes de voltagem, culminando no influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular. O aumento do cálcio intracelular ativa os receptores de rianodina (RyR) que permitem que o cálcio estocado no RS seja liberado em favor de seu gradiente eletroquímico - fenômeno conhecido como "liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ ". A entrada de cálcio pelos canais de cálcio de tipo L é uma chave molecular para gerar sinais químicos e elétricos essenciais para a fisiologia celular, pois provoca a liberação de mais cálcio do retículo sarcoplasmático (revisado por Bers, 2002; Cens et al., 2006).

A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua liberação do retículo sarcoplasmático aumentam a concentração do cálcio intracelular livre, ativando os miofilamentos e a maquinaria contrátil. Este íon liga-se à proteína TnC e, ao favorecer a interação TnC com a TnI, faz com que a TnI se desloque do sítio ativo da actina, possibilitando o deslocamento da tropomiosina e da troponina T (TnT), o que permite a interação



actina-miosina e a ativação da ATPase miosínica que hidrolisa ATP e leva a uma consequente liberação de energia necessária à contração (revisado por Bers, 2002).

Após a contração, para que ocorra o relaxamento, o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado por diferentes proteínas que são responsáveis por diminuir a concentração do cálcio intracelular, são elas: a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , e o uniporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisado por Bers, 2002; Bers, 2008).

A SERCA é uma bomba de cálcio responsável por cerca de 70 a 90% da recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado no processo de contração. Ela bombeia o íon do citosol para o lúmen do retículo sarcoplasmático, contra o gradiente de concentração e consequentemente com gasto de ATP. A SERCA apresenta aproximadamente 100kDa, possui 10 domínios transmembrana e um sítio que é alvo de uma fosfoproteína denominada fosfolambam (PLB), que regula sua atividade (revisado por Bers, 2002). A PLB é um inibidor endógeno da SERCA e sua fosforilação permite uma acelerada atividade da bomba e recaptura de cálcio. O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  é responsável por 7-20% da retirada de cálcio do citosol e o restante é recapturado pelos transportadores mitocondriais, ou é transportado para fora da célula pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema (revisado por Bers, 2002; Haghghi et al., 2004; Bers, 2008).

Cessado o estímulo elétrico, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  é findada, e a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  retorna para os valores basais, permitindo assim o relaxamento do miócito (revisado por Bers, 2002).

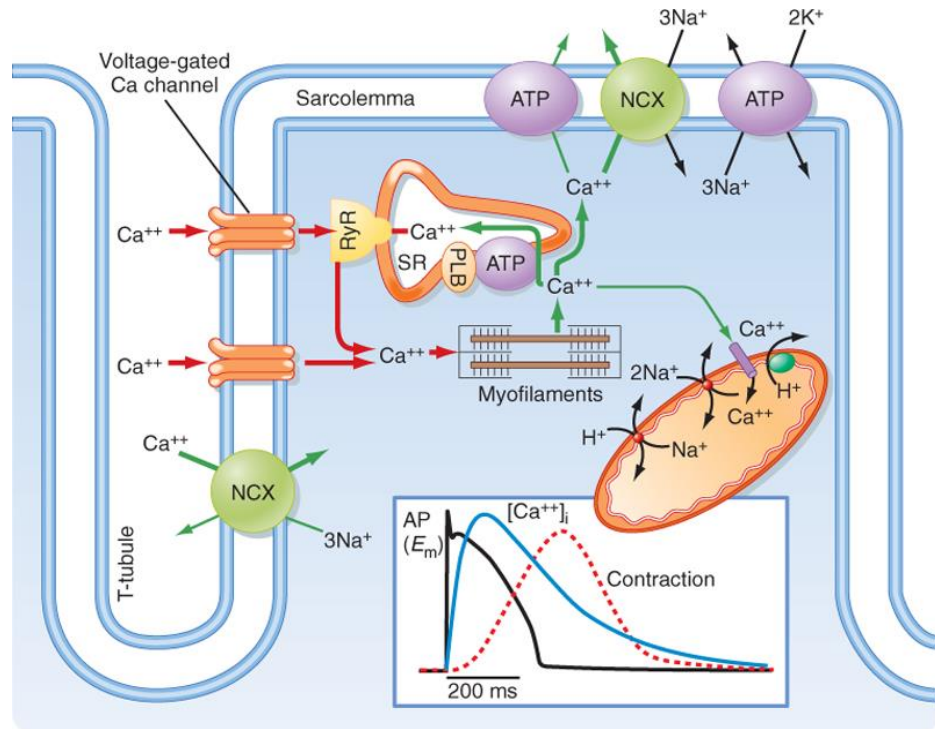


Figura 5 – Transporte de cálcio, ativação dos miofilamentos e manuseio de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito (Bers, 2002).

## 1.6 Estimulação $\beta$ -adrenérgica

O sistema nervoso autônomo (SNA) – dividido em sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP) – tem importante papel na manutenção e modulação de diversos processos fisiológicos.

A ativação dos receptores adrenérgicos (SNS) afeta a contratilidade miocárdica. O principal receptor adrenérgico (AR) encontrado nas células cardíacas é o do tipo  $\beta$ , e possivelmente, a grande maioria dos efeitos descritos para a ativação simpática no coração são devido à interação com este receptor, que tem como isoforma mais predominante a  $\beta_1\text{AR}$ , representando cerca de 75-80% dos  $\beta\text{AR}$  no miocárdio, seguida da isoforma  $\beta_2\text{AR}$  (15-18%) e  $\beta_3\text{AR}$  (2-3%) (Lympelopoulou et al., 2013).

Estes receptores estão acoplados à proteína G e possuem 7 domínios transmembrânicos (Grimm & Brown, 2010; Santulli et al., 2016). As proteínas G são heterotrímeras, constituídas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . No estado inativo, a  $G\alpha$  está acoplada a GDP, do lado interno da membrana plasmática. Quando ocorre uma estimulação com agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, este receptor sofre

mudança conformacional alostérica promovendo uma alteração alostérica também na proteína G. Esta libera o GDP e liga-se ao GTP, o que faz com que  $G\alpha$  se desligue do dímero  $\beta\gamma$ . A subunidade  $\alpha$  da proteína trimérica  $G_s$  ativa a adenilato ciclase que passa a sintetizar AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP. O AMPc é um segundo mensageiro que ativa a PKA, uma quinase tetramérica, que em sua forma inativa é formada por duas subunidades reguladoras (R) e duas catalíticas (C). Sua ativação se dá quando duas moléculas de AMPc se ligam de forma cooperativa a cada uma das subunidades R, causando um decréscimo de afinidade entre as porções catalíticas e reguladoras da quinase. Esta perda de afinidade leva a dissociação das partes, com a formação de um dímero da subunidade R, e dois monômeros das subunidades C, que agora ativos fosforilam substratos específicos da célula (Grimm & Brown, 2010; Bernstein et al., 2011; Santulli et al., 2016).

Os agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos são capazes de promover efeito inotrópico, cronotrópico e lusitrópico positivo no coração (Figura 6). O efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração) se dá por meio do aumento da entrada de cálcio no citosol cardíaco que acontece devido à fosforilação, causada pela PKA, de canais de cálcio do tipo L voltagem-dependentes e dos receptores de rianodina. Associado a este fato, também ocorre um aumento da frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo). Isso significa que mais cálcio entrará na célula durante o processo de acoplamento excitação-contração, porém mais cálcio terá que ser expulso em um menor período de tempo, pois quando se eleva a frequência cardíaca, o tempo total de contração e relaxamento diminui (efeito lusitrópico positivo). A diminuição de cálcio do citosol é beneficiada, em parte, pelo aumento da receptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, induzido pela fosforilação do fosfolambam pela PKA, aumentando assim a receptação de cálcio pela SERCA. A PKA fosforila também a troponina I, culminando em uma redução da afinidade da troponina C pelo cálcio. Este mecanismo auxilia as bombas de cálcio, colaborando para o relaxamento do músculo cardíaco (revisado por Bers, 2002; Grimm & Brown, 2010; Bernstein et al., 2011; Santulli et al., 2016).

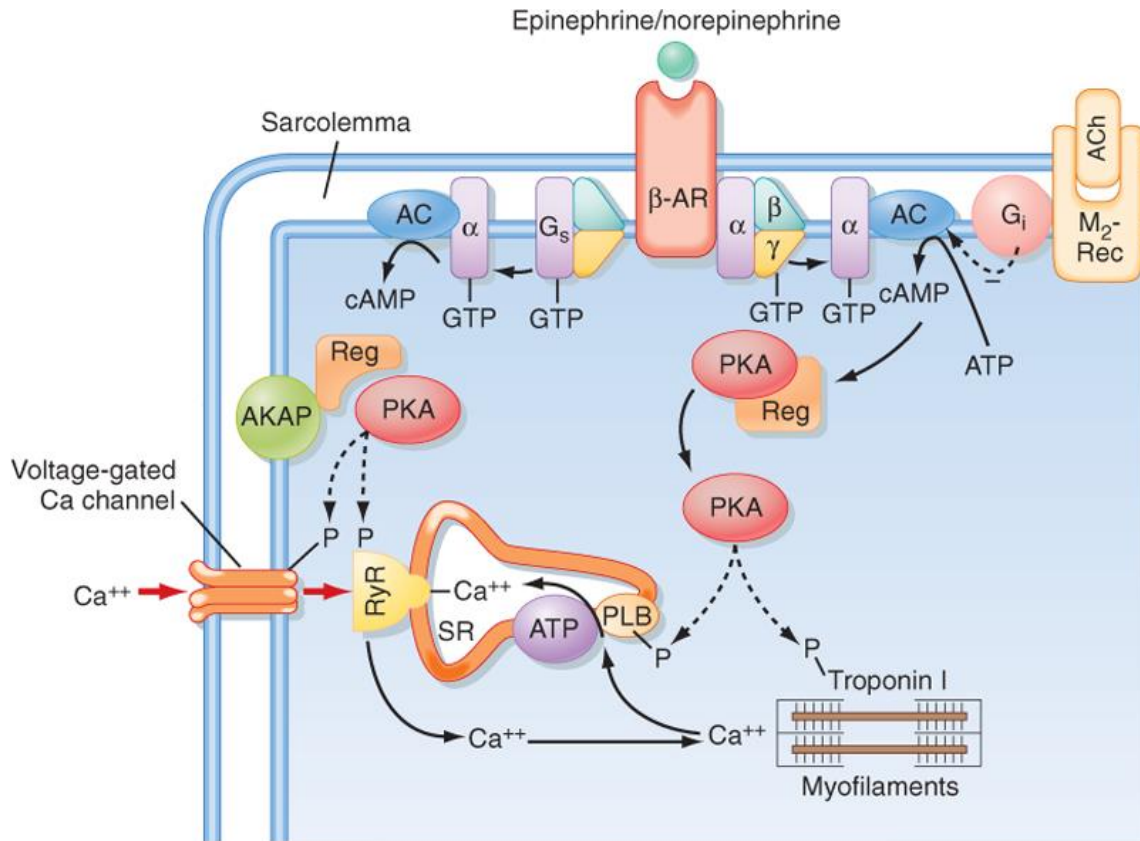


Figura 6 – Ação dos agonistas de receptores β-adrenérgicos no manuseio de cálcio e na maquinaria contrátil do músculo cardíaco (Bers, 2002).

## 2. HIPERTROFIA CARDÍACA

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio, em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. Esta adaptação pode se dar em resposta a um aumento da necessidade metabólica que impõe um aumento do débito cardíaco - como observado em resposta ao exercício físico - à indução hormonal - como em resposta ao isoproterenol - ou à um aumento de carga pressórica ou de volume em resposta adaptativa a condições patológicas - como na hipertensão arterial. O resultado desse aumento de trabalho do coração traduz-se num aumento da massa cardíaca devido a um aumento no tamanho dos miócitos e/ou aumento do estroma conjuntivo (Machida et al. 2000; Russel et al., 2000; Agrawal et al., 2010; Samak et al.,2016; Lazzeroni et al., 2016; Liu et al., 2016).

As hipertrofias consequentes a sobrecargas de pressão, de volume e devido ao treinamento físico, apresentam características fenotípicas e funcionais distintas, mas tem como fator patogênico comum o aumento da carga hemodinâmica imposta ao coração. Quando associada a condições fisiopatológicas, a hipertrofia cardíaca assume importância devido ao fato de que, sua presença associa-se ao aumento de risco de morbidade e mortalidade, tendo como consequência o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e a ocorrência de infarto do miocárdio, arritmias e morte súbita. Portanto a presença da hipertrofia constitui-se em um importante fator de risco cardiovascular (Mudd & Kass, 2008; Agrawal et al., 2010; Balakumar & Jagadeesh, 2010; Samak et al.,2016).

O crescimento cardíaco ou hipertrofia pode ser amplamente classificado como fisiológico (“normal”) ou patológico (“prejudicial”) (Figura 7). O crescimento patológico ocorre em resposta a um aumento no stress biomecânico induzido tanto por fatores extrínsecos (aumento de pressão e/ou volume em doenças como hipertensão e/ou disfunção nas válvulas cardíacas) ou em resposta a fatores intrínsecos (como o remodelamento cardíaco induzido por isquemia ou cardiomiopatias hipertróficas) e está associado com a perda de miócitos, substituição fibrótica, disfunção cardíaca e aumento do risco de insuficiência cardíaca e morte súbita. Por outro lado, o crescimento fisiológico do coração inclui o crescimento pós-natal normal, crescimento induzido pela gravidez e a hipertrofia induzida pelo exercício (Bernardo et al., 2010; Koeck et al., 2016; Lazzeroni et al.,2016; Liu et al., 2016; Samak et al.,2016; Shimizu &Minamino,2016).

O coração do atleta tem sido geralmente definido como um aumento benigno na massa cardíaca, associado a alterações morfológicas, que representam uma adaptação fisiológica ao treinamento crônico. Entretanto, alguns casos de morte súbita em atletas jovens têm sido amplamente questionados, mas este risco não está bem definido e é considerado baixo, sendo associado na maioria dos casos com problemas genéticos e não devido ao exercício. Diante disso, a hipertrofia cardíaca em resposta ao exercício continua sendo considerada de proteção e está associada a uma estrutura cardíaca normal, função cardíaca normal ou aumentada e não progride para a insuficiência cardíaca. (Barry et al., 2008; Abduch et al., 2009; Ieda & Fukuda, 2009; Du et al., 2010; Santacruz et al., 2014; Eijsvogels et al., 2016; Lazzeroni et al., 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

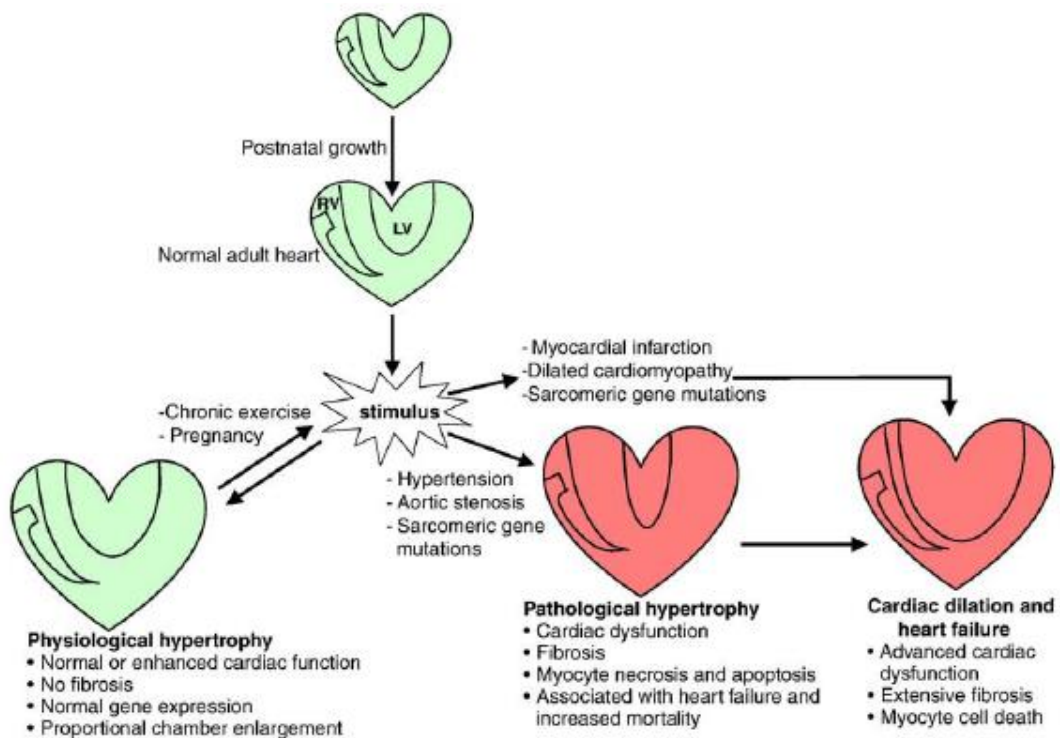


Figura 7 – Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica (Bernardo et al., 2010).

No desenvolvimento da hipertrofia patológica, os cardiomiócitos aumentam de tamanho devido ao aumento da síntese e incorporação de elementos contráteis, que está associado com um remodelamento que inclui também mudanças na rede de colágeno e na angiogênese. O crescimento do cardiomiócito excede a capacidade dos capilares em fornecer nutrientes e oxigênio, levando a hipóxia cardíaca e

consequente perda de miócitos e substituição fibrótica. Esse aumento na deposição de colágeno no miocárdio leva a um aumento da rigidez da câmara ventricular, dificultando o enchimento diastólico e predispondo ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca. O sistema renina-angiotensina-aldosterona tem sido considerado um forte estimulante da formação da matriz cardíaca, pois tanto a angiotensina II como a aldosterona estimulam a síntese de colágeno no miocárdio. Já no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica, provocada pelo exercício, as características do estroma conjuntivo não se alteram e, conseqüentemente, não ocorre prejuízo funcional (Machida et al. 2000; Russel et al., 2000; Bernardo et al., 2010; Ma et al., 2012; Koeck et al., 2016; Piek et al., 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

O coração passa por duas fases distintas durante o processo hipertrófico patológico, sendo a primeira chamada compensatória e a segunda, descompensada. Durante a fase compensatória, a resposta do coração ao estímulo hipertrófico corresponde a um aumento no trabalho realizado e, portanto não existe impactos negativos à sua morfologia e performance contrátil. Em contraste, a fase descompensada da hipertrofia cardíaca inicia-se logo após a fase compensada e é caracterizada pelo início dos processos de disfunção cardíaca e falência do órgão (Luethy et al., 1964; Shimizu & Minamino, 2016).

Além das alterações na expressão de proteínas contráteis, estruturais e relacionadas às vias metabólicas, o crescimento hipertrófico patológico do miocárdio apresenta também uma modificação no padrão de expressão de proteínas do programa fetal. As alterações moleculares observadas durante o desenvolvimento desse processo hipertrófico são similares àqueles observados durante o desenvolvimento fetal do coração, e, portanto a hipertrofia cardíaca patológica é frequentemente descrita como sendo acompanhada da reativação de genes fetais. Apesar da reativação deste programa gênico fetal ser apenas uma resposta adaptativa ao estresse, está claro que a expressão destes genes leva a mudanças mal-adaptativas da função cardíaca (Molkentin, 2004; Barry et al., 2008; Haberland et al., 2009; Moc et al., 2015; Samak et al., 2016).

Neste padrão fetal estão incluídos os genes que modificam a composição dos sarcômeros, como o aumento da proporção da isoforma  $V_3$  da miosina em relação à isoforma  $V_1$ , os genes que modificam o metabolismo energético, e finalmente, os genes que aumentam a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina

próprio do coração. Essa reprogramação gênica parece ocorrer numa tentativa de poupar substratos de alta energia e melhorar o desempenho mecânico do músculo ventricular frente à maior demanda de trabalho (Molkentin, 2004).

Esta ativação gênica ocorre numa fase mais precoce da hipertrofia. Em fases mais avançadas, em geral quando o miocárdio hipertrofiado começa a apresentar os primeiros sinais de queda no desempenho mecânico, isto é, nas fases iniciais de transição da fase de hipertrofia compensada para insuficiência cardíaca, começam a ocorrer alterações da expressão de certos genes codificadores de proteínas mais diretamente envolvidas na homeostase iônica dos miócitos. Observa-se uma expressão aumentada dos genes codificadores do peptídeo natriurético atrial e do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e uma diminuição da expressão dos genes codificadores da ATP-ase do retículo sarcoplasmático (Molkentin, 2004).

O estímulo inicial que desencadeia o processo de re-expressão gênica pode ser químico ou mecânico. Muitos agentes químicos, como agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol), a angiotensina II e a endotelina-1 são potentes estimulantes da síntese proteica no miocárdio e, portanto, são também indutores de hipertrofia patológica (Molkentin, 2004).

As hipertrofias patológica e fisiológica podem ser ainda classificadas como concêntrica ou excêntrica baseando-se na alteração na forma e estímulo iniciador (Figura 8). Na hipertrofia concêntrica, ocorre um aumento da massa ventricular decorrente de um aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Com relação ao crescimento dos miócitos, ocorre a adição de sarcômeros em paralelo, o que aumenta a secção transversa das células. Já na hipertrofia excêntrica, ocorre um aumento da massa ventricular e da espessura da parede ventricular, mas com aumento dos diâmetros cavitários. A adição de sarcômeros em série, permite que a célula aumente de comprimento (Barry et al., 2008; Bernardo et al., 2010; Maillet et al., 2013; Koeck et al., 2016).



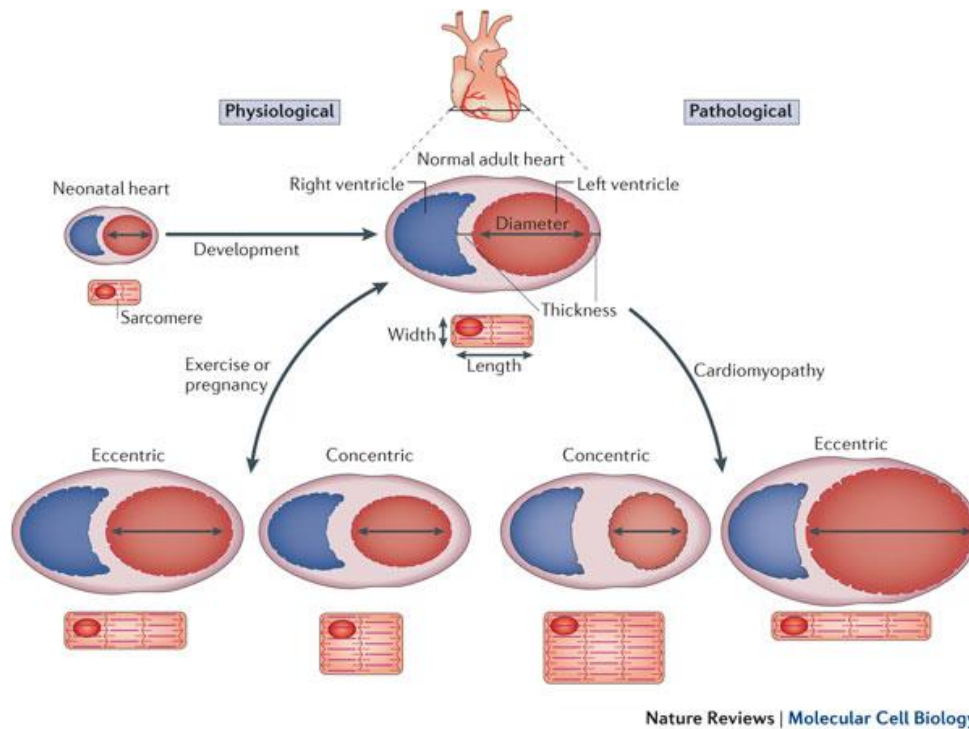


Figura 8 – Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica (Maillet et al., 2013).

Um estímulo patológico causado por uma sobrecarga de pressão, como na hipertensão arterial, ou em decorrência de um aumento de resistência à ejeção, resulta em uma hipertrofia concêntrica. Em contraste, um estímulo patológico causado por sobrecarga de volume, resulta em uma hipertrofia excêntrica (Bernardo et al., 2010; Koeck et al., 2016; Lazzeroni et al., 2016).

Estímulos fisiológicos também podem resultar em uma hipertrofia concêntrica ou excêntrica. Exercícios aeróbicos (treinamento de resistência) e a gravidez aumentam o retorno venoso para o coração, resultando em uma sobrecarga de volume e a ocorrência da hipertrofia excêntrica. Este tipo de hipertrofia excêntrica é geralmente caracterizada por um aumento das câmaras cardíacas e uma proporcional mudança na espessura da parede ventricular, enquanto a hipertrofia cardíaca em decorrência de doenças está geralmente associada com o desgaste das paredes ventriculares. Já os exercícios anaeróbicos (treinamento de força), resultam em uma sobrecarga de pressão sobre o coração e a ocorrência da hipertrofia concêntrica (Bernardo et al., 2010; Lazzeroni et al., 2016).

O tecido cardíaco é capaz de utilizar diferentes substratos de energia, dependendo de sua carga de trabalho e das concentrações destes substratos na corrente sanguínea. Este é considerado um mecanismo de adaptação que permite

que o coração produza um contínuo fornecimento de ATP a partir de diversas condições fisiológicas (Van der Vusse et al.,1992). No coração saudável normal, a oxidação de ácidos graxos é a principal via metabólica responsável pela geração de energia, por volta de 60-70% da produção de ATP, e a glicose e o lactato são responsáveis por aproximadamente 30% desta produção. Na hipertrofia cardíaca patológica ocorre uma diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento do metabolismo de glicose, como um mecanismo de proteção do coração. O mesmo ocorre durante o desenvolvimento cardíaco fetal, quando a oferta de oxigênio é limitada e o transporte e metabolismo de ácidos graxos são prejudicados, assim a glicose é o substrato principal utilizado pelo coração. Em contraste, na hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício físico, ocorre um aumento tanto da oxidação de ácidos graxos quanto da glicose (Ostadal et al., 1999; Davila-Roman et al.,2002; Van Bilsen et al., 2009; Bernardo et al., 2010; Samak et al.,2016; Shimizu &Minamino, 2016).

Diversas vias de sinalização celular são responsáveis pela indução dos diferentes aspectos da resposta hipertrófica do miocárdio à sobrecarga hemodinâmica. Os mecanismos de membrana, ativados por estímulos de natureza mecânica, hormonal ou parácrina/autócrina, ativam vias de crescimento celular que se constituem de uma ou mais enzimas com características de GTPases e/ou quinases, ativadas em cadeias que, por sua vez, ativam fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão gênica. A especificidade da relação estímulo resposta nesse processo é basicamente determinada pelos mecanismos transmembrana e pela interação entre fatores de transcrição e promotores gênicos.

Estudos em humanos e animais tem demonstrado que alguns fatores são preferencialmente liberados em resposta a estímulos patológicos e fisiológicos, e ativam vias de sinalização distintas. O IGF-1 é liberado durante o desenvolvimento pós-natal e em resposta ao treinamento, em contraste, a sobrecarga de pressão está associada a níveis elevados de angiotensina II, catecolaminas e endotelina 1 (ET-1). As principais vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica são IGF-1-PI3K-AKT e a sinalização de Gαq (ativação dos receptores acoplados a proteína G pela AngII, ET-1 e catecolaminas) respectivamente (Figura 9) (Barry et al., 2008; Bernardo et al., 2010; Balakumar & Jagadeesh, 2010; Maillet et al., 2013; Koeck et al., 2016; Samak et al.,2016; Shimizu &Minamino, 2016).

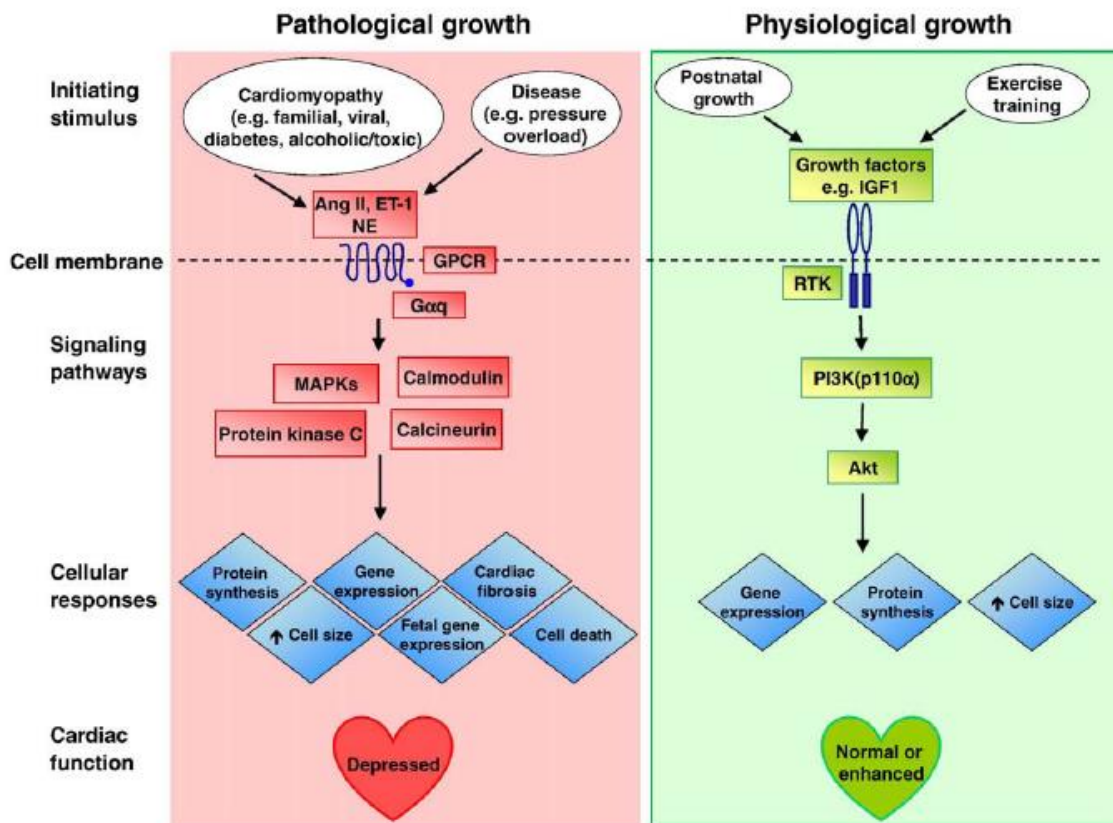


Figura 9 – Esquema representativo das vias de sinalização ativadas por mecanismos de transdução mecano-bioquímicos na hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica (Bernardo et al., 2010).

## 2.1 O uso de agonistas dos receptores $\beta$ -adrenérgicos e a indução da hipertrofia cardíaca

A ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos é responsável por modular a força de contração e a frequência cardíaca (Kadambi et al., 1996; Grimm & Brown, 2010). O sistema nervoso autônomo é responsável por liberar altas concentrações de catecolaminas na circulação resultando, portanto, na ativação crônica dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. É possível que este seja um mecanismo compensatório para aumentar a contratilidade do órgão (Ni et al., 2011). Entretanto, a ativação sustentada destes receptores é prejudicial ao coração, pois, induz o crescimento patológico do órgão, disfunção ventricular, apoptose e insuficiência cardíaca (Kaye et al., 1995; Port & Bristow, 2001; Brum et al., 2002; Bristow, 2003; Grimm & Brown, 2010). Desta forma, a ativação crônica dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos contribui para

a progressão de patologias cardíacas e aumento da mortalidade tanto em modelo animal quanto em pacientes humanos.

A estimulação  $\beta$ -adrenérgica envolve a ativação da proteína quinase A (PKA) e consequente regulação das proteínas SERCA, fosfolamban (PLB), receptores rianodina (RyR2) e canais para cálcio do tipo L presentes no sarcolema. A hiperatividade dos RyR2 induzida pela fosforilação da PKA, provoca o vazamento de cálcio do RS durante a diástole e consequentemente causa a depleção dos estoques internos de cálcio, reduzindo assim a contratilidade celular. Este processo contribui para o 'estresse' do RS - um conhecido mecanismo indutor da insuficiência cardíaca, isquemia e cardiomiopatia dilatada (Marx et al., 2000; revisado por Bers, 2002; Orrenius et al., 2003; Okada et al., 2004; Maier & Bers, 2007).

Modelos animais de cardiomiopatias são importantes para o estudo dos processos bioquímicos e cascatas celulares envolvidas no desenvolvimento de patologias cardíacas. O entendimento destas vias fornece os substratos necessários à manipulação do sistema e elaboração de estratégias terapêuticas visando à reversão do quadro patológico ou a melhora na qualidade de vida dos pacientes.

O modelo de hipertrofia cardíaca induzida através da administração subcutânea de isoproterenol, agonista  $\beta$ -adrenérgico, é utilizado por diversos grupos de pesquisa no mundo, e foi utilizado na determinação do tratamento no presente estudo.

### 3. EXERCÍCIO FÍSICO

A atividade física pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético pelo organismo. Já o exercício físico é definido como uma atividade física planejada, estruturada e de repetição que visa à melhora ou manutenção do condicionamento físico e cardiorrespiratório (Shephard et al., 1999; Thompson et al., 2003; Johnson et al., 2015).

Os exercícios podem ser classificados como aeróbicos ou anaeróbicos. Os exercícios anaeróbicos são aqueles que utilizam predominantemente os sistemas energéticos anaeróbicos e os exercícios aeróbicos são aqueles que utilizam o sistema aeróbico predominantemente, e cuja intensidade é submáxima. A magnitude das respostas ao exercício físico depende da duração, do tipo de exercício, intensidade e frequência do mesmo. Os exercícios de intensidade moderada são aqueles cujo desempenho corresponde a 40-60% do  $VO_2$  máximo, já os de intensidade vigorosa são os que atingem acima de 60% do  $VO_2$  máximo (Jones & Carter, 2000; Thompson et al., 2003; Lucini & Pagani, 2011; Sant'Ana et al., 2011).

A capacidade aeróbica é uma característica complexa definida como a eficiência de utilização do oxigênio atmosférico como aceptor final de elétrons em processos de transferência de energia (Ways et al., 2002), e, a capacidade aeróbica máxima ajustada para o tamanho e para a composição corporal é definida como aptidão física e é uma medida integrada das funções cardiorrespiratória, neuromuscular esquelética e de transporte e distribuição de oxigênio (Erikssen, 2001).

A capacidade aeróbica ao exercício tem sido considerada como um preditor importante de mortalidade, quando comparado a outros fatores de risco, para doenças cardiovasculares. Dessa forma, a manutenção dos níveis de capacidade aeróbica em patamares satisfatórios mostra-se de fundamental importância (Myers et al., 2002, Leeper et al., 2012; Camera et al., 2016). Estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos com altos níveis de aptidão física apresentam menores índices de mortalidade, principalmente por menor incidência de doenças cardiovasculares e de câncer, e que níveis baixos de capacidade aeróbica estão associados a um aumento no risco de desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e doença arterial coronariana, e,

consequentemente, maior taxa de mortalidade (Blair et al., 1996; Lee et al., 2003; Koba et al., 2011; Fernandes et al., 2015).

Atualmente, a importância da prática regular de exercício físico alcançou ampla aceitação pela população e pela comunidade médica. Cada vez mais pessoas ao redor do mundo incluem em seu dia-a-dia a prática regular de exercícios físicos. Se por um lado os benefícios do exercício físico em termos de manutenção e promoção da saúde são bem conhecidos, por outro lado, pesquisas têm mostrado evidências de que o sedentarismo é um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (Lucini & Pagani, 2011; Lee et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Eijsvogels et al., 2016).

A prática regular de exercícios físicos, nas suas diferentes manifestações, tais como aeróbicos, anaeróbicos, de resistência, força ou flexibilidade, pode promover importantes adaptações morfofuncionais e metabólicas no organismo (Fernandes et al., 2015; Johnson et al., 2015). De maneira contrária, o sedentarismo pode promover redução na expectativa de vida da população (Stessman et al., 2009; Moore et al., 2012; Lee et al., 2012; Fernandes et al., 2015).

Os efeitos fisiológicos do exercício físico podem ser classificados em agudos-imediatos e tardios - e crônicos. Os efeitos agudos, denominados respostas, são os que acontecem em associação direta com a sessão de exercício. Os efeitos agudos imediatos são os que ocorrem durante o exercício físico, como a elevação da frequência cardíaca, da ventilação pulmonar e sudorese. Os efeitos agudos tardios acontecem ao longo das primeiras 24 ou 48 horas (às vezes, até 72 horas) após uma sessão de exercício e podem ser identificados na discreta redução dos níveis tensionais, na melhora da função endotelial e na potencialização da ação e aumento da sensibilidade insulínica na musculatura esquelética. Por último, os efeitos crônicos, também denominados adaptações, resultam da exposição frequente e regular às sessões de exercícios (treinamento físico) e representam aspectos morfofuncionais que diferenciam um indivíduo fisicamente treinado de outro sedentário, tendo como exemplos típicos a bradicardia relativa de repouso, a hipertrofia muscular, a hipertrofia fisiológica do ventrículo esquerdo e o aumento do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máximo). O exercício também é capaz de promover a angiogênese, aumentando o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos e para o músculo cardíaco (Weiner & Baggish, 2012; Bozi et al., 2013; Hong et al., 2014; Camera et al., 2016; Eijsvogels et al., 2016).

O exercício físico realizado regularmente provoca importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas com o objetivo de manter a homeostase celular diante do incremento das demandas metabólicas. Nos músculos em atividade há um aumento no débito cardíaco, redistribuição no fluxo sanguíneo e elevação da perfusão circulatória, permitindo assim que o organismo melhore o seu desempenho (Lucini & Pagani, 2011; Fernandes et al., 2015).

### **3.1 Exercício físico e adaptações cardiovasculares**

O treinamento físico aeróbio produz vários efeitos benéficos sobre a musculatura esquelética, o metabolismo e o coração, além dos efeitos sobre a circulação coronariana e periférica (Lucini & Pagani, 2011; Lerchenmüller & Rosenzweig, 2014; Fernandes et al., 2015; Johnson et al., 2015).

As alterações cardiovasculares resultantes do treinamento físico já são bem conhecidas. Diversos estudos mostram uma diminuição na frequência cardíaca tanto de repouso quanto em cargas submáximas de trabalho, que pode ser explicada pelo aumento do tônus vagal e redução da atividade simpática cardíaca, induzidos pelo treinamento físico. Isso é um indicativo de que, para uma mesma carga de trabalho, está havendo um menor gasto energético pelo coração, portanto representa uma melhora na eficiência cardíaca. Alterações estruturais e hemodinâmicas também participam deste processo (Lucini & Pagani, 2011; Sant'Ana et al., 2011; Hawley et al., 2014; Fernandes et al., 2015).

Estruturalmente, ocorre um remodelamento cardíaco, e um consequente aumento da massa muscular do miocárdio, principalmente do ventrículo esquerdo, e um aumento do volume diastólico final, caracterizando o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica do tipo excêntrica. Também ocorre um aumento do volume sistólico e da força de contração do coração. Como há um maior enchimento ventricular, o coração ejeta um maior volume de sangue, e com isso, é necessário um menor número de batimentos por minuto para manter o débito cardíaco. Adaptações importantes também acontecem nos vasos, como um aumento no calibre das artérias coronarianas e um aumento do fluxo sanguíneo cardíaco e periférico. Essas alterações garantem uma melhor perfusão sanguínea para os músculos durante o exercício (Lucini & Pagani, 2011; Sant'Ana et al., 2011; Hawley

et al., 2014; Lerchenmüller & Rosenzweig, 2014; Fernandes et al., 2015; Eijsvogels et al., 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

O treinamento físico também promove adaptações bioquímicas no coração; aumenta o metabolismo oxidativo do miocárdio, devido a um aumento na atividade de enzimas oxidativas e no número de mitocôndrias (Lucini & Pagani, 2011; Johnson et al., 2015); reduz o percentual de gordura corporal; aumenta a massa muscular; reduz os níveis de colesterol total, triglicerídeos e de LDL e induz um aumento dos níveis de HDL e na sensibilidade à insulina (Lucini & Pagani, 2011).

### **3.2 Treinamento físico no processo da reabilitação cardíaca**

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos do exercício, sugerem que o treinamento físico aeróbio é uma importante conduta não farmacológica na prevenção e tratamento de diversas patologias, dentre elas a hipertensão arterial, diabetes, síndrome metabólica e a insuficiência cardíaca, para a redução da morbidade e mortalidade cardiovascular (Sant'Ana et al., 2011; Fagard, 2011; Endlich et al., 2011; Bozi et al., 2013; Hong et al., 2014; Lerchenmüller & Rosenzweig, 2014; Fernandes et al., 2015; Johnson et al., 2015; Bacurau et al., 2016; Eijsvogels et al., 2016).

Resultados relevantes alcançados em pacientes hipertensos mostram que o exercício físico leva à diminuição da pressão arterial e, em alguns casos, até a suspensão de medicamentos, reduzindo, portanto o ônus para os órgãos da saúde pública e os efeitos colaterais decorrentes do tratamento medicamentoso. O exercício físico tornou-se uma ferramenta extremamente útil tanto para o diagnóstico como também uma prescrição não farmacológica na rotina terapêutica (Fagard, 2011; Endlich et al., 2011; Bozi et al., 2013; Johnson et al., 2015).

A Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda que os indivíduos hipertensos e com doenças cardiovasculares iniciem programas de exercício físico regular, desde que submetidos à avaliação clínica prévia. (Fagard, 2011; Carneiro-Junior et al., 2013; Goessler et al., 2014; Eijsvogels et al., 2016).



### **3.3 Benefícios do treinamento físico e ativação das cascatas de sinalização da hipertrofia fisiológica em um cenário de doenças cardíacas.**

O exercício físico também ativa os receptores beta adrenérgicos do coração através da liberação de catecolaminas, para modular a força de contração e a frequência cardíaca, em resposta ao aumento da demanda energética (Ferreira et al., 2015) e com isso, promove efeitos inotrópico, cronotrópico e lusitrópico positivo no coração (figura 6).

Entretanto, diferente da ativação sustentada desses receptores em determinadas doenças que levam ao desenvolvimento da hipertrofia patológica e insuficiência cardíaca, o treinamento físico tem como efeito crônico o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica e não gera danos ao tecido cardíaco. Isso ocorre devido a ativação da via de sinalização IGF1-PI3K-Akt, que é importante na indução da hipertrofia fisiológica pelo exercício. Esta via, por apresentar propriedades anti-fibróticas, anti-apoptóticas, e por ser responsável pela manutenção de proteínas associadas com a função contrátil cardíaca, mantém o funcionamento cardíaco normal e protege do desenvolvimento da hipertrofia patológica e fibrose, em casos de sobrecarga no trabalho cardíaco (Bernardo et al., 2010).

Esse fato demonstra a importância do treinamento físico e da indução da ativação das cascatas de sinalização da hipertrofia fisiológica no tratamento da insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares, reafirmando que o exercício é uma forte estratégia terapêutica (Bernardo et al, 2010).

#### 4. PROTEÔMICA

O termo proteoma surgiu em meados da década de 90 e foi definido inicialmente como o complemento proteico total expresso por um genoma, por uma célula ou por um tipo de tecido (Wilkins et al., 1996). Atualmente, o termo proteoma é definido como o conjunto de todas as proteínas presentes em uma célula ou em um organismo, num dado momento, incluindo não somente aquelas traduzidas diretamente a partir do material genético, mas também as proteínas modificadas pelo processamento pós-traducional, resultando em modificações que têm o potencial de alterar a estrutura e/ou a função proteica (Apweiler et al., 2009).

O proteoma é altamente dinâmico e varia de acordo com o tipo e o estado funcional da célula, podendo refletir mudanças características e imediatas, em resposta, por exemplo, a estímulos externos e a processos fisiológicos ou patológicos (Apweiler et al., 2009).

O termo proteômica representa um amplo grupo de tecnologias decorrentes de métodos físico-químicos de análise de proteínas e envolve: métodos de separação e análise (focalização isoeletrica, eletroforese, cromatografias e espectrometria de massa) e bioinformática (Van Eyk, 2011). A associação dessas tecnologias tem contribuído para a caracterização de grande parte das proteínas presentes em organismos vivos e para a análise de proteomas complexos (Rotilio et al., 2012).

A proteômica é um campo que vem se expandindo rapidamente e que tem o objetivo de estudar sistematicamente a estrutura, a função, as dinâmicas e as interações proteicas (Jensen, 2006), analisando o conjunto de proteínas expressas por um sistema biológico em resposta a vários estímulos, e/ou sob diferentes condições fisiológicas ou patológicas (Macri e Rapundalo, 2001). Corretamente aplicada, a proteômica fornece “inventários protéicos celulares”, permite o mapeamento de vias metabólicas e a identificação de moléculas que poderão ser extremamente úteis no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução de tratamentos (Arrell et al., 2001).

A identificação dos mecanismos fisiopatológicos de doenças por meio da comparação e análise diferencial da expressão proteica, denominada análise proteômica comparativa, pode fornecer informações valiosas para o diagnóstico, tratamento médico, e prognóstico de diversas doenças. Por este motivo, a análise

proteômica tem sido amplamente aplicada em varias áreas da ciência como, no estudo de tumores, envelhecimento, exercício físico e recentemente nas doenças cardiovasculares (Lindsey et al., 2015; ; Ori et al., 2015; Ahmed et al., 2016; Lau et al., 2016; Padrão et al., 2016; Petriz et al., 2016; Rocha et al., 2016; Wang et al., 2016).

Estudos proteômicos aplicados à pesquisa cardiovascular têm sido fundamentais para o descobrimento de novos mecanismos patofisiológicos de doenças cardiovasculares, envolvendo interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais, e na identificação de potenciais biomarcadores da progressão das doenças, bem como alvos de proteínas que podem fornecer uma via para a intervenção terapêutica.

O primeiro estudo a utilizar uma abordagem proteômica para análise de tecido cardíaco surgiu no fim da década de 90 (Arnott *et al.*, 1998). Desde então, houve um aumento contínuo de estudos cardiovasculares que utilizaram essa abordagem. Esses estudos proteômicos demonstraram mudanças na expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo energético, homeostase de cálcio, proteínas do citoesqueleto e contráteis, antioxidantes e de choque térmico, em resposta a doenças cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca e cardiomiopatia) (Bernard et al., 2008; Jacquet *et al.*, 2009; Urbonavicius et al., 2009; Bugger et al., 2010; Lam et al., 2010; Zamilpa *et al.*, 2010; Juan et al., 2012; Li et al., 2014; Liu *et al.*, 2014; Mitra *et al.*, 2014). Essas alterações observadas na expressão dessas proteínas são prejudiciais ao coração e resultam na diminuição da função cardíaca.

A proteômica também vem sendo utilizada na área da fisiologia do exercício para melhor compreensão dos efeitos do exercício físico sobre tecidos específicos. Estes estudos emergiram dada a necessidade de se investigar mais profundamente os mecanismos moleculares envolvidos nas adaptações fisiológicas promovidas pelo exercício (Petriz et al., 2012). Os efeitos do exercício físico foram investigados em diferentes modalidades, como corrida (Boluyt et al. 2006; Kavazis et al., 2009; Bansal et al., 2010; Ferreira et al., 2014) e natação (Sun et al., 2008; Rocha et al., 2012; Petriz et al., 2013), em diferentes intensidades de exercício (Boluyt et al. 2006; Sun et al., 2008; Burniston et al., 2008; Burniston, 2009; Rocha et al., 2012; Petriz et al., 2015) e analisando diferentes tipos de tecidos (Guelfi et al., 2006; Burniston et al., 2008; Burniston, 2009; Balfoussia et al., 2014; Ferreira et al., 2015).

Resumidamente, os estudos proteômicos mostram que o treinamento físico modula positivamente proteínas do metabolismo energético (glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, síntese de ATP e cadeia de transporte de elétrons), da oxidação de ácidos graxos, proteínas antioxidantes e de choque térmico, e proteínas estruturais e contráteis (Boluyt et al. 2006; Sun et al., 2008; Burniston, 2009; Bansal et al., 2010; Rocha et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Petriz et al., 2015). Essas alterações observadas na expressão dessas proteínas induzidas pelo treinamento podem influenciar benéficamente o metabolismo do coração, a resposta ao estresse e as vias de sinalização e, portanto, melhorar a função cardíaca, permitindo assim que o exercício seja uma importante conduta não farmacológica na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

Uma abordagem proteômica comumente, a qual foi utilizada neste trabalho, é a eletroforese bidimensional (2-DE) acoplada à espectrometria de massa. Este “approach” consiste em separar as proteínas por 2-DE: 1ª dimensão (IEF - focalização isoelétrica), em que as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico; 2ª dimensão (SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), na qual a separação ocorre de acordo com sua massa molecular. Após a revelação do gel, uma imagem digital do perfil proteico é produzida e sua análise é executada utilizando-se um software especializado, que é capaz de quantificar o tamanho e a intensidade dos spots proteicos. Os estudos proteômicos envolvem a comparação das imagens de géis entre grupos experimentais distintos para a identificação de expressão proteica diferencial, e, uma vez detectados, os spots proteicos de interesse, serão então processados para posterior identificação proteica por análise de espectrometria de massa (MS) (Lam et al., 2006; Langley et al., 2013).

Considerando o exposto, é possível afirmar que estudos utilizando estratégias proteômicas baseadas em espectrometria de massa podem gerar importantes informações sobre o efeito do treinamento físico no remodelamento do proteoma cardíaco em situações fisio- patológicas.

## **II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 1. JUSTIFICATIVA

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio, em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional, ocasionando um aumento da massa do coração (Machida et al. 2000; Russel et al., 2000; Bernardo et al., 2010; Agrawal et al., 2010; Samak et al.,2016; Lazzeroni et al., 2016; Liu et al., 2016). Quando associada a condições fisiopatológicas, a hipertrofia cardíaca assume importância devido ao fato de que sua presença associa-se a um aumento de risco de morbidade e mortalidade, tendo como consequência o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e a ocorrência de infarto do miocárdio, arritmias e morte súbita, o que implica em altos custos de tratamento e prevenção (Mudd & Kass, 2008; Bernardo et al., 2010; Agrawal et al., 2010; Balakumar & Jagadeesh, 2010; Samak et al.,2016).

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no mundo. Anualmente, morrem mais pessoas de DCV do que de qualquer outra causa (OMS, 2015). Estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de DCV em 2013, representando mais de 30% de todos os óbitos no mundo (OMS, 2013).

Um estilo de vida sedentário é considerado um importante fator de risco cardiovascular, por isso, atualmente, a importância da prática regular de exercício físico alcançou ampla aceitação pela população e pela comunidade médica. Cada vez mais pessoas ao redor do mundo incluem em seu dia-a-dia a prática regular de exercícios físicos (Lucini & Pagani, 2011; Lee et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Eijsvogels et al., 2016).

O exercício físico, nas suas diferentes manifestações, aeróbicos, anaeróbicos, de resistência, força ou flexibilidade, pode promover importantes adaptações morfofuncionais e metabólicas no organismo. De maneira contrária, o sedentarismo pode promover redução na expectativa de vida da população (Stessman et al., 2009; Moore et al., 2012; Lee et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Johnson et al., 2015).

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos do exercício, sugerem que o treinamento físico aeróbico é uma importante conduta não farmacológica na prevenção e tratamento de diversas patologias, dentre elas a hipertensão arterial, diabetes, síndrome metabólica e a insuficiência cardíaca, para a redução da morbidade e mortalidade cardiovascular (Hong et al., 2014; Lerchenmüller & Rosenzweig, 2014; Fernandes et al.,2015; Johnson et al., 2015;

Bacurau et al., 2016; Eijsvogels et al., 2016). Estudos têm fornecido fortes evidências para os benefícios do exercício aeróbio na reabilitação cardíaca, o que confirma a sua utilização como uma terapia para uma variedade de doenças cardiovasculares (Bozi et al., 2013; Johnson et al., 2015).

A análise proteômica tem sido amplamente aplicada em várias áreas da ciência como, no estudo de tumores, envelhecimento, exercício físico e recentemente nas doenças cardiovasculares, pois pode fornecer informações valiosas para o diagnóstico, tratamento médico, e prognóstico de diversas doenças (Lindsey et al., 2015; ; Ori et al., 2015; Ahmed et al., 2016; Lau et al., 2016; Padrão et al., 2016; Petriz et al., 2016; Rocha et al., 2016; Wang et al., 2016).

Nesse sentido, com o intuito de descobrir novas informações sobre o processo de remodelamento dos tecidos ventriculares na hipertrofia patológica e fisiológica, bem como compreender os mecanismos pelos quais a atividade física interfere na prevenção das complicações cardiovasculares, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aeróbio no remodelamento do proteoma cardíaco, no ventrículo esquerdo de camundongos com hipertrofia patológica, abrindo caminho, dessa forma, para novas perspectivas de desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil proteico do ventrículo esquerdo de animais com hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica, bem como avaliar o remodelamento do proteoma cardíaco em resposta ao treinamento aeróbico moderado na hipertrofia patológica.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as alterações morfológicas do ventrículo esquerdo dos animais para a validação dos modelos de hipertrofia cardíaca.

2. Avaliar o efeito do isoproterenol na sobrevivência, peso corporal e condicionamento dos animais.

3. Avaliar o efeito do treinamento aeróbico no peso corporal e no condicionamento dos animais.

4. Avaliar as alterações do  $VO_2$  de repouso e do  $VO_2$  máximo.

5. Avaliar as alterações hemodinâmicas da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).

6. Obter o perfil proteico (proteoma) do ventrículo esquerdo de camundongos com hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica, bem como seu remodelamento em resposta ao treinamento físico.

7. Realizar a análise comparativa dos perfis proteicos e identificar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de animais, por espectrometria de massa.

7. Validar as diferenças de expressão proteica das proteínas de interesse através da técnica de western blot.

8. Correlacionar as proteínas identificadas com os benefícios do treinamento aeróbico na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.



### **III. MÉTODOS**

## 1. Grupo experimental

Camundongos C57Bl/6 (6 semanas de idade) foram cedidos pelo CEBIO/UFMG. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 27 x 18 x 13 cm, no máximo quatro animais por gaiola, e mantidos no biotério do ICB em um ciclo claro-escuro de 12h, temperatura controlada (22°C) e com livre acesso à ração e água. Ao completarem 8 semanas, os animais foram selecionados aleatoriamente para compor os grupos experimentais.

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos: saudável e isoproterenol. Os animais do grupo isoproterenol receberam durante 10 dias consecutivos, uma dose diária de 45mg/kg/dia de isoproterenol, a qual foi administrada via subcutânea. O isoproterenol (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina composta (NaCl 140mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,86mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,4mM e ácido ascórbico 0,02%). Os animais do grupo saudável receberam uma aplicação diária de solução salina proporcional à massa corporal aferida no dia.

Após os 10 dias de aplicação, os animais foram subdivididos entre os seguintes grupos: 1) Saudável sedentário (SS); 2) Saudável treinado (ST); 3) Isoproterenol sedentário (IS); 4) Isoproterenol treinado (IT). Os animais de todos os grupos foram submetidos a um protocolo de adaptação a esteira por 5 dias, que constituiu em 10 minutos de exercício, 5% de inclinação, 1 vez ao dia. Após essa adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo para determinar a velocidade de treino e a capacidade aeróbica de cada animal. Este teste iniciava-se com uma velocidade de 6 m/min e incremento de 3 m/min na velocidade a cada 3 minutos, até a fadiga, que foi determinada como o momento em que o camundongo não conseguia manter a corrida de acordo com a velocidade da esteira mesmo com estímulo (Figura 10).

Os animais dos grupos treinado – saudável e isoproterenol - foram submetidos a um treinamento de intensidade moderada, na esteira, por um período de 8 semanas. Este treinamento consistiu em uma corrida a 60% da velocidade máxima, 5% de inclinação, 1 vez ao dia, por um período de 1 hora, 5 vezes por semana. Os animais dos grupos sedentário - saudável e isoproterenol - foram mantidos no biotério durante 8 semanas, e não foram submetidos ao treinamento (Figura 10).

Para ajustar a velocidade de treino, devido ao ganho de condicionamento, após os primeiros 30 dias de treinamento, os animais dos grupos treinado foram submetidos a outro teste de esforço máximo. Ao final das 8 semanas, os animais de todos os grupos foram submetidos novamente ao teste de esforço máximo e quarenta e oito horas após este teste, os animais foram sacrificados e o coração foi removido para as análises propostas (Figura 10). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética nº 260/2014.

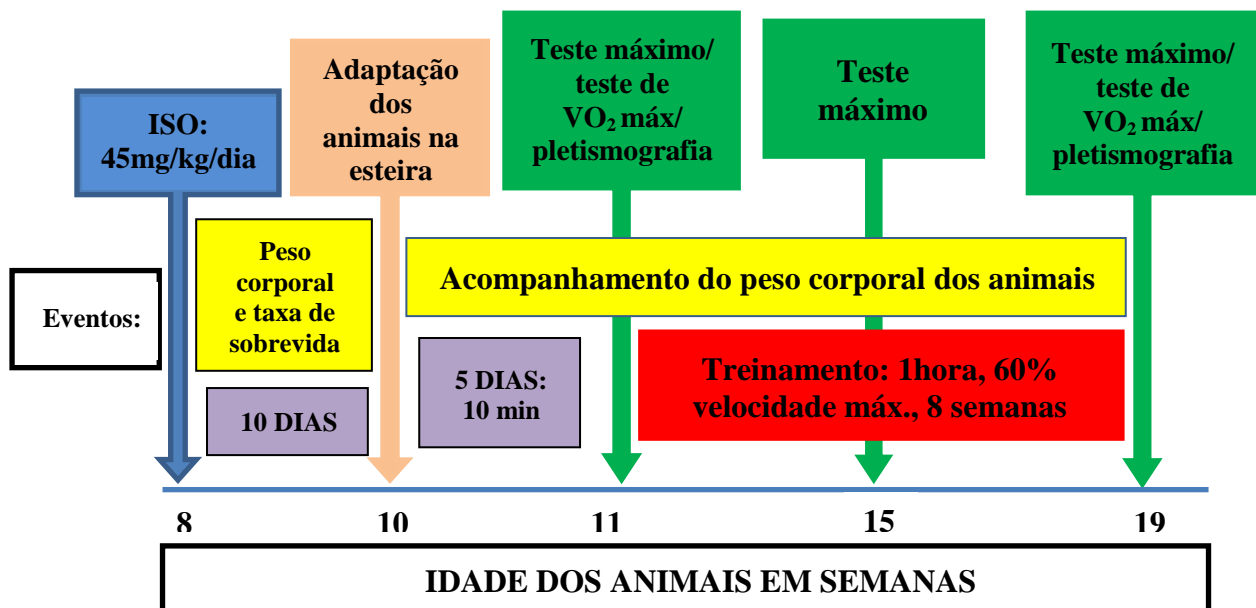


Figura10- Delineamento experimental

## 2. Mensuração do consumo de oxigênio

Os animais foram pesados e colocados numa câmara hermeticamente fechada e calibrada para o registro do consumo de oxigênio no repouso e durante exercício progressivo até a fadiga. O VO<sub>2</sub> (mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) foi mensurado utilizando um sistema de calorimetria indireta de circuito aberto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha), calibrado semanalmente com uma mistura conhecida de gases.

O VO<sub>2</sub> foi medido durante um período de repouso (30 min) e durante o exercício progressivo até a fadiga (velocidade inicial: 5 m/min, incremento de velocidade 3 m/min a cada 3 min; 5% de inclinação; 0,28 mA de estímulo elétrico). A fadiga foi determinada como o momento em que o camundongo não conseguia manter a corrida de acordo com a velocidade da esteira e se sujeitava ao estímulo

elétrico por pelo menos 10 segundos (Rodrigues et al., 2004; Lima et al., 2001). O  $VO_2$  foi medido continuamente e transmitido para um sistema computadorizado para posterior análise (Metabolism, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha).

### **3. Análise de parâmetros hemodinâmicos**

Os parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM), foram avaliados por pletismografia de cauda utilizando para isso, o pletismógrafo RTBP 2000 Kent-Scientific (Litchfield Ct 06759, EUA). Os camundongos foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico. A cauda dos animais foi encaixada a um manguito de borracha adaptado à região proximal e ligado ao esfigmomanômetro para inflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50s. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso que captava os sinais de PAS, PAD e PAM a serem enviados e registrados em um computador.

### **4. Análise histológica e morfométrica**

O coração foi removido cuidadosamente, dissecado e fixado em formalina (10% em solução salina) por no mínimo 48 horas e processado rotineiramente para a inclusão de parafina. Para a análise da área total, espessura e diâmetro do ventrículo esquerdo foram utilizados cortes corados pela Hematoxilina e Eosina e para quantificar o colágeno, cortes corados pelo Tricrômico de Gomori.

#### **4.1 Análise morfométrica**

As análises morfométricas foram realizadas através do analisador de imagem “Zeiss Imaging Processing Software (KS 300)”, Caliaro (1997), do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG. Foram selecionados dez campos da lâmina histológica de forma aleatória, usando-se a objetiva de 40X. Esses campos foram capturados e posteriormente, através do analisador de imagens, permitiu-se que as

estruturas fossem marcadas e quantificadas através de sua coloração diferencial com outras estruturas. Cada estrutura de interesse foi selecionada manualmente, e o software criou uma imagem negativa da mesma, e na sequência, as medidas foram realizadas de modo automático e os resultados expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

## 4.2 Avaliação da fibrose tecidual

A fibrose tecidual foi avaliada pela marcação das fibras colágenas com Tricrômico de Gomori que cora as fibras em verde. As lâminas foram desparafinadas em xilol (20 min), em seguida hidratadas sequencialmente com álcool (absoluto ao álcool 70%), posteriormente submetidas a banho em água corrente (5 min) e coradas pela solução de Tricrômico de Gomori por 30 minutos. Após, as lâminas foram lavadas rapidamente com água destilada com posterior desidratação em álcool 70% até os álcoois absoluto I e II e diafanização rápida em xilol por no máximo 10 min. As lâminas foram montadas em Entellan<sup>®</sup>. A figura 11 exemplifica a técnica para a análise de colágeno.

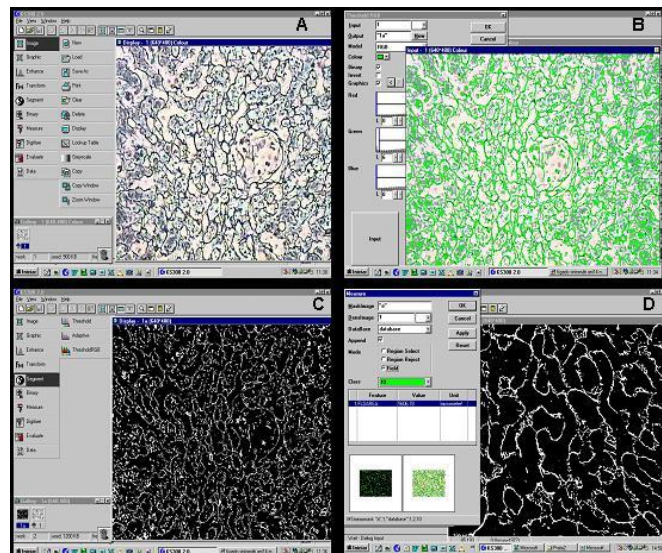


Figura 11 – Sequência de comandos no Software KS300 para determinação da deposição de colágeno no miocárdio. (A) Digitalização da imagem; (B) Seleção dos pixels (C) Obtenção da imagem binária para posterior obtenção da área correspondente ao colágeno; (D) Obtenção da área correspondente ao colágeno.

## **5. Análise proteômica**

Para a análise proteômica comparativa (Figura 12) do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, o coração foi rapidamente removido, e lavado com solução salina (5X) e posteriormente com água milliQ (2X) à 4°C. O excesso de solução de lavagem foi removido por contato com papel de filtro e o coração foi dissecado e sua massa mensurada. Em seguida, os átrios e ventrículo direito foram removidos e a massa do ventrículo esquerdo foi rapidamente mensurada. O ventrículo esquerdo (VE) foi alocado em criotubo, o qual foi imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C, até o momento da análise.

### **5.1 Obtenção do extrato proteico do ventrículo esquerdo**

Para extração das proteínas das amostras de ventrículo esquerdo, utilizou-se a metodologia descrita por Burniston (2009), com algumas modificações. Amostras do VE foram pulverizadas sob atmosfera de nitrogênio líquido utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Ao pó resultante foi adicionado tampão de lise na proporção de 1:10 (p/v), o qual continha 8M de uréia, 2M de tiouréia, 40mM de Tris base, 4% (p/v) de CHAPS, 65 mM DTT (dithiothreitol) e coquetel de inibidor de proteases. A mistura obtida foi submetida à sonicação (3 ciclos de 20 segundos, 15 Hz, com intervalos de 1 minuto), utilizando um sonicador ultrassônico (Qsonica XL-2000), em banho de gelo à 4°C. Para remoção do material insolúvel do lisado celular, o homogenato obtido foi centrifugado à 12000 g por 30min à 4°C. O conteúdo proteico do sobrenadante (extrato solúvel) foi quantificado utilizando-se o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences), conforme as indicações do fabricante. Os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados à -80°C para posterior análise por Eletroforese Bidimensional (2DE - PAGE).

## 5.2 Eletroforese bidimensional

As amostras proteicas do ventrículo esquerdo foram submetidas à eletroforese bidimensional. Foram obtidos 16 géis (4 de cada grupo experimental, correspondendo a quatro diferentes animais de cada grupo – replicatas biológicas).

### 5.2.1 Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

Amostras de 400µg de proteínas solúveis (obtidas conforme o item 5.1) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, e 60mM de DTT para um volume final de 260µL. As soluções resultantes foram transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre estas foram colocadas as IPG *strips* desidratadas (13cm, pH 3-10 não linear) por um período de 10 a 16 horas à 20°. Posteriormente as IPG *strips* carregadas com as amostras foram alocadas adequadamente no sistema Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE *Healthcare life sciences*) à 20°C. A programação utilizada para a focalização isoeétrica foi: 1ª etapa: 100 V por 1 hora; 2ª etapa: acúmulo de 500Vh; 3ª etapa: acúmulo de 800 Vh; 4ª etapa: acúmulo de 11300Vh; 5ª etapa: acúmulo de 6000Vh; 6ª etapa: 500 V por 2 horas, seguindo especificação do fabricante.

### 5.2.2 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas

Após a eletrofocalização das proteínas, as *strips* foram submetidas à redução e alquilação. Esse processo foi realizado pela incubação seqüenciada das *strips* com DTT (10 mg/mL), e posteriormente iodoacetamida (25 mg/mL), em tampão de equilíbrio (50 mM Tris- HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) por 30 minutos cada à temperatura ambiente.

### 5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão)

A segunda dimensão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguindo o método descrito por Laemmli (1970), utilizando o sistema SE 600 Ruby, standard vertical, (GE *Healthcare life sciences*). As IPG *strips* contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para a superfície do gel de poliacrilamida (12,5%), as quais foram seladas com solução de agarose 0,5% preparada no tampão de corrida (Tris/Glicina/SDS, pH 8,8). A eletroforese foi conduzida a 30mA/gel por 1 hora e, em seguida, a 75mA/gel até o término da corrida. Decorrido o tempo da eletroforese, o gel foi retirado da placa e submetido à coloração pelo método Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) por 48 horas, de acordo com Neuhof e colaboradores (1988), com algumas modificações. O excesso do corante foi removido do gel com água ultrapura (Milli-Q).

### 5.2.4 Aquisição, processamento e análise das imagens

Para obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (GE *Healthcare Life Sciences*) no modo de transmissão calibrado. As imagens foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05 (GE *Healthcare Life Sciences*). A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual e reeditada quando necessário.

Após normalização da intensidade de cada *spot* em % do volume total dos *spots*, utilizando a equação descrita abaixo, foram realizadas as análises quantitativas para a identificação de *spots* com diferentes intensidades de expressão proteica.

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

Onde:

- $Vol$  = área da base do pico do “spot” (a 75% do cume) x intensidade do “spot”.
- $Vol_s$  é o volume do “spot” s em um gel contendo n “spots”.



### 5.2.5 Identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos

As frações dos géis contendo os spots de interesse (spots que foram diferencialmente expressos entre os grupos), selecionados conforme item acima, foram manualmente removidas do gel, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, e descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400  $\mu\text{L}$  de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8.0, sob agitação. Após a remoção da solução descorante, as frações dos géis foram tratadas com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, até a opacificação do gel. As frações foram reidratadas com 10  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina (Golden) e mantidas por 30 minutos em banho de gelo para incorporação da solução. Para manter as frações úmidas durante a hidrólise triptica, 20  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, e a mistura foi incubada por 14 horas a 37°C. Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e as frações do gel foram submetidas a duas lavagens sucessivas com 30  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (30 minutos cada, sob agitação), para completa remoção dos fragmentos tripticos. As soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ , por concentração a vácuo. Posteriormente, as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Os fragmentos da hidrólise enzimática foram eluídos da resina com 6  $\mu\text{L}$  de solução 50% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (Vergote et al., 2005). Como controle negativo e positivo para as análises, foram utilizados, respectivamente, uma fração do gel destituída de spot protéico e o spot protéico correspondente à albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular. Alíquotas de 0,6 $\mu\text{l}$  de cada solução dos fragmentos tripticos dessalinizados foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) e em seguida co-cristalizadas com 0,25 $\mu\text{L}$  de solução saturada da matriz (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70%/TFA 0,1%) à temperatura ambiente. Os espectros de massas foram obtidos em sistema do tipo MALDI-TOF/TOF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA) operando no modo positivo/refletido.

### 5.2.6 Pesquisa em banco de dados

Os espectros de massas obtidos de cada spot protéico (MS e MS/MS) foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBI), por meio do software MASCOT® ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Score global do MASCOT® correspondente à significância estatística de  $p < 0,05$  foi utilizado para validação da identificação das proteínas, quando estas apresentavam homologia com *Mus musculus*. A categorização funcional das proteínas identificadas foi realizada por meio das anotações dos processos biológicos e funções moleculares obtidas nos bancos de dados do *Gene Ontology* (GO) e *PANTHER* para *Mus musculus*.

### 5.2.7 Análises de bioinformática – interações proteína-proteína

As proteínas identificadas foram carregadas na base de dados do STRING (*Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), versão 10.0, (<http://string-db.org/>), utilizado para identificar as possíveis interações existentes proteína-proteína. Para tal verificação utilizou-se os códigos das 58 proteínas fornecidos pelo banco de dados disponível no Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). O banco de dados dos parâmetros de pesquisa incluídos foi demarcado para “múltiplas proteínas” incluídas no organismo *Mus musculus*. Foram consideradas fontes de interação ativa todos os parâmetros disponibilizados pelo programa com score de interação mínimo de 0.900 de confiança. As proteínas que apresentaram interações entre si foram agrupadas (clusterizadas) de acordo com a classificação funcional das mesmas e as que não apresentaram nenhuma interação foram excluídas da análise. Duas proteínas de interesse foram escolhidas e carregadas no KEGG para gerar sua localização nas vias de sinalização.

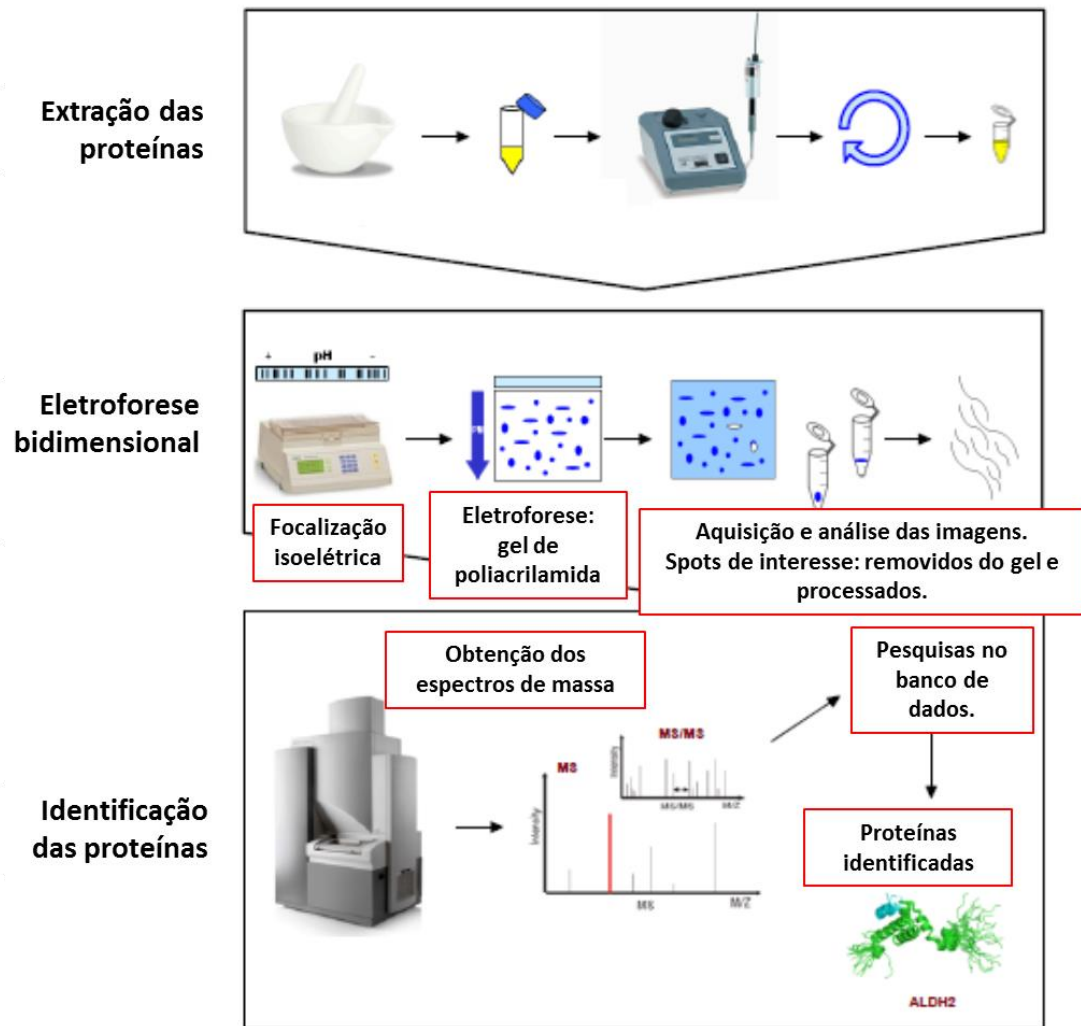


Figura 12 – Fluxograma das etapas experimentais utilizadas para a análise proteômica.

## 6. Western Blotting

Para a análise da expressão da sarcalumenin (35 $\mu$ g) e da serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma (35 $\mu$ g), as amostras foram aplicadas nas canaletas de um gel de poliacrilamida (10%) durante 1 h para separação das proteínas de acordo com sua massa molecular e posteriormente as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, foi feito o bloqueio da membrana com leite em pó (5%) diluído em PBS-Tween (0,3 %) por 1h. A membrana foi incubada (overnight) com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween - 0,3%) com anticorpos das proteínas de interesse – sarcalumenin (diluição 1:500 $\mu$ l) e serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma

(diluição 1:500 $\mu$ l). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário por 2 horas. Logo após esse processo, a membrana foi revelada por detecção quimioluminescente (Amersham Biosciences do Brasil Ltda).

## **7. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. Valores de probabilidade de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **IV. RESULTADOS**

## 1. Parâmetros morfométricos: caracterização da hipertrofia

Para determinar se os protocolos experimentais propostos, tratamento com isoproterenol e treinamento aeróbio, foram efetivos em induzir a hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica respectivamente, e para avaliar os efeitos do treinamento aeróbio na hipertrofia cardíaca patológica, ao final das sessões de treinamento foram realizadas aferições da massa do coração e da massa do ventrículo esquerdo.

Na figura 13, podemos observar uma menor massa do coração nos animais do grupo isoproterenol treinado em relação aos animais dos outros grupos. Em contrapartida, a massa do ventrículo esquerdo foi maior nos animais do grupo isoproterenol sedentário.

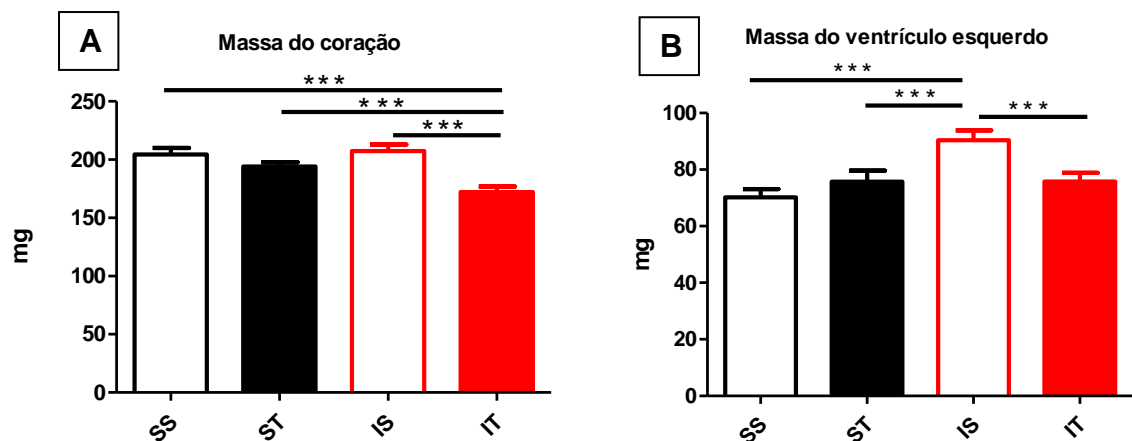


Figura 13 – Valores obtidos para (A) massa do coração e (B) massa do ventrículo esquerdo ao final das 8 semanas de treinamento (n=15, cada grupo). \*\*\*p=0,0001.

Para confirmar estes resultados, foi verificado o crescimento do coração e do ventrículo esquerdo pela correlação destas estruturas com o comprimento da tibia, utilizada como estrutura padrão que não se modifica, independente do tratamento em que os animais foram submetidos. A normalização da massa do coração pelo comprimento da tibia confirmou que os animais do grupo isoproterenol treinado apresentavam menor massa do coração quando comparados com os animais dos grupos saudável sedentário e isoproterenol sedentário, entretanto não houve diferença significativa em relação ao grupo saudável treinado. (Figura 14).

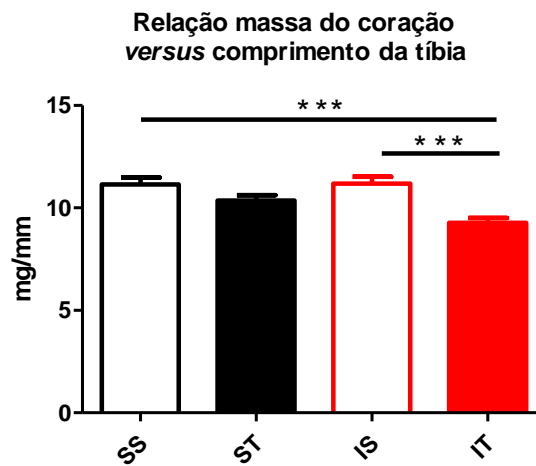


Figura 14 – Correlação obtida da massa do coração vs comprimento da tíbia ao final das 8 semanas de treinamento (n=15, cada grupo). \*\*\*p=0,0002.

O mesmo ocorreu após a normalização do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia, o resultado obtido anteriormente foi confirmado. (Figura 15).

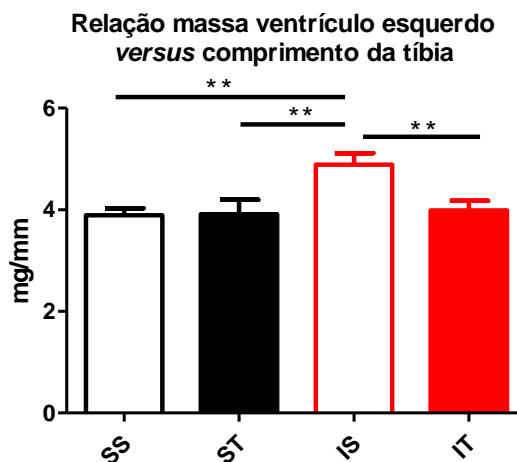


Figura 15 – Correlação obtida da massa do ventrículo esquerdo vs comprimento da tíbia ao final das 8 semanas de treinamento (n=15, cada grupo). \*p=0,001.

Por outro lado, na normalização da massa do ventrículo esquerdo pela massa do coração, pode-se observar que os animais dos grupos ST, IS e IT apresentaram um aumento dessa relação quando comparados com os animais do grupo SS (Figura 16).

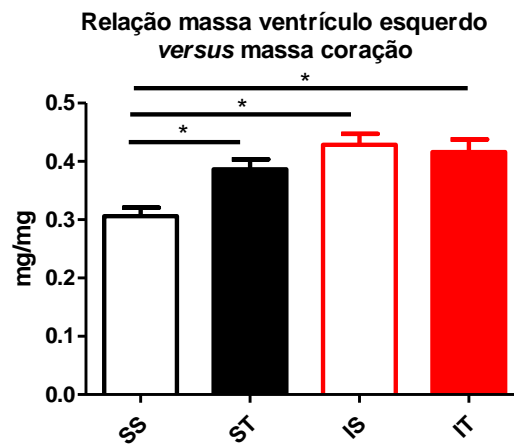


Figura 16 – Correlação obtida da massa do ventrículo esquerdo vs massa do coração ao final das 8 semanas de treinamento (n=15, cada grupo). \*p=0,01

## 2. Parâmetros histomorfométricos: caracterização da hipertrofia

Dando continuidade na caracterização das hipertrofias induzidas pelo isoproterenol e treinamento aeróbio, foi observado um aumento da área total do ventrículo esquerdo nos animais dos grupos ST, IS e IT quando comparados com os animais do grupo SS (figura 17). Entretanto não houve diferença significativa no diâmetro e espessura da parede do ventrículo esquerdo entre os grupos (figura 18 e 19).

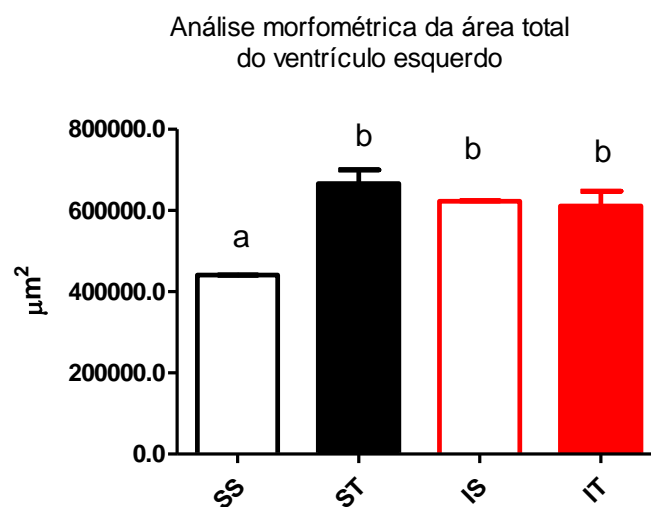


Figura 17 – Análise morfométrica da área total do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento (n=6, cada grupo) (p=0,001).



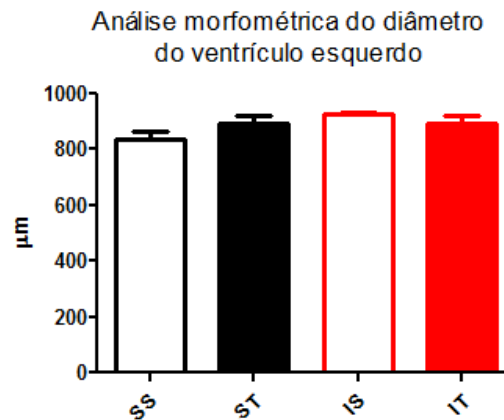


Figura 18 – Análise morfométrica do diâmetro do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento (n=6, cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

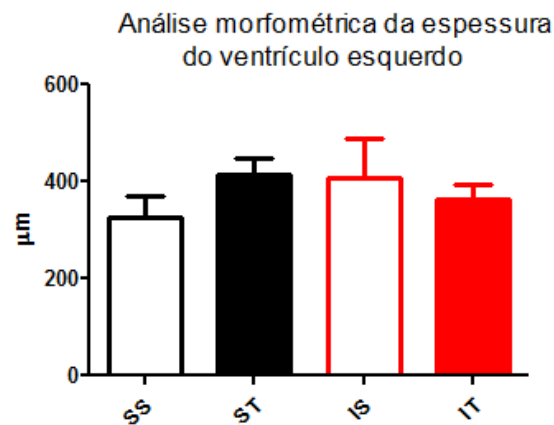


Figura 19 – Análise morfométrica da espessura do ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento (n=6, cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

As análises histológicas evidenciaram a manutenção na integridade da arquitetura e das células do miocárdio nos animais dos grupos saudável (SS e ST), com uma discreta hipertrofia no último grupo. Como esperado, nos animais dos grupos isoproterenol (IS e IT), foi observada uma hipertrofia patológica no ventrículo esquerdo, com intensa desorganização das fibras e áreas de fibrose focal a difusa como tentativa de reparo ao dano isquêmico decorrente de um infarto subendocárdico, que parecem ser menos intensas no tecido dos animais do grupo IT (Figuras 20 e 21).

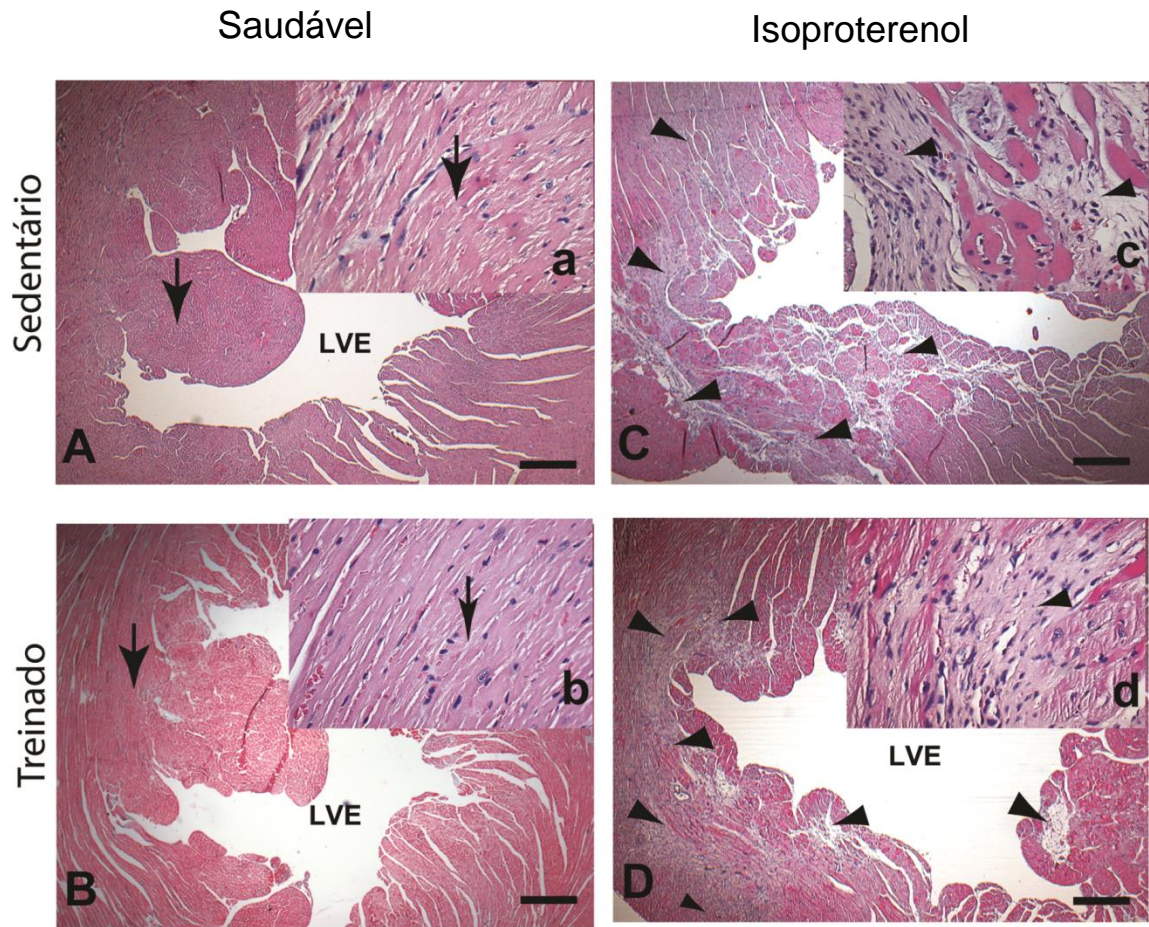


Figura 20 – Corte Histológico representativo do coração de camundongos dos grupos saudável sedentário (A), saudável treinado (B), isoproterenol sedentário (C) e isoproterenol treinado (D). Em A e B Estrutura das fibras ventriculares sem alterações, em a e b) Detalhe de miócitos normais e sem alterações (seta preta). C e D) Intensa desorganização das fibras com fibrose subendocárdica focal a difusa (cabeça de seta preta), em c e d) Detalhes de miócitos rodeados por fibras colágenas. Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra em A - D) = 50x - 62  $\mu\text{m}$ ; incerto a - d) = 400x - 16  $\mu\text{m}$ . LVE – luz do ventrículo esquerdo.

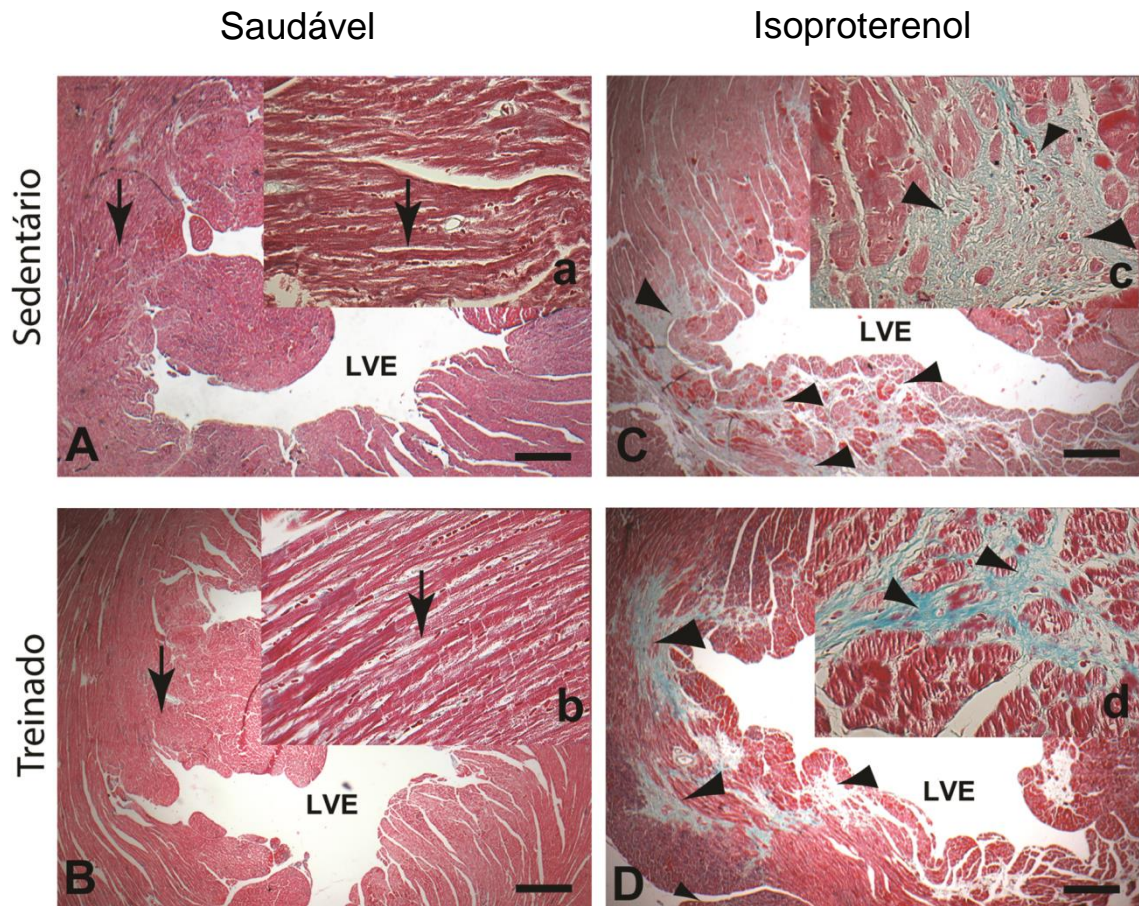


Figura 21 – Corte Histológico representativo de coração de camundongos dos grupos saudável sedentário (A), saudável treinado (B), isoproterenol sedentário (C) e isoproterenol treinado (D). Em A e B) Estrutura das fibras ventriculares sem alterações, em a e b) Detalhe de miócitos normais e sem alterações (seta preta). C e D) Intensa desorganização das fibras com fibrose subendocárdica focal a difusa evidenciada em verde (cabeça de seta preta), em c e d) Detalhes de miócitos rodeados por fibras colágenas em verde. Coloração pelo Tricrômico de Gomori. Barra em A - D) = 50x - 62  $\mu$ m; incerto a - d) = 400x - 16  $\mu$ m. LVE – luz do ventrículo esquerdo.

A área de fibrose, parâmetro também utilizado para a constatação do processo hipertrofico patológico, foi avaliada e foi significativa entre todos os grupos, sendo maior nos animais do grupo isoproterenol sedentário (Figura 22).

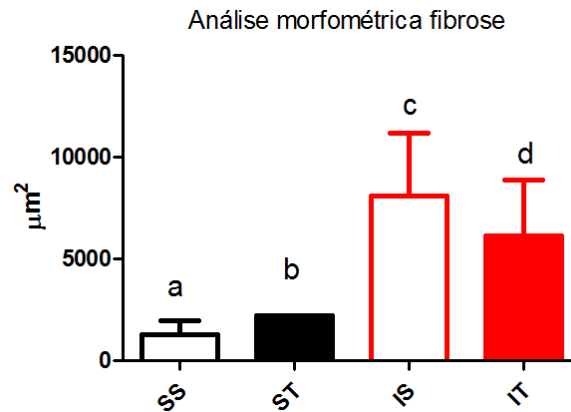


Figura 22 – Análise morfométrica da área de fibrose no miocárdio dos animais de todos os grupos experimentais ao final das 8 semanas de treinamento (n=6, cada grupo).  $p=0,0001$ .

### 3. Efeitos da aplicação de isoproterenol na sobrevivência e peso corporal dos animais

Após validar os modelos de indução da hipertrofia patológica e fisiológica, avaliou-se o efeito dos tratamentos sobre alguns parâmetros. Para determinar o efeito da administração subcutânea de isoproterenol, foi feito o acompanhamento da sobrevivência e do peso corporal dos animais (IS e IT) durante os 10 dias de tratamento e comparado como animais dos grupos saudáveis (SS e ST). Na figura 23, podemos observar que a aplicação de isoproterenol levou a uma diminuição da sobrevivência dos animais em aproximadamente 25%.

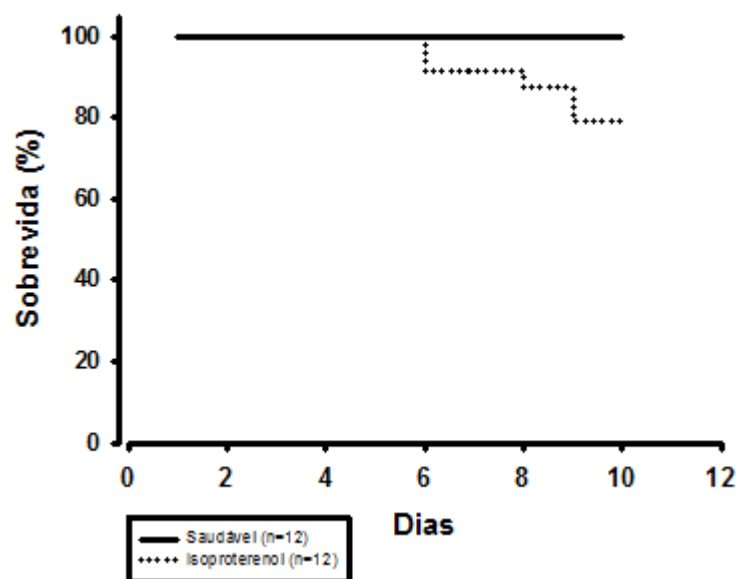


Figura 23 - Acompanhamento da taxa de sobrevivência dos animais ao longo dos 10 dias de tratamento com isoproterenol (linha contínua) e solução salina (linha tracejada).

Em relação ao peso corporal, podemos observar que os animais dos grupos saudáveis (SS e ST) ganharam peso, durante os 10 dias de tratamento, enquanto os animais dos grupos isoproterenol (IS e IT) mantiveram o mesmo peso do início do tratamento (Figurs 24 e 25).

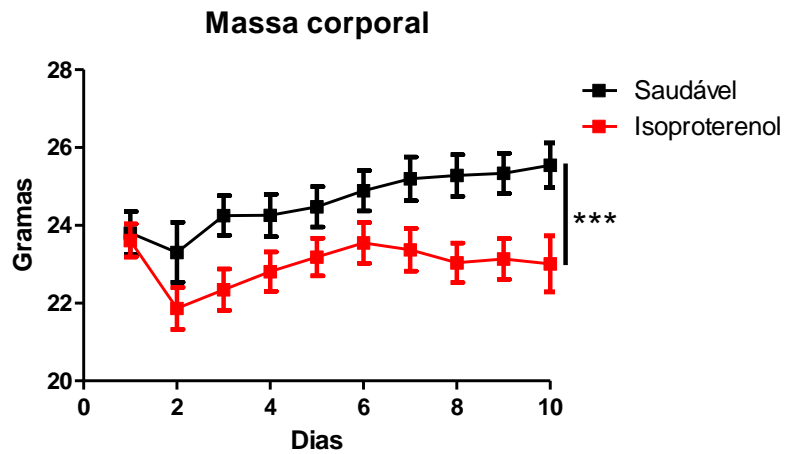


Figura 24 – Variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento com isoproterenol (vermelho) (n=15) e solução salina (preto) (n=15). \*p=0,0001.

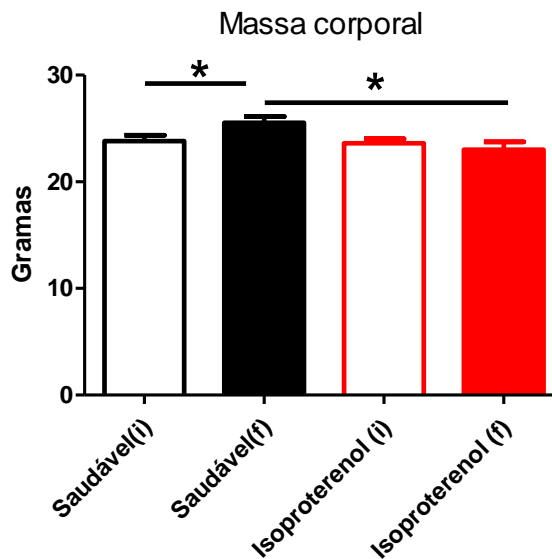


Figura 25 – Variação da massa corporal dos animais no início (i) e final (f) do tratamento com isoproterenol (n=15) e solução salina (n=15). \*p=0,01.

#### 4. Efeitos do treinamento aeróbico no peso corporal dos animais

Para determinar o efeito do treinamento aeróbico de 8 semanas no peso corporal dos animais, foi feita a aferição da massa corporal antes de iniciar as sessões de treinamento e ao final das 8 semanas de treino. Os resultados mostram que todos os animais ganharam peso com a idade, e que o treinamento aeróbico reduziu o ganho de peso corporal dos animais do grupo saudável treinado (Figura 26).

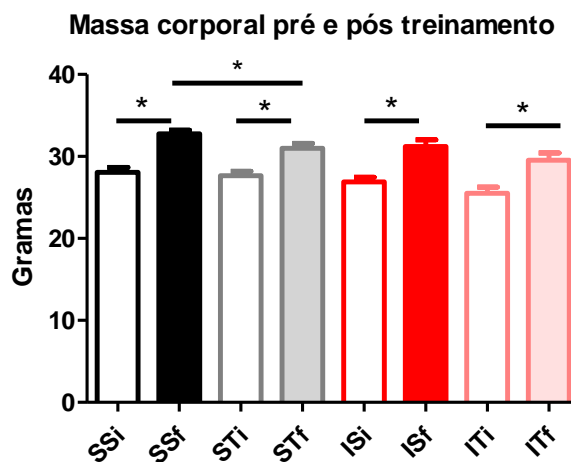


Figura 26 – Variação da massa corporal dos animais no início (i) e final (f) das 8 semanas de treinamento (n=15). \*\*\*p=0,0001.

#### 5. Efeitos da aplicação de isoproterenol e do treinamento aeróbico no condicionamento dos animais

Para determinar o efeito do treinamento aeróbico no condicionamento dos animais, os mesmos foram submetidos a um teste de esforço máximo antes de iniciar as sessões de treinamento e ao final das 8 semanas de treino. O parâmetro escolhido para detectar se o treinamento foi eficaz na melhora do condicionamento dos animais foi a velocidade máxima atingida durante o exercício progressivo até a fadiga (medida indireta).

Os resultados mostram que o treinamento aeróbico - 8 semanas - foi capaz de melhorar o condicionamento dos animais dos grupos ST e IT. Os animais destes grupos conseguiram alcançar uma maior velocidade máxima ao final das 8 semanas

de treino quando comparado com a velocidade máxima atingida antes do início das sessões de treinamento (figuras 27 e 29). Já os animais dos grupos saudável sedentário (SS) e isoproterenol sedentário (IS) não apresentaram diferença significativa neste parâmetro (Figuras 27 e 28).

#### Velocidade máxima pré (i) e pós (f) treino:

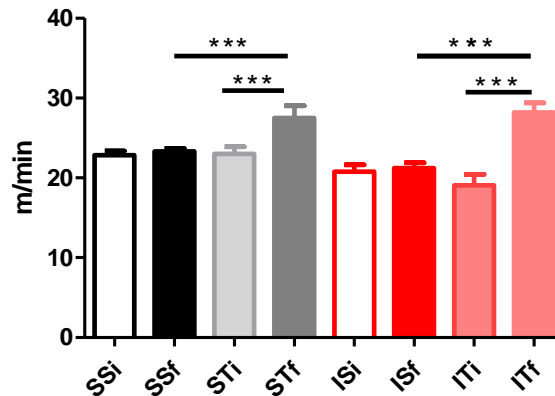


Figura 27 – Velocidade máxima atingida durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento, (n=15, cada grupo). \*\*\*p=0,0001.

#### Velocidade máxima pré (i) e pós (f) treino:

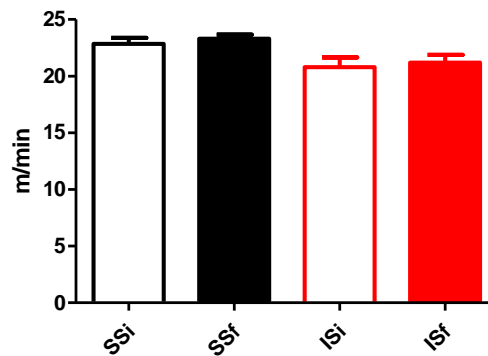


Figura 28 – Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos saudável sedentário (n=15) e isoproterenol sedentário (n=15) durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**Velocidade máxima pré (i) e pós (f) treino:**

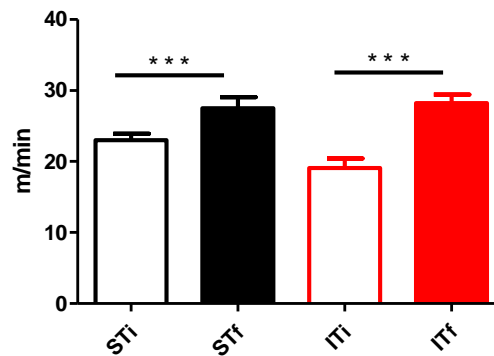


Figura 29 – Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos saudável treinado (n=15) e isoproterenol treinado (n=15) durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. \*\*\*p=0,0001.

O efeito do treinamento aeróbico no condicionamento dos animais também foi avaliado levando em consideração o princípio da individualidade biológica e para isto foi calculada a variação – delta - entre a velocidade máxima atingida antes e após o período de treinamento de cada animal (Figura 30).

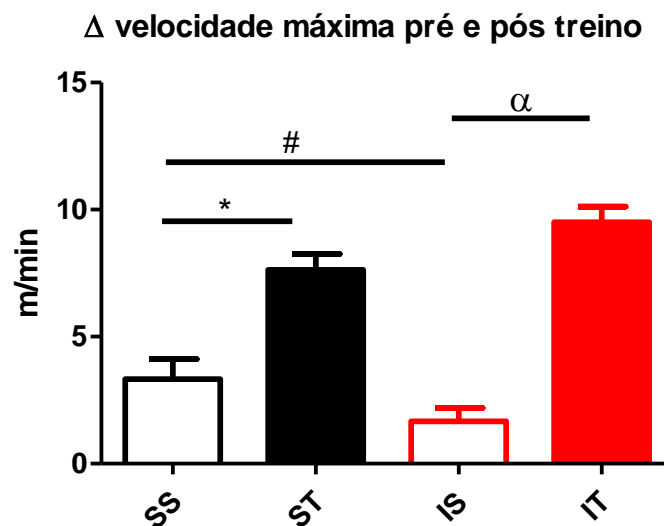


Figura 30 – Delta da velocidade máxima atingida pelos animais durante o exercício progressivo até a fadiga, no teste de esforço máximo, realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. (p=15, cada grupo) p=0,0001 (\*SSxST, #SSxIS, <sup>α</sup>ISxIT).

Os animais do grupo isoproterenol sedentário apresentaram uma menor capacidade aeróbia quando comparados com os animais do grupo saudável



sedentário. Por outro lado, o treinamento aeróbio melhorou a capacidade aeróbia tanto dos animais do grupo saudável treinado quanto isoproterenol treinado.

O efeito do treinamento aeróbio no condicionamento dos animais também pode ser avaliado por medida direta do consumo de oxigênio no repouso ( $VO_2$  repouso) e do consumo máximo de oxigênio durante exercício progressivo até a fadiga ( $VO_2$  máximo). Nas figuras 31 e 32, podemos observar que tanto a administração de isoproterenol quanto o treinamento aeróbio não causaram alteração no  $VO_2$  repouso e no  $VO_2$  máximo.

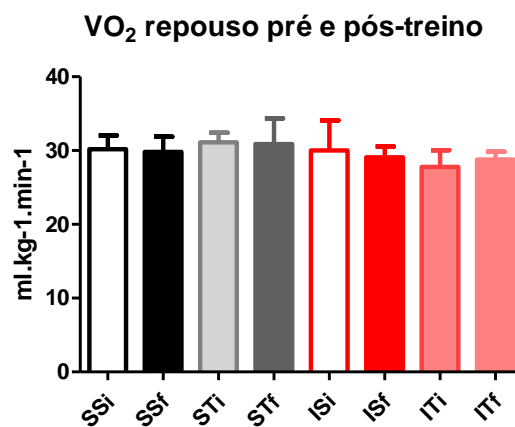


Figura 31 –  $VO_2$  de repouso realizado no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. (n=6, cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

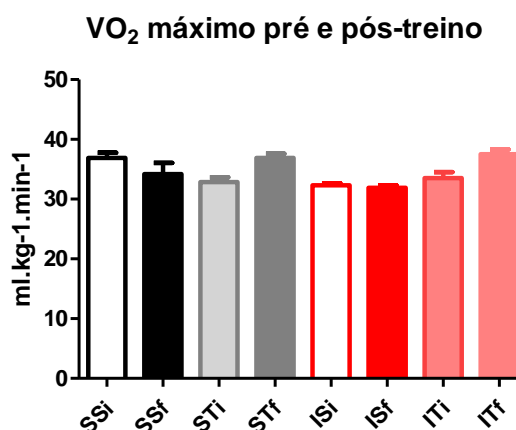


Figura 32 –  $VO_2$  máximo realizado durante exercício progressivo até a fadiga no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. (n=6, cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

## 6. Efeitos da aplicação de isoproterenol e do treinamento aeróbio nos parâmetros hemodinâmicos dos animais

Para determinar o efeito do treinamento aeróbio nos parâmetros hemodinâmicos, foram realizadas as medidas de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM), através da técnica de pletismografia, antes de iniciar as sessões de treinamento e ao final das 8 semanas de treino. Nenhum desses parâmetros foi alterado pelo efeito da administração de isoproterenol e pelo efeito do treinamento aeróbio (Figura 33).

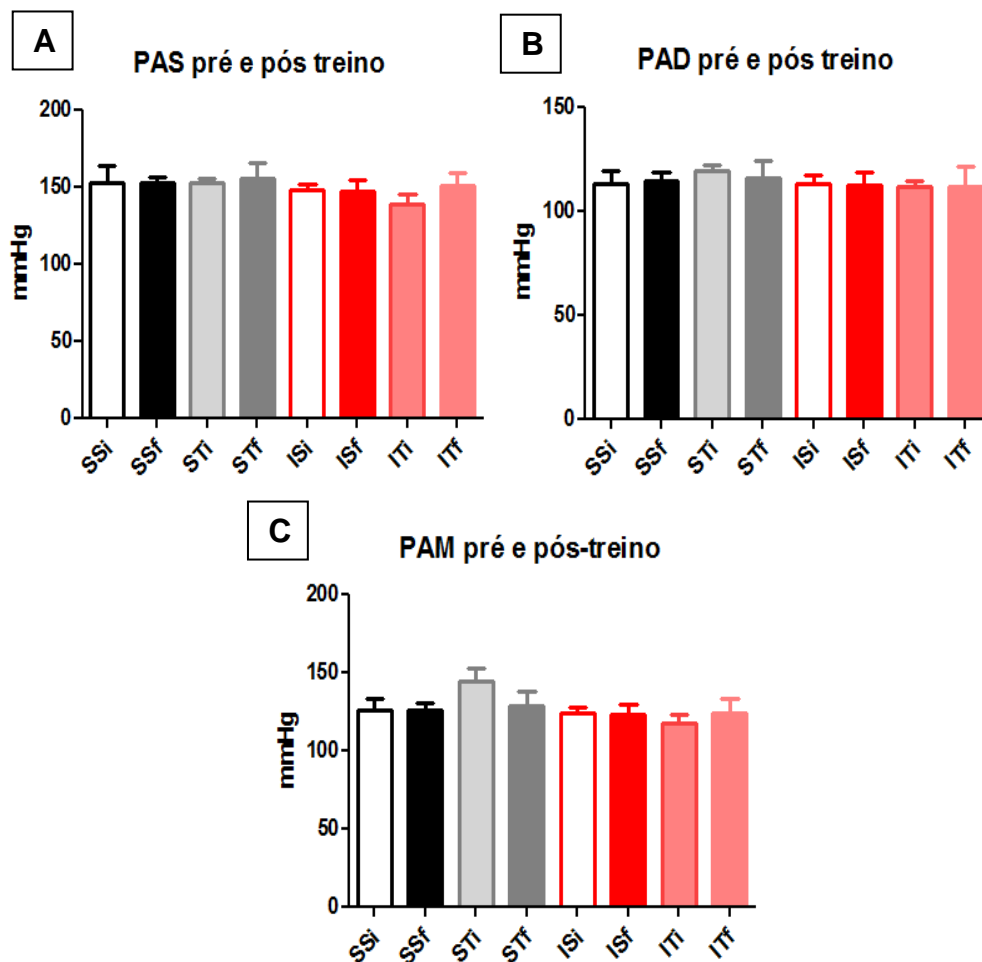


Figura 33 – Parâmetros hemodinâmicos, (A) pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica, (C) pressão arterial média, no início (i) e ao final (f) das 8 semanas de treinamento. (n=6, cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

## 7. Análise comparativa do perfil proteico do VE de animais dos grupos experimentais

Foram obtidos 16 géis bidimensionais (quatro géis por grupo), correspondendo a 4 replicatas biológicas de cada grupo (Figuras 34-37).

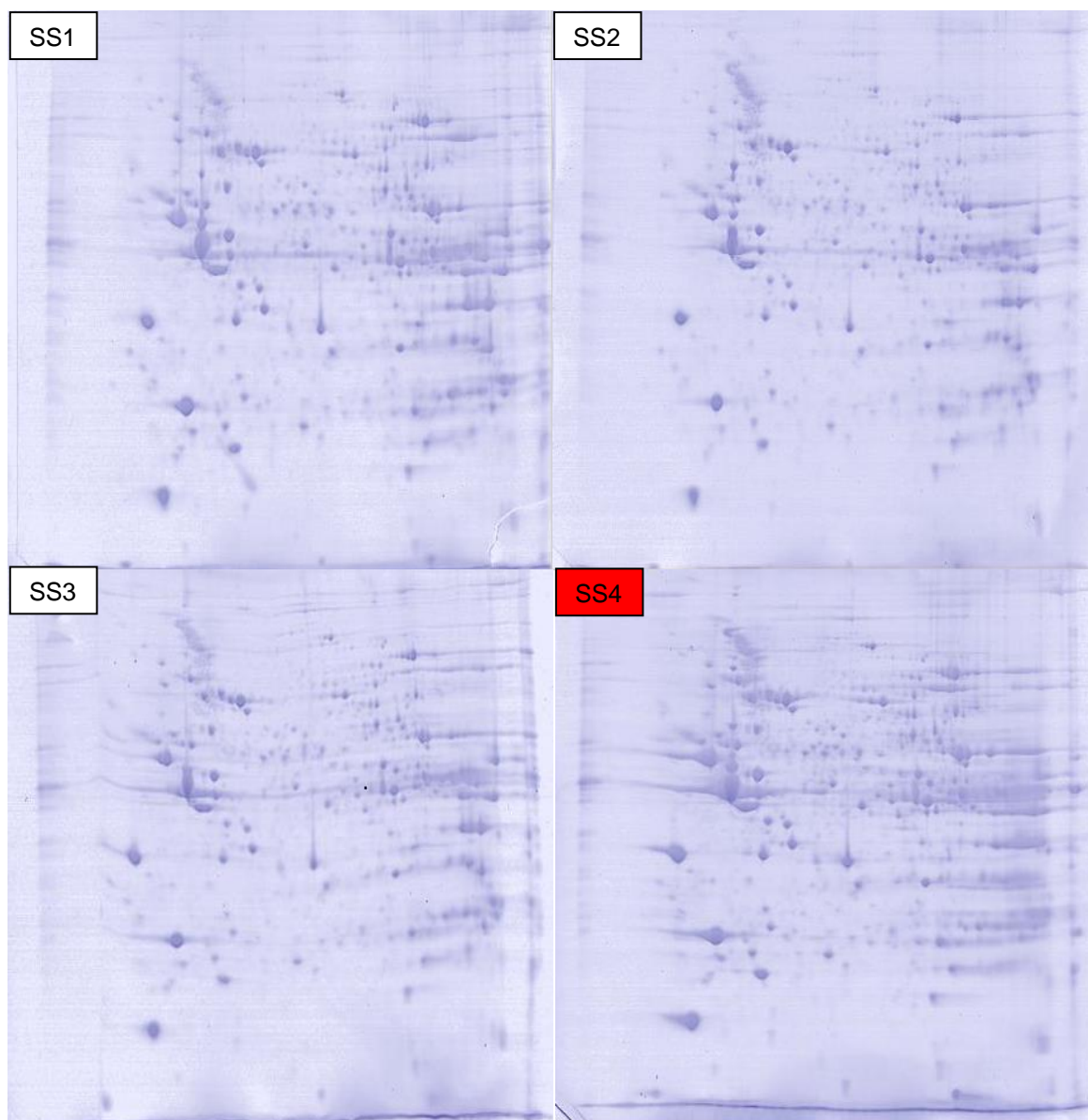


Figura 34 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo saudável sedentário. Aliquotas de 400µg de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 13 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. Em vermelho o gel de referência do grupo.

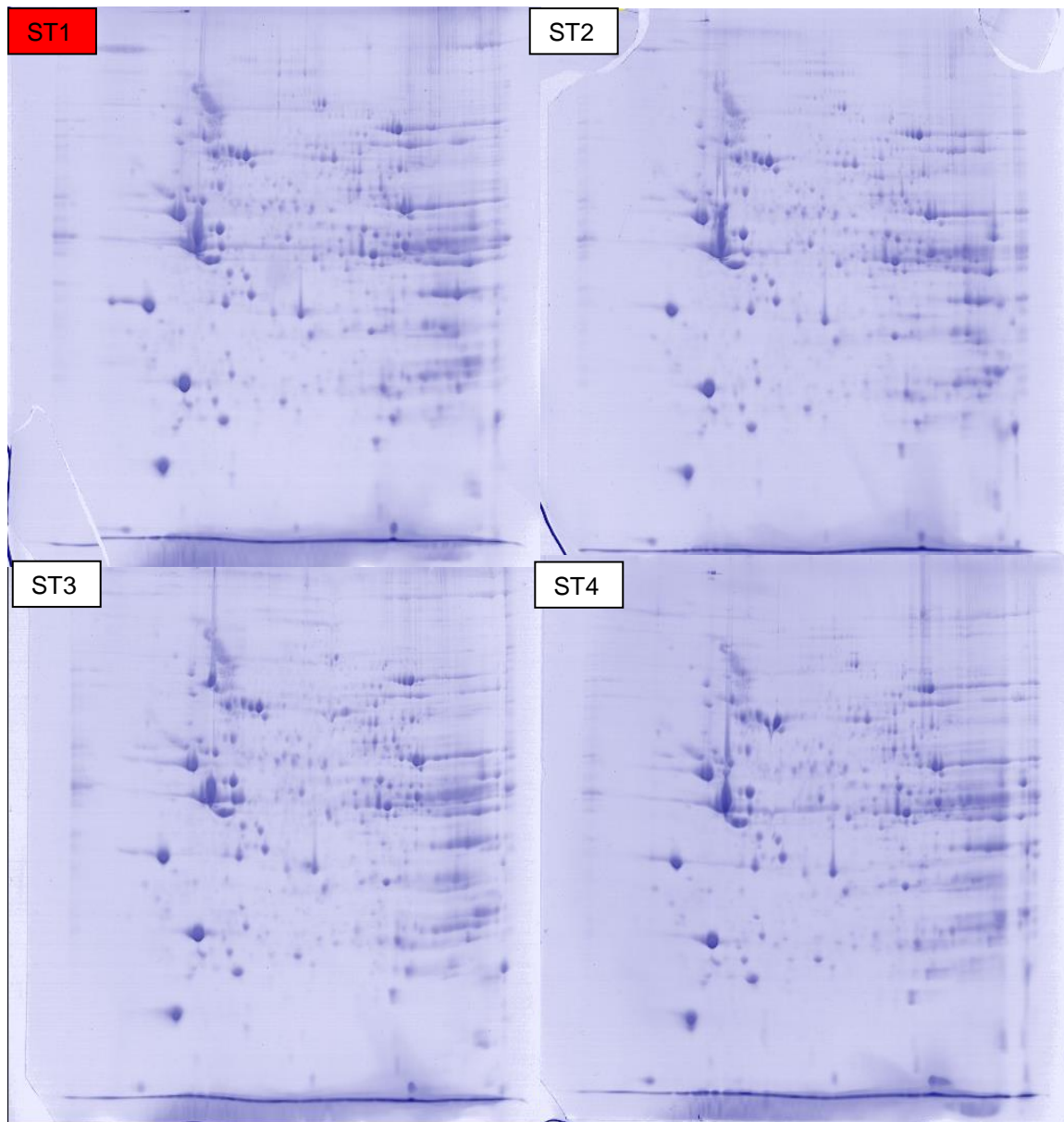


Figura 35 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo saudável treinado. Alíquotas de 400 $\mu$ g de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 13 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. Em vermelho o gel de referência do grupo.

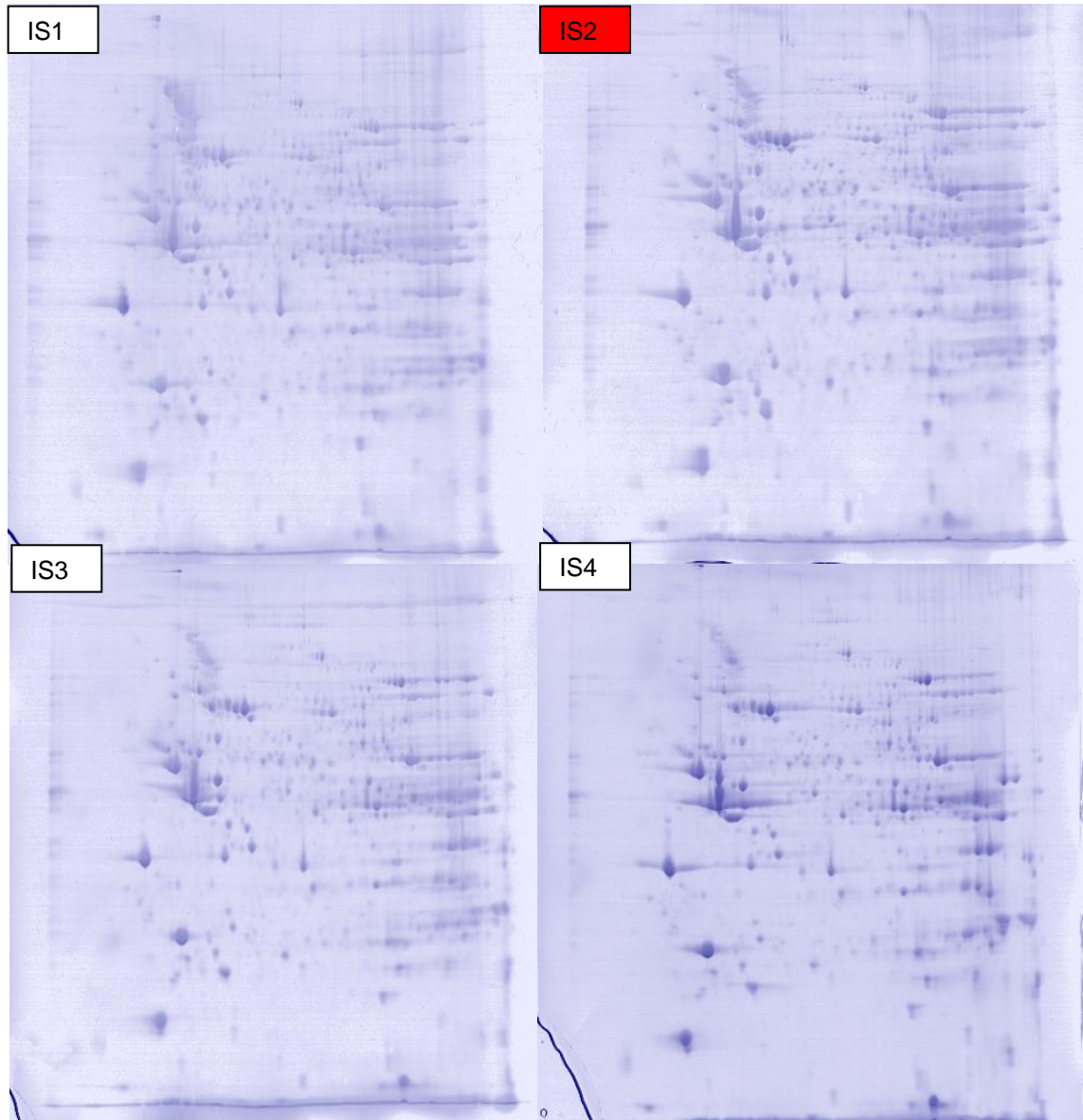


Figura 36 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo isoproterenol sedentário. Aliquotas de 400µg de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 13 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. Em vermelho o gel de referência do grupo.

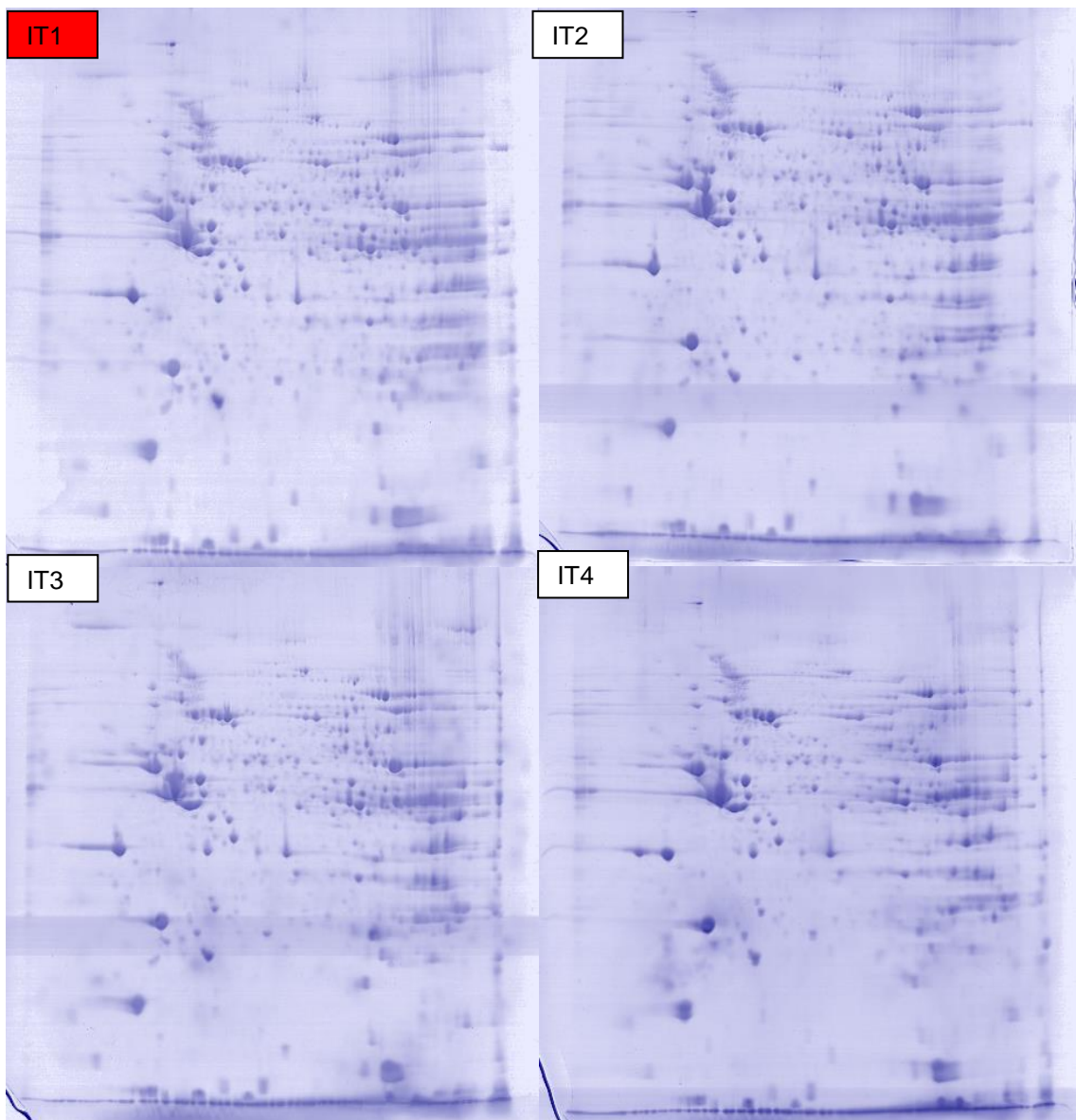


Figura 37 – Perfil proteico de amostras de ventrículo esquerdo de animais do grupo isoproterenol treinado. Alíquotas de 400 $\mu$ g de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 13 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. Em vermelho o gel de referência do grupo.

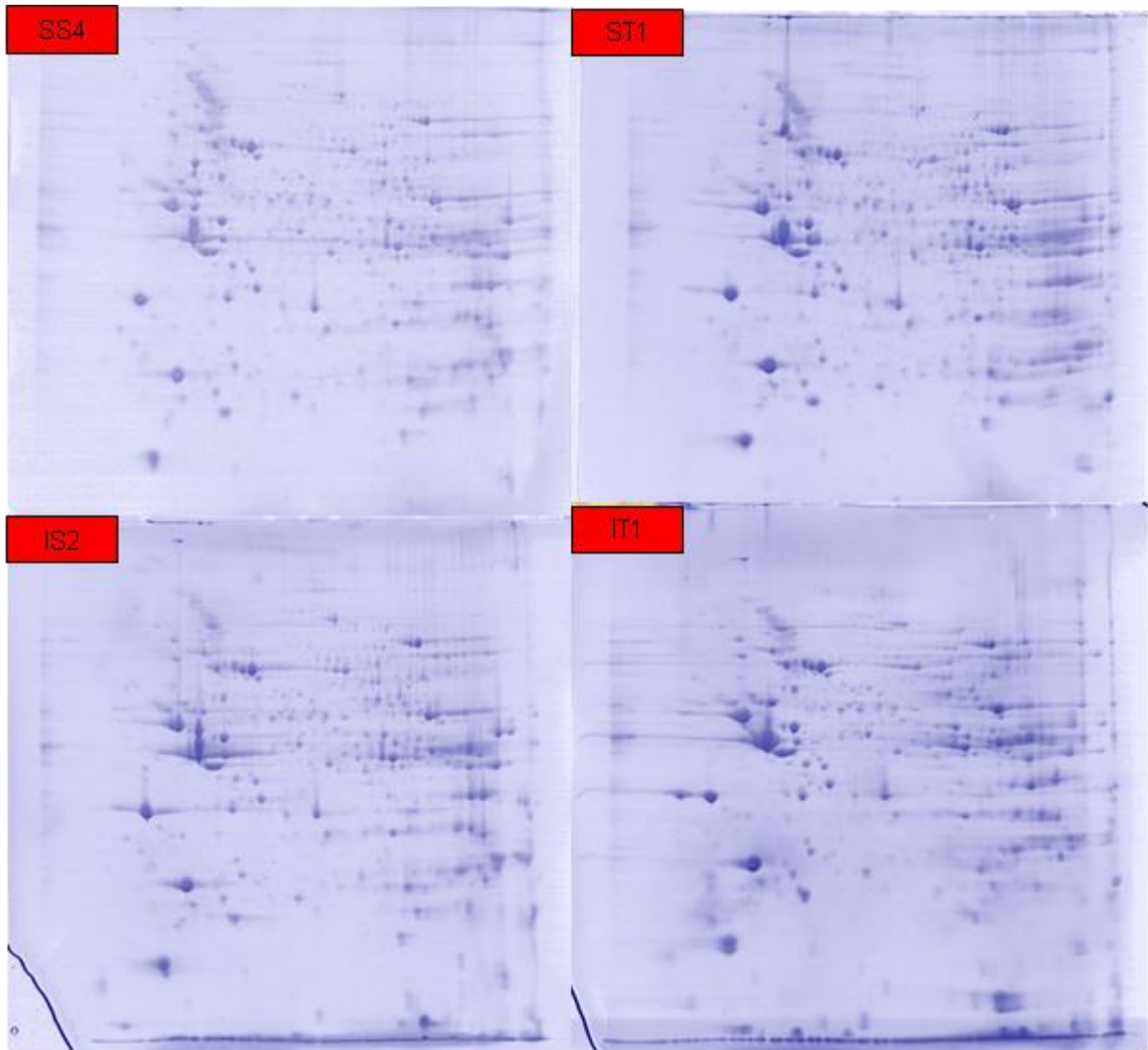


Figura 38 – Representação do géel de referência de cada grupo. O gel que apresentava o maior número de spots em cada grupo foi escolhido como o gel de referência do grupo.

A tabela 1 mostra o número de spots observados por gel após a edição dos mesmos pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05. O gel que apresentava o maior número de spots de cada grupo foi escolhido como o gel de referência do grupo (Figura 38).

GRUPO	GEL	NÚMERO DE SPOTS POR GEL	MÉDIA DO NÚMERO DE SPOTS
<b>SADÁVEL SEDENTÁRIO</b>	SS1	553	532
	SS2	506	
	SS3	477	
	SS4	594	
<b>SAUDÁVEL TREINADO</b>	ST1	474	457
	ST2	465	
	ST3	431	
	ST4	457	
<b>ISOPROTERENOL SEDENTÁRIO</b>	IS1	442	504
	IS2	621	
	IS3	449	
	IS4	506	
<b>ISOPROTERENOL TREINADO</b>	IT1	637	600
	IT2	614	
	IT3	629	
	IT4	522	

Tabela 1 – Número de spots observados no 2DE/SDS-PAGE para cada replicata biológica.

O coeficiente de correlação entre o gel referência com os demais géis de cada grupo e a equação da regressão linear que correlaciona a % de volume dos “spots” estão apresentados na Tabela 2. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente de correlação, maior é a reprodutibilidade dos géis. Já a equação  $y = \text{slope} * x + \text{offset}$ , o primeiro membro da equação indica o quanto em média os volumes dos “spots” são maiores (>1) ou menores (<1) que o volume do respectivo “spot” no gel de referência e o segundo membro da equação representa, por meio de uma unidade relativa, o deslocamento médio dos “spots” em relação aos respectivos “spots” no gel de referência.



RELAÇÃO ENTRE OS GÉIS	EQUAÇÃO	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	NÚMERO DE "MATCH"
SS4 x SS1	$y = 1.01x - 0.0123$	0.94	363
SS4 x SS2	$y = 0.925x - 0.0008$	0.88	372
SS4 x SS3	$y = 0.882x - 0.0007$	0.94	344
ST1 x ST2	$y = 1.02x - 0.0038$	0.96	303
ST1 x ST3	$y = 0.874x - 0.0147$	0.98	292
ST1 x ST4	$y = 0.799x - 0.0487$	0.95	303
IS2 x IS1	$y = 1.09x - 0.0312$	0.94	321
IS2 x IS3	$y = 0.839x - 0.0152$	0.94	326
IS2 x IS4	$y = 0.743x - 0.0453$	0.92	359
IT1 x IT2	$y = 1.03x - 0.0055$	0.97	409
IT1 x IT3	$y = 1.03x - 0.0031$	0.94	403
IT1 x IT4	$y = 0.782x - 0.0399$	0.95	339

Tabela 2 – Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos. As imagens foram relacionadas com a imagem do gel de referência de cada grupo.

A análise de fatores (Figuras 39) foi utilizada como ferramenta para a delimitação dos grupos a partir das imagens obtidas dos géis. Nestas figuras, os géis são representados pelos vetores em azul e os matchs são representados pelas cruzes vermelhas. A proximidade entre os vetores indica que estes, provavelmente, pertencem ao mesmo grupo ou população. A distância entre vetores e, principalmente, seu posicionamento em quadrantes distintos, indica maior probabilidade de diferença entre esses vetores (géis). Podemos observar que ao comparar os grupos de dois em dois (SSxST, SSxIS, ISxST, ITxIS, ITxST, ITxSS), as linhas representativas dos géis dos grupos distintos agrupam-se em quadrantes diferentes, o que sugere uma diferença no perfil protéico entre os grupos.

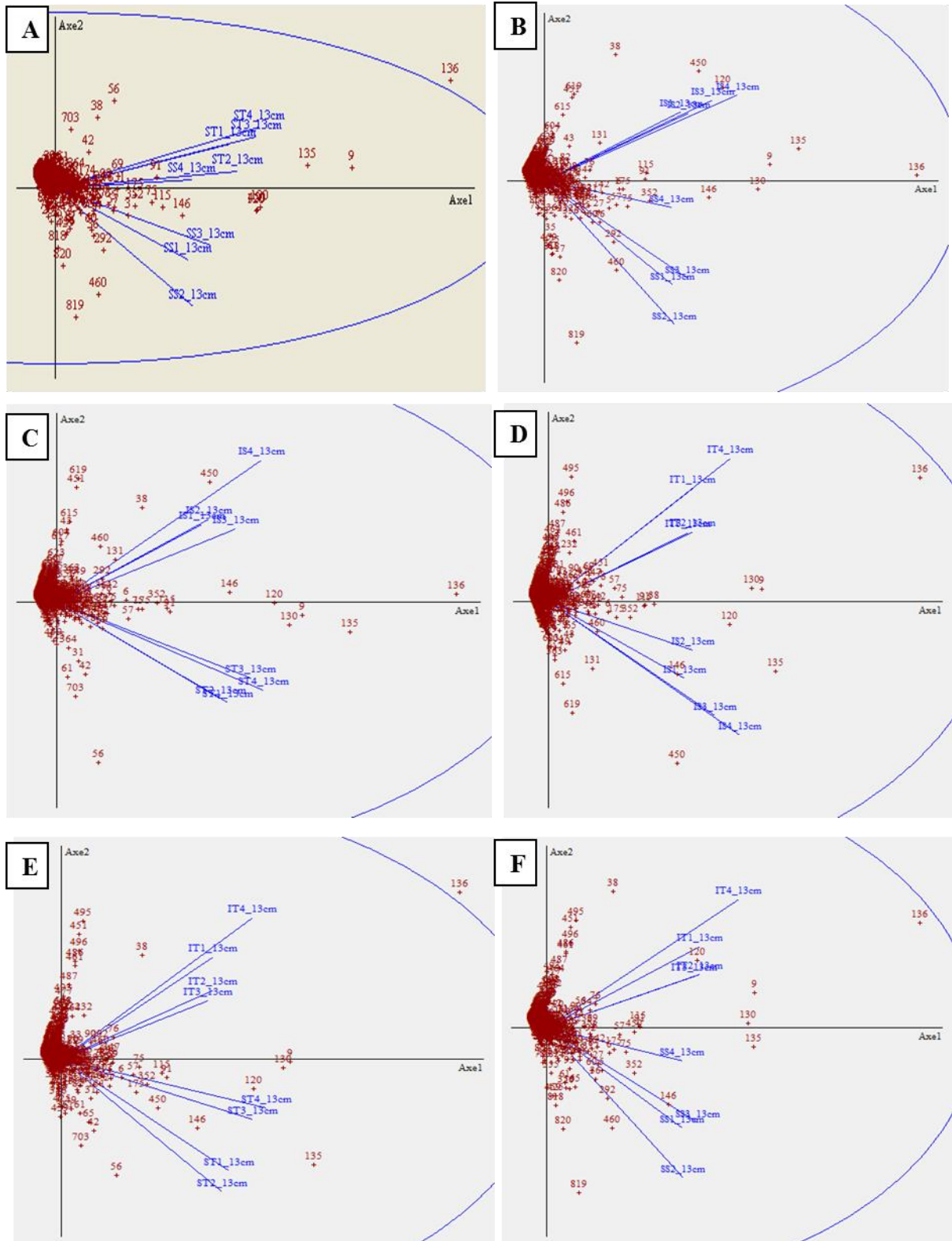


Figura 39 - Análise de fatores dos géis dos grupos experimentais. Gráfico e projeção dos géis: (A) saudável sedentário (SS) X saudável treinado (ST); (B) saudável sedentário (SS) x isoproterenol sedentário (IS); (C) isoproterenol sedentário (IS) x saudável treinado (ST); (D) isoproterenol sedentário (IS) x isoproterenol treinado (IT); (E) isoproterenol treinado (IT) x saudável treinado (ST); (F) isoproterenol treinado (IT) x saudável sedentário (SS). Os géis são representados pelos vetores em azul e os matchs são representados pelas cruces vermelhas.

Após as análises dos géis pelo software e autenticação dos spots por inspeção visual e normalização de seus volumes, foi realizada a análise quantitativa comparativa para identificação de spots proteicos com diferentes intensidades. Foram identificados 105 spots diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais (Figura 40).

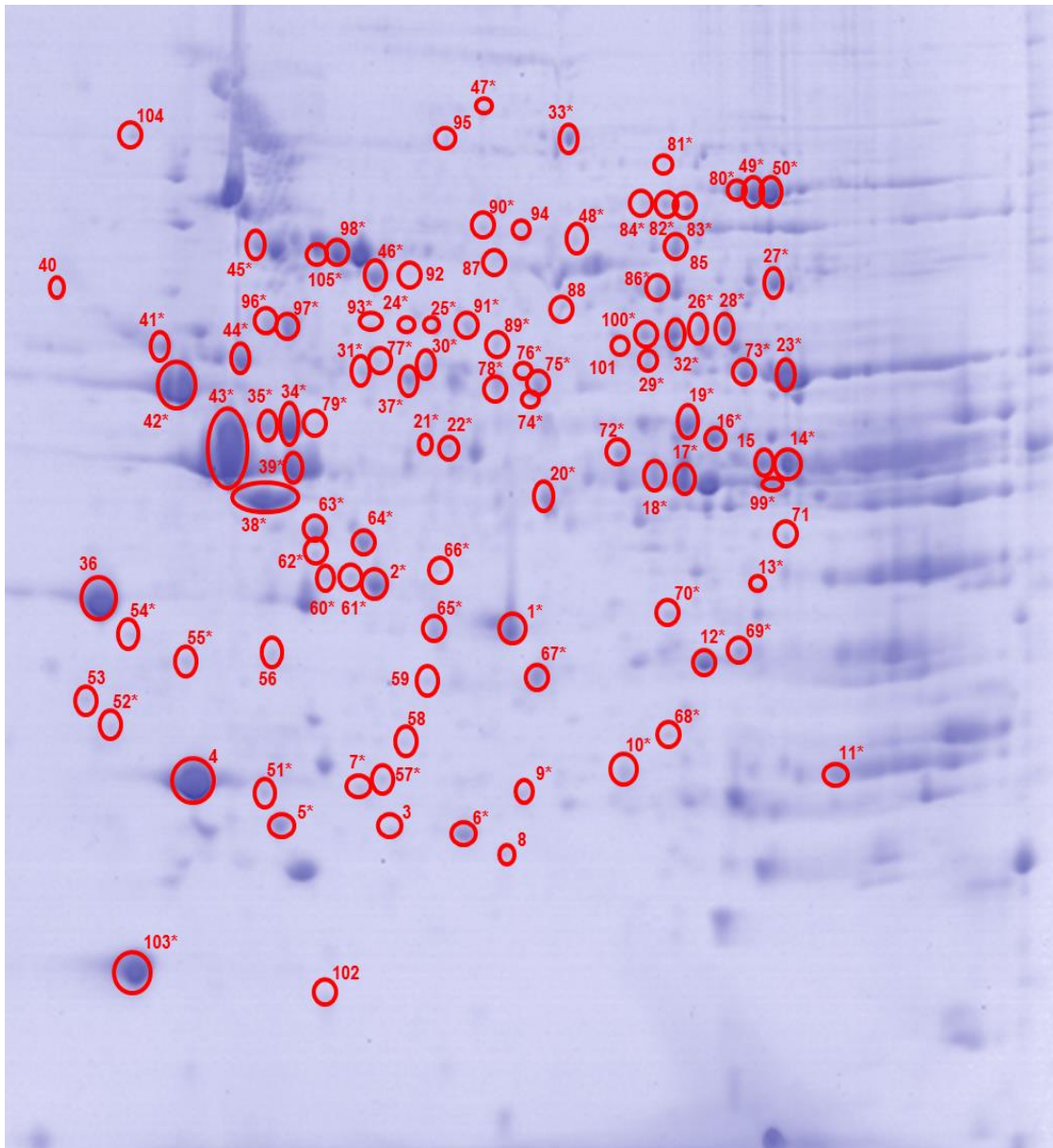


Figura 40 – Gel bidimensional representativo, mostrando a localização dos spots que apresentaram diferença de volume entre os grupos SS, ST, IS e IT ( $p < 0,05$ ). (\*) Proteínas identificadas por MS e MS/MS.

### 7.1 Identificação dos spots proteicos com diferentes intensidades

Dos 105 spots proteicos diferencialmente expressos, 99 foram removidos dos géis, devido ao fato de que os outros 6 encontravam-se em regiões não resolvidas dos géis o que impossibilitou a remoção. Os spots removidos foram processados para a análise por espectrometria de massa em sistema do tipo MALDI/TOF-TOF. A combinação dos espectros de massas resultantes (MS e MS/MS) foi utilizada para a identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBI por meio do software MASCOT® e 58 proteínas foram identificadas (Tabela 3).

A categorização funcional das proteínas identificadas foi feita a partir das anotações de três bancos de dados: GENE Ontology (<http://www.geneontology.org/>); PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e Uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)). As proteínas identificadas pertencem a várias classes funcionais, incluindo metabolismo (proteínas envolvidas na glicólise, metabolismo de glicogênio e de lactato, ciclo do ácido tricarboxílico, síntese de ATP, cadeia de transporte de elétrons, metabolismo de ácidos graxos e de aminoácidos), estresse oxidativo, proteínas de choque térmico e estruturais (Figura 41).

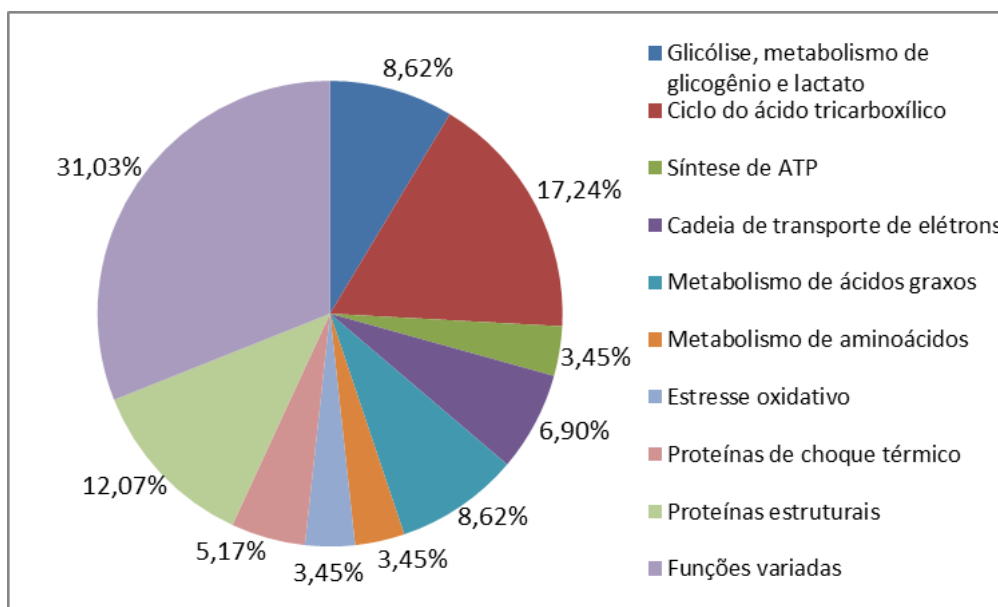


Figura 41 - Classificação funcional das proteínas identificadas.

As proteínas identificadas foram carregadas na base de dados do STRING (*Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), versão 10.0, uma ferramenta de bioinformática para extrair as possíveis interações existentes proteína-proteína. Na figura 42, está representada a rede de interações das proteínas, sendo que as que apresentaram interações entre si foram agrupadas (clusterizadas) de acordo com suas classificações funcionais e as que não apresentaram nenhuma interação foram excluídas da análise.

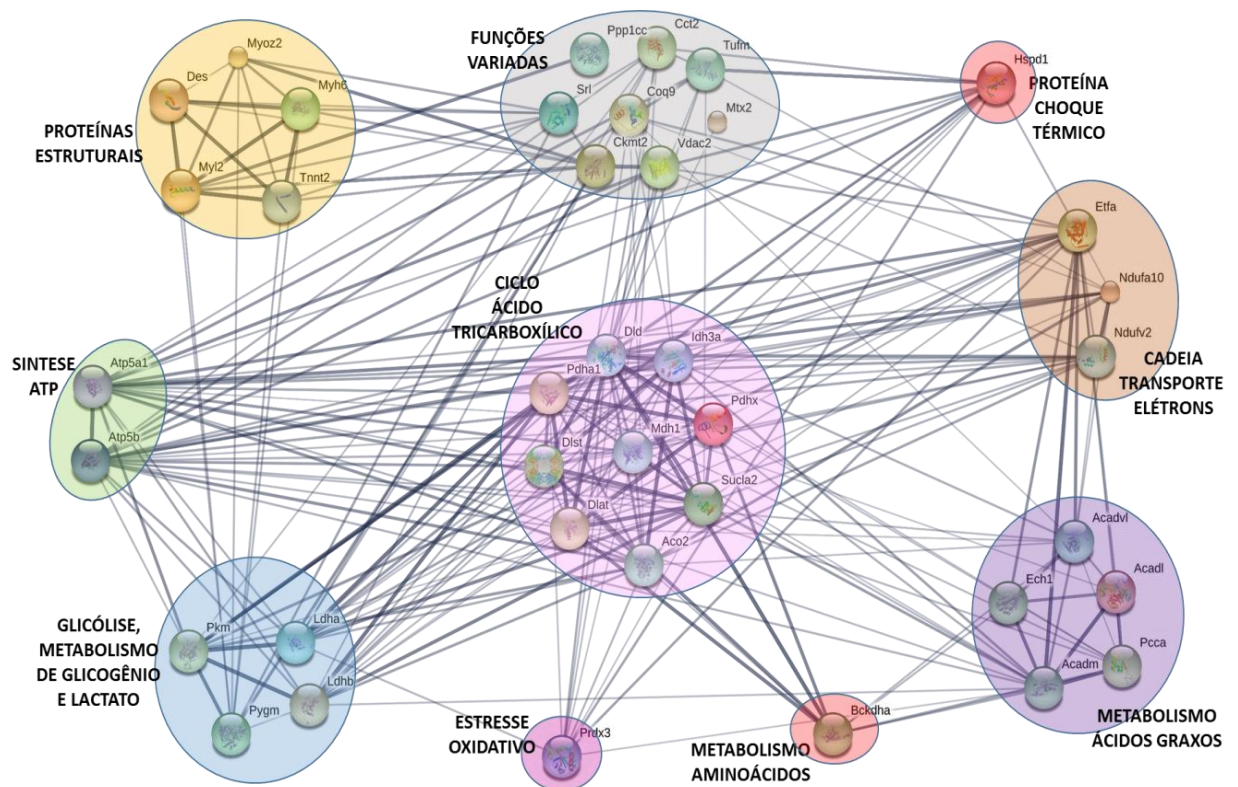


Figura 42 - Rede de interações das proteínas identificadas e clusterização de acordo com suas classificações funcionais. As linhas representam interações existentes entre as proteínas (linha única representa apenas uma interação e linha dupla representa mais de uma interação). Esta rede foi construída através do String. Foram consideradas fontes de interação ativa todos os parâmetros disponibilizados pelo programa com score de interação mínimo de 0.900 de confiança.

A tabela 3 mostra a identidade dos spots proteicos diferencialmente expressos e a função molecular e os processos biológicos relacionados às proteínas identificadas. As tabelas 4-9 mostram os dados da análise estatística e a alteração do volume normalizado dos spots proteicos identificados, entre os grupos experimentais.

Tabela 3 - Identidade dos “spots” proteicos diferentemente expressos entre os grupos SS, ST, IS e IT, e classificação funcional das proteínas identificadas. Homologia com a taxonomia *Mus musculus*.

Ref. #	Nome da proteína	Número de acesso	Massa (KDa) teórica	pl teórico	Mascot Score	% de cobertura	Sequência de peptídeos	Processo biológico	Função molecular
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e de lactato</b>									
19	Enolase 3, beta muscle, isoform CRA_a (Eno3)	gi6679651	47kDa	6.81	216	10%	GNPTVEVDLHTAK; AAVPSGASTGIYEALRLR; VVIGMDVAASEFYR;	Glicólise	Ligante ao íon magnésio e atividade de fosfopiruvato hidratase.
81	Glycogen phosphorylase, muscle form (Pygm)	gi6755256	97kDa	6.65	156	5%	NLAENISR; VAAAFPGDVDR; VIFLENYR; GYNAQEYYDR; EIWGVEPSR;	Metabolismo de carboidrato e glicogênio	Glicosiltransferase e transferase
13	Lactate dehydrogenase A chain protein, partial (Ldha)	gi13529599	38kDa	6.56	218	10%	LVIIITAGAR; VIGSGCNLDSAR; VTLTPEEEAR;	Glicólise e metabolismo do lactato	Oxidoreductase e NAD ligante
2	L-lactate dehydrogenase B chain (Ldhb)	gi6678674	36kDa	5.72	570	22%	IVADKDYSVTANSKIVVVTAGVR; FIIPQIVK; VIGSGCNLDSAR; IHPVSTMVK; LKDDEVAQLR; SADTLWDIQK;	Glicólise e metabolismo do lactato	Oxidoreductase e NAD ligante
28	Pyruvate kinase, muscle isoform M1 (Pkm)	gi359807367	58kDa	7.42	459	13%	LDIDSAPITARNTGIICITGPASR; IENHEGVR; GDYPLEAVR; LLFEELVR; APIIAVTR; DAVLNAWAEDVDLR;	Glicólise	Kinase, transferase e ATP ligante
<b>Proteínas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico</b>									
50	Aconitase hydratase, mitochondrial precursor (Aco2)	gi18079339	82kDa	7.40	1806	19%	VAMSHFEPSEYIR; LNRPLTLSEKIVYGHLLDDPANQEIER; EGWPLDIR; SQFTITPGSEQIR; DGYAQILRDVGGIVLANACGPCIGQWD ; NTIVTSYNR; FKLEAPDADELPR; NAVTQEFQVPDPTAR; WVVIGDENYEGSSREHAALPR;	Metabolismo do citrato e isocitrato	Liase e ligante ao íon ferro
32	Dihydrolipoamide dehydrogenase (Dld)	gi148704970	50kDa	6.50	165	6%	GIEIPEVR; SEEQLKEEGIEFK; VCHAHPTLSEAFR;	Ciclo do ácido tricarboxílico	Oxidoreductase

46	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase precursor (Dlat)	gi16580128	59kDa	5.7	555	14%	VPLPSLSPTMQAGTIAR; ILVPEGTR; VFVSPSLAK; AAPAAAAAMAPPGPRVAPAGVFTDI PISNR; VPEANSSWMDTVIR;	Ciclo do ácido tricarbóxico	Aciltransferase
37	Dihydrolipoilysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (Dlst)	gi21313536	41kDa	5.90	649	12%	VEGGTPLFTLR; AKPAETPAPAHK; DYIDISVAVATPRGLVVPVIRNVETMNY ADIER;	Ciclo do ácido tricarbóxico	Aciltransferase
63	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_b (ldh3a)	gi148693872	37kDa	5.59	680	22%	APIQWEER; TPIAAGHPSMNLRLR; TFDLYANVRPCVSIIEGYKTPYTDVNIIVT IR; LITEEASKRIAEFAFEYAR; CSDFTTEICR;	Ciclo do ácido tricarbóxico	Oxidoreductase
1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble), isoform CRA_c (Mdh1)	gi148675904	40kDa	5.69	435	17%	DLDDAVLVGSMR; ENFSCLTR; NVIIWGNHSSTQYPDVNHAK; GEFITTVQQR; FVEGLPINDFSR;	Metabolismo de carboidrato e malato	Oxidoreductase
33	Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide), isoform CRA_f (Ogdh)	gi148708639	111kDa	6.05	494	9%	NTNAGAPPGTAYQSPSLSLR; LVEDHLAVQSLIR; LNVLANVIR; SSPYPTDVAR; ICEEAFTR; VASSVPVENFTIHGGLSR; AKPVWYAGR; THLTELR;	Ciclo do ácido tricarbóxico	Oxidoreductase
16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor (Pdha1)	gi6679261	40kDa	6.51	314	18%	LEEGPPVTTVLTR; AHGFTFTR; AILAELTGR; LPCIFICENNRVGMGTSVER; VDGMDILCVR; TREEIQEVR;	Metabolismo de carboidrato/ ciclo do ácido tricarbóxico	Oxidoreductase
30	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial (Pdhx)	gi28201978	48kDa	6.01	252	6%	HSLDASQGTATGPR; VSVNDFIIR; VVDELATR;	Metabolismo do piruvato	Transferência de grupos acil
39	Succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit, isoform CRA_b (Sucla2)	gi148703906	48kDa	8.77	150	5%	ICNQVLVCER; INFDSNSAYR;	Ciclo do ácido tricarbóxico	Ligase
<b>Síntese de ATP</b>									
23	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (Atp5a1)	gi6680748	55kDa	8.28	1019	14%	TGTAEMSSILEERILGADTSVDLEETGR VLSIGDGIAR; TGAIVDVPVGEELLGR; AVDSLVPVIGR; EAYPGDVLYLHSR;	Síntese de ATP e transporte de íons de hidrogênio	Hidrolase

42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (Atp5b)	gi23272966	52kDa	5.00	1028	29%	LVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTEGLVR; IPVGPETLGRIMNVIGEPIDER; HGGYSVFAGVGER; VALVYQGMNEPPGAR; VALTGLTVAEYFRDQEGQDVLFFIDNIF RFTQAGSEVSALLGR; AIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIVGN EHYDVAR;	Síntese de ATP e transporte de íons de hidrogênio	Hidrolase
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>									
12	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide (Etf $\alpha$ )	gi13097375	33kDa	7.10	383	15%	VLVAQHDAYK; LNVAPVSDIIEIK; SDRPELTGAK; LLYDLADQLHAAVGASR;	Transporte de elétrons	Oxidoreductase
20	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial precursor (Ndufa10)	gi13195624	37kDa	5.96	154	5,4%	QDDWT; FHYLR; LQSWLYASR;	Transporte de elétrons	Oxidoreductase
5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial isoform 1 precursor (Ndufv2)	gi110625954	24kDa	5.31	335	22%	NYPEGHQAAAVLPVLDLAQR; VAEVLQVPPMRVYEVATFYTMYNR; DSDSILETLQR;	Transporte de elétrons	Oxidoreductase
29	Sorting and assembly machinery component 50 homolog (Samm)	gi30519943	52kDa	6.44	262	9,2%	VTGQFPWSSLR; ; FYLGGPTSVR; WSYGAGVVLR; ICDGVQFGAGIR;	Montagem do complexo da cadeia respiratória mitocondrial.	Manutenção da estrutura da crista mitocondrial e montagem correta dos complexos da cadeia respiratória.
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>									
99	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain (Acadm)	gi15488707	44kDa	7.02	319	13%	GIAFEDVR; IAMGAFDRTRPTVAAGAVGLAQR; AAWEVDSGR; IYQIYEGTAQIQR;	Metabolismo de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação)	Oxidoreductase
67	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor (Ech)	gi7949037	32kDa	6.01	499	20%	ELVECFQK; YCTQDAFFQIKEVDMGLAADVGTLQR; VIGNQSLVNELTFSAR; MMADEALDSGLVSR;	Metabolismo de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação)	Isomerase
17	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor (Acadl)	gi31982520	45kDa	6.50	410	10%	KLTDIGIR; IFSSEHDIFR; AQDTAELFFEDVR; GFYYLMQELPQER;	Metabolismo de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação)	Oxidoreductase



90	Propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit (Pcca)	gi15667251	74kDa	6.16	272	8%	IAWDEETR; FSSQEASSFGDDR; SFGLPSIGR; LVTYGSDR; GHTLTLSEK; VPVIRPDVAK; EATQAVLDKPELSSDASTR; ELVGPVAR; ELGAFGLQVPSELGGLSNTQYAR; VASGQALAAFCLTEPSSGSDVASIR; ITAFVVER; VAVNILNNGR; IFEGANDILR; TGIGSGLSLSGIVHPELSR; GIVNEQFLQR;	Metabolismo de ácidos graxos (processo catabólico)	Ligase
27	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor (Acadvl)	gi23956084	66kDa	7.72	628	21%	EATQAVLDKPELSSDASTR; ELVGPVAR; ELGAFGLQVPSELGGLSNTQYAR; VASGQALAAFCLTEPSSGSDVASIR; ITAFVVER; VAVNILNNGR; IFEGANDILR; TGIGSGLSLSGIVHPELSR; GIVNEQFLQR;	Metabolismo de ácidos graxos (β-oxidação)	Oxidoreductase
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>									
62	Branched chain ketoacid dehydrogenase E1 component beta chain (Bckdhh)	gi40353220	38kDa	5.26	267	11%	DPTAVIFGEDVAFGGVFR; SGDLFNCGLTIR; LGVSCEVIDLR;	Processo catabólico de aminoácido	Oxidoreductase
22	Branched chain ketoacid dehydrogenase E1 component alpha chain (Bckdha)	gi13277798	45kDa	6.32	138	6%	TDLVFGQYREAGVLMYR; VMEAFEQAER;	Processo catabólico de aminoácido	Oxidoreductase
<b>Estresse oxidativo</b>									
25	Protein disulfide-isomerase A3 precursor (Pdia3)	gi112293264	54kDa	5.69	180	8%	LAPEYEAATR; DASVVGFFR; LNFAVASR; ELNDFISYLQR;	Homeostase redox celular	Isomerase
6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor (Prdx3)	gi6680690	21kDa	5.77	365	21%	GTAVVNGEFKELSLDDFK; DYGVLLSAGIALRGLFIIDPNGVVKHL SVNDLPVGR;	Resposta ao estresse oxidativo	Antioxidante
<b>Proteínas de choque térmico</b>									
97	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hspd1)	gi183396771	60kDa	5.35	849	15%	TVIEQSWGSPK; LVQDVANNTNEEAGDGTATVLR; GANPVEIR; ISSVQSIVPALEIANHR; APGFGDNR; AAVEEGIVLGGGCALLR; NAVVTVPAYF; NDSQR; DSTAGDTHLGG; VEIIA;	Resposta ao estresse	Chaperona
45	Heat shock cognate 71 kDa protein (Hspa8)	gi13242237	71kDa	5.37	368	12%	AGTIAGLNVLEDFDNR; FEELNADLF; NDQGNRTTPS; R; R; YVAFTDTER; TVT;	Resposta ao estresse	Chaperona

9	Heat shock protein beta-1 (Hspb1)	gi158937312	23kDa	6.12	480	25%	SPSWEPFRDWYPAH SRLFDQAFGVP R; QDEHGYISR; AVTQSAEITIPVTFEAR;	Resposta ao estresse	Chaperona
<b>Proteínas estruturais</b>									
61	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2, isoform CRA_a (Capza2)	gi148681931	33kDa	5.58	123	8%	LLLNDNLLR; TSVETALR;	Regulação da polimerização da actina	Ligante a parte final do filamento de actina / bloqueio da adição de novas subunidades
44	Desmin (Des)	gi148667985	53kDa	5.21	652	24%	TFGGAPGFSLG SPLSSPVFPR; APSYGAGELLDFSLADAVNQEFLATR; FLEQQNAALAAEVNR; LQEEIQLR; FASEANGYQDNIAR; HLKDEMAR; MARLDVEIATYR; INLPIQTFSALNFR;	Contração muscular e organização do citoesqueleto	Ligante a proteína do citoesqueleto
10	Myosin 6 (Myh6)	gi148704367	223kDa	5.59	133	1%	LEAQRPFDIR; VIQYFASIAAIGDR;	Regulação da frequência cardíaca e força de contração do coração	Proteína motora
4	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform (MyI2)	gi153791853	19kDa	4.83	299	30%	EAFTIMDQNRDGFIDKNDLRDTFAALGR; GADPEETILNAFK; EMLTTQAER;	Contração do músculo cardíaco.	Contração muscular
70	Myozenin-2 (Myoz2)	gi10946916	30kDa	8.53	94	8%	YTFENFQYESR; FLAFANPLSGR;	Modulação da sinalização da calcineurina	Ligante a calcineurina
38	Troponin T2, cardiac, isoform CRA_a (Tnt2)	gi148707615	36kDa	4.94	651	27%	DAEEGPVEDTKPKPSR; VDFDDIHR; DLNELQTLIEAHFENRKKKEEELISLK; REEEENRR; KALAIHNLNEDQLR;	Contração cardíaca	Ligante de actina
47	Vinculin, isoform CRA_b (Vcl)	gi148669535	116kDa	5.77	167	4%	DYLIDGSR; WIDNPTVDDR; AANFENHSGR; ELTPQVISAAR;	Adesão celular	Ligante de actina
<b>Funções variadas</b>									
52	14-3-3 protein gamma (Ywhag)	gi3065929	28kDa	4.80	153	10%	NVTELNEPLSNEER; DSTLIMQLLR	Regulação de processos transduccionais	Ligante ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina e inibição da proteína quinase C

48	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precursor (Acss1)	gi18034773	70kDa	5.98	252	6%	ELLETTTCR; AVITFNQGLR; INQFYGAPTAVR; TEGGYQITGR;	Processo de biossíntese de Acetil-CoA	Ligase
54	Annexina A5 protein, isoform CRA_b (Anxa5)	gi148703127	36kDa	4.82	221	18%	GTVTDFPGFDGRADAEVLRK; VLTEIIASR; FITIFGTR; GAGTDDHTLIR; SEIDLFNIR;	Coagulação sanguínea	Ligante ao íon cálcio e inibidor da fosfolipase
91	Bifunctional epoxide hydrolase 2 isoform a (Ephx2)	gi31982393	62kDa	5.85	342	14%	VAAFDDLDGVLALPSIAGAFR; SEEALALPR; ITFSQWVPLMDESIR; AKPNEVVFLDDFGSNLKPAP;	Detoxificação e metabolismo de lipídeos	Hidrolase
68	Carbonic anhydrase 2 (Car2)	gi157951596	29kDa	6.48	110	7%	DFPIANGDR; GGPLSDSYR;	Via de sinalização ativada pela angiotensina	Liase
79	Creatine kinase B-type (Ckb)	gi10946574	42kDa	5.40	142	8%	VLTPELYAELR; GTGGVDTAAGVGVDFVSNADR;	Metabolismo da creatina	Kinase and transferase
14	Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor (Ckmt2)	gi38259206	43kDa	7.72	394	16%	LFPPSADYDPLR; GLSLPPACSR; LGYILTCPNLGTGLR; GTGGVDTAAGVADYDISNIDR; VPPPLPQFGR;	Metabolismo da creatina e contração muscular	Kinase and transferase
72	Elongation factor Tu, mitochondrial (Tufm)	gi254911131	45kDa	6.20	483	18%	KYEEIDNAPEER; GITINAAHVEYSTAAR; GEETPVIVGSALCALEQR; LLDAVDYIPVPTR; GTVVVTGTLER; AEAGDNLGALVR;	Imunidade adaptativa e inata, coagulação sanguínea e homeostase	Chaperona.
89	Fibrinogen beta chain precursor (Fgb)	gi33859809	51kDa	8.35	366	13%	ENENVINEYSSILEDQRLYIDETVNDNIP LNL; TENGGWTVIQNR; EDGGGWYNYR; IRPFFPQQ;	Biossíntese de proteína	Fator de alongamento
51	Metaxin 2, isoform CRA_a (Mtx2)	gi148695235	30kDa	5.44	321	24%	GHSLSDGLDEVQK; TLDQVLEDVDQCCQALSQR LGTQPYPF FNK; NYSNLLAFCR;	Transporte de proteína	Proteína alvo para mitocôndria
75	Sarcalumenin, isoform CRA_a (Srl)	gi148664814	97kDa	4.38	304	10%	TIEGIVMAADSAR; VTFVDTPGIIENR; ADNLATQMLMR; IHALLVDR;	Resposta a atividade muscular /envolvida na regulação da adaptação muscular	Ligante ao GTP

66	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit isoform 1 (Ppp1cc)	gi11968062	37kDa	6.14	84	6%	GNHECASINR; HDLPLICR;	Divisão celular, regulação do metabolismo de glicogênio, contratilidade muscular e síntese de proteínas	Hidrolase e fosfatase
105	Serum albumin precursor (Alb)	gi163310765	66kDa	5.80	1000	19%	YNDLGEQHFHFK; LCAIPNLR; DVFLGTFLYEYSR; LGEYGFQNAILVR; APQVSTPTLVEAAR; CCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR; RPCFSALTVDETYVPK; AADKDTCFSTEGPNLVTR;	Detoxificação de oxidantes celulares	Antioxidante, ligante a chaperona e ácidos graxos
93	Sulfite oxidase, mitochondrial precursor (Suox)	gi74024924	51kDa	5.24	106	3%	VVVPGVVGAR; GYAWSGGGR;	Resposta a nutriente	Oxidoreductase
76	T-complex protein 1 subunit beta (Cct2)	gi126521835	57kDa	5.98	85	4%	LAVEAVLR; GATQQILDEAER;	Montagem do complexo de proteínas mediadas por chaperona e estabilização proteica	Chaperona
78	Tripartite motif-containing protein 72 (Trim72)	gi121247302	53kDa	6.01	85	4%	LLPAAEAQAR; ILSESPPPAR;	Excitose e transporte	Ligante a fosfatidilserina
55	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor (Coq9)	gi33859690	30kDa	4.93	269	15%	YTDQSGEEEEDEYEEQLQHR; LNQVLEEEQKLVQLGQAEK; NLTGLNQR;	Biossíntese de ubiquinona	Ligante a lipídeo
69	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Vdac2)	gi6755965	32kDa	7.44	316	17%	SNFAVGYR; VCEDFDTSVNLAWTSGTNCTR; VNNSSLIGVGYTQLRPGVK;	Transporte de ions	Porina

Tabela 4 - Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e saudável treinado (ST).

	Número do spot	Proteína	SS (média + desvio)	ST (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato</b>						
1	81	Glycogen phosphorylase, muscle form	0.096±0.024	0.054±0.009	-1.7	0.014
2	13	Lactate dehydrogenase A chain protein, partial	0.041±0.002	0.028±0.004	-1.4	0.001
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>						
3	50	Aconitase hydratase, mitochondrial precursor	0.820±0.146	1.090±0.030	+1.3	0.010
4	63	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_b	0.344±0.037	0.438±0.014	+1.2	0.042
5	33	Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide), isoform CRA_f	0.313±0.025	0.257±0.035	-1.2	0.037
6	16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor	0.222±0.043	0.273±0.028	+1.2	0.039
7	39	Succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit, isoform CRA_b	0.469±0.140	0.576±0.240	+1.2	0.049
<b>Síntese de ATP</b>						
8	23	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	0.965±0.123	1.465±0.193	+1.5	0.004
9	42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2.102±0.281	3.294±0.334	+1.5	0.001
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>						
10	12	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	0.464±0.079	0.509±0.124	+1.1	0.038
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>						
11	99	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	0.112±0.022	0.150±0.032	+1.3	0.037
12	17	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.442±0.050	0.651±0.103	+1.4	0.010
<b>Estresse oxidativo</b>						
13	25	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	0.070±0.009	0.057±0.011	-1.2	0.034
<b>Proteínas de choque térmico</b>						
14	45	Heat shock cognate 71 kDa protein	0.094±0.005	0.155±0.036	+1.6	0.014
15	9	Heat shock protein beta-1	0.062±0.005	0.041±0.006	-1.5	0.001
<b>Proteínas estruturais</b>						
16	44	Desmin	0.357±0.064	0.515±0.096	+1.4	0.033
17	4	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	2.209±0.469	3.007±0.145	+1.3	0.017
18	38	Troponin T2, cardiac, isoform CRA_a	2.050±0.199	2.759±0.266	+1.3	0.005
<b>Funções variadas</b>						
19	52	14-3-3 protein gamma	0.053±0.015	0.028±0.002	-1.8	0.015
20	91	Bifunctional epoxide hydrolase 2 isoform a	0.142±0.019	0.101±0.017	-1.4	0.017
21	68	Carbonic anhydrase 2	0.059±0.002	0.045±0.008	-1.3	0.011
22	79	Creatine kinase B-type	0.047±0.009	0.026±0.003	-1.8	0.047
23	14	Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	0.565±0.150	0.776±0.268	+1.3	0.039
24	89	Fibrinogen beta chain precursor	0.125±0.030	0.073±0.012	-1.6	0.018
25	75	Sarcalumenin, isoform CRA_a	0.110±0.021	0.149±0.009	+1.3	0.015
26	66	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit isoform 1	0.020±0.004	0.042±0.015	+2.1	0.022
27	76	T-complex protein 1 subunit beta	0.043±0.005	0.031±0.008	-1.3	0.037
28	78	Tripartite motif-containing protein 72	0.159±0.022	0.048±0.045	-3.2	0.005
29	69	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0.105±0.039	0.142±0.010	+1.3	0.049

Tabela 5 - Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e isoproterenol sedentário (IS).

Número do spot	Proteína	SS (média + desvio)	IS (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato</b>					
1	Enolase 3, beta muscle, isoform CRA_a	0.419±0.092	0.295±0.059	-1.4	0.045
2	Glycogen phosphorylase, muscle form	0.096±0.024	0.060±0.015	-1.3	0.034
3	Pyruvate kinase, muscle isoform M1	0.256±0.039	0.185±0.015	-1.3	0.013
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>					
4	Dihydrolipoamide dehydrogenase	0.265±0.045	0.226±0.061	-1.1	0.048
5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor	0.222±0.043	0.199±0.033	-1.1	0.035
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>					
6	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	0.464±0.079	0.358±0.079	-1.2	0.045
7	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	0.073±0.008	0.056±0.003	-1.3	0.007
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>					
8	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	0.112±0.022	0.085±0.013	-1.3	0.028
9	Propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit	0.085±0.006	0.077±0.004	-1.1	0.042
10	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.276±0.031	0.209±0.019	-1.3	0.009
<b>Estresse oxidativo</b>					
11	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	0.070±0.009	0.059±0.009	-1.1	0.031
12	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	0.306±0.060	0.269±0.041	-1.1	0.041
<b>Proteínas de choque térmico</b>					
13	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0.507±0.114	0.422±0.088	-1.2	0.034
14	Heat shock cognate 71 kDa protein	0.094±0.005	0.149±0.036	+1.5	0.022
15	Heat shock protein beta-1	0.062±0.005	0.046±0.012	-1.3	0.051
<b>Proteínas estruturais</b>					
16	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	2.209±0.469	2.610±0.588	+1.1	0.047
17	Myozenin-2	0.025±0.008	0.037±0.017	+1.4	0.038
<b>Funções variadas</b>					
18	Elongation fator Tu mitochondrial	0.122±0.007	0.153±0.022	+1.2	0.036
19	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit isoform 1	0.020±0.004	0.028±0.015	+1.4	0.032
20	Serum albumin precursor	0.219±0.036	0.331±0.066	+1.4	0.025
21	T-complex protein 1 subunit beta	0.043±0.005	0.123±0.022	+2.8	0.003
22	Tripartite motif-containing protein 72	0.159±0.022	0.043±0.021	-3.7	0.005
23	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor	0.061±0.003	0.099±0.026	+1.6	0.029

Tabela 6 - Proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável treinado (ST) e isoproterenol sedentário (IS).

Número do spot	Proteína	ST (média + desvio)	IS (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"	
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato</b>						
1	19	Enolase 3, beta muscle, isoform CRA_a	0.382±0.064	0.293±0.059	-1.3	0.035
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>						
2	50	Aconitase hydratase, mitochondrial precursor	1.090±0.030	0.784±0.319	-1.3	0.049
3	32	Dihydrolipoamide dehydrogenase	0.256±0.046	0.226±0.061	-1.1	0.043
4	1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble), isoform CRA_c	0.504±0.018	0.430±0.041	-1.1	0.018
5	16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor	0.273±0.024	0.199±0.033	-1.3	0.011
6	39	Succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit, isoform CRA_b	0.576±0.240	0.458±0.313	-1.2	0.047
<b>Síntese de ATP</b>						
7	23	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	1.465±0.193	1.153±0.271	-1.2	0.039
8	42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3.294±0.334	2.722±0.737	-1.2	0.047
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>						
9	12	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	0.509±0.124	0.358±0.079	-1.4	0.042
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>						
10	99	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	0.150±0.032	0.085±0.013	-1.7	0.009
11	17	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.651±0.103	0.490±0.139	-1.3	0.025
12	27	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.279±0.059	0.209±0.019	-1.3	0.043
<b>Estresse oxidativo</b>						
13	6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	0.290±0.057	0.269±0.041	-1.1	0.048
<b>Proteínas de choque térmico</b>						
14	97	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0.510±0.070	0.422±0.088	-1.2	0.042
<b>Proteínas estruturais</b>						
15	44	Desmin	0.515±0.096	0.356±0.134	-1.4	0.035
16	4	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	3.007±0.145	2.610±0.588	-1.1	0.042
17	38	Troponin T2, cardiac, isoform CRA_a	2.759±0.266	2.191±0.426	-1.2	0.044
<b>Funções variadas</b>						
18	52	14-3-3 protein gamma	0.027±0.002	0.042±0.013	+1.5	0.050
19	14	Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	0.776±0.268	0.540±0.084	-1.4	0.044
20	51	Metaxin 2, isoform CRA_a	0.054±0.006	0.091±0.034	+1.6	0.046
21	75	Sarcalumenin, isoform CRA_a	0.149±0.009	0.112±0.014	-1.3	0.001
22	66	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit isoform 1	0.042±0.004	0.028±0.015	-1.5	0.031
23	76	T-complex protein 1 subunit beta	0.031±0.008	0.123±0.022	+3.9	0.002
24	55	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor	0.066±0.009	0.099±0.026	+1.4	0.051

Tabela 7 - Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos isoproterenol sedentário (IS) e isoproterenol treinado (IT).

Número do spot	Proteína	IS (média + desvio)	IT (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"	
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato</b>						
1	19	Enolase 3, beta muscle, isoform CRA_a	0.295±0.059	0.429±0.057	+1.4	0.015
2	2	L-lactate dehydrogenase B chain	0.695±0.117	0.566±0.004	-1.2	0.049
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>						
3	63	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_b	0.446±0.057	0.287±0.042	-1.5	0.041
4	16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor	0.199±0.033	0.234±0.034	+1.1	0.039
5	30	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	0.105±0.031	0.063±0.014	-1.6	0.045
<b>Síntese de ATP</b>						
6	23	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	1.153±0.271	1.205±0.226	+1.1	0.037
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>						
7	12	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	0.358±0.079	0.439±0.048	+1.2	0.031
8	20	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial precursor	0.315±0.041	0.225±0.040	-1.4	0.029
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>						
9	99	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	0.085±0.013	0.139±0.040	+1.6	0.042
10	67	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	0.200±0.033	0.235±0.052	+1.1	0.033
11	17	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.490±0.139	0.609±0.038	+1.2	0.044
12	90	Propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit	0.077±0.004	0.051±0.012	-1.5	0.005
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>						
13	22	Branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	0.041±0.016	0.031±0.008	-1.3	0.029
<b>Estresse oxidativo</b>						
14	6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	0.269±0.041	0.192±0.030	-1.4	0.022
<b>Proteínas estruturais</b>						
15	44	Desmin	0.356±0.134	0.442±0.092	+1.2	0.049
16	10	Myosin 6	0.094±0.020	0.078±0.015	-1.2	0.032
17	38	Troponin T2, cardiac, isoform CRA_a	2.191±0.426	2.385±0.380	+1.1	0.038
18	47	Vinculin, isoform CRA_b	0.050±0.010	0.025±0.005	-1.9	0.025
<b>Funções variadas</b>						
19	48	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precursor	0.077±0.016	0.059±0.015	-1.3	0.035
20	68	Carbonic anhydrase 2	0.053±0.029	0.030±0.007	-1.7	0.046
21	14	Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	0.540±0.084	0.720±0.035	+1.3	0.007
22	72	Elongation factor Tu mitochondrial	0.153±0.022	0.106±0.017	-1.4	0.014
23	89	Fibrinogen beta chain precursor	0.084±0.035	0.047±0.018	-1.7	0.033
24	51	Metaxin 2, isoform CRA_a	0.091±0.034	0.055±0.009	-1.8	0.048
25	75	Sarcalumenin, isoform CRA_a	0.112±0.014	0.147±0.010	+1.3	0.001
26	66	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit isoform 1	0.028±0.015	0.038±0.004	+1.3	0.036
27	105	Serum albumin precursor	0.331±0.066	0.070±0.006	-4.6	0.015
28	93	Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	0.028±0.003	0.020±0.003	-1.3	0.005
29	78	Tripartite motif-containing protein 72	0.043±0.021	0.019±0.003	-2.2	0.039



Tabela 8 - Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável treinado (ST) e isoproterenol treinado (IT).

Número do spot	Proteína	ST (média + desvio)	IT (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"	
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>						
1	50	Aconitase hydratase, mitochondrial precursor	1.090±0.030	0.751±0.106	-1.4	0.007
2	46	Dihidrolipoamide S-acetyltransferase precursor	0.374±0.049	0.291±0.031	-1.2	0.024
3	63	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_b	0.438±0.014	0.287±0.042	-1.1	0.047
4	1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble), isoform CRA_c	0.096±0.018	0.075±0.040	-1.2	0.002
5	39	Succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit, isoform CRA_b	0.576±0.240	0.356±0.029	-1.6	0.048
<b>Síntese de ATP</b>						
6	42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3.294±0.334	2.443±0.309	-1.3	0.007
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>						
7	20	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial precursor	0.315±0.088	0.225±0.040	-1.4	0.018
<b>Estresse oxidativo</b>						
8	6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	0.290±0.057	0.192±0.030	-1.5	0.023
<b>Proteínas de choque térmico</b>						
9	97	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0.510±0.070	0.386±0.035	-1.3	0.019
10	45	Heat shock cognate 71 kDa protein	0.155±0.036	0.110±0.019	-1.4	0.047
<b>Proteínas estruturais</b>						
11	61	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2, isoform CRA_a	0.056±0.008	0.046±0.008	-1.2	0.044
12	4	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	3.007±0.145	2.104±0.252	-1.4	0.008
<b>Funções variadas</b>						
13	54	Annexin A5 protein, isoform CRA_b	0.038±0.010	0.053±0.012	+1.3	0.027
14	68	Carbonic anhydrase 2	0.045±0.008	0.030±0.007	-1.4	0.028
15	89	Fibrinogen beta chain precursor	0.073±0.012	0.047±0.018	-1.5	0.051
16	105	Serum albumin precursor	0.250±0.065	0.070±0.007	-3.5	0.049
17	93	Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	0.026±0.004	0.020±0.003	-1.3	0.032

Tabela 9 - Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos saudável sedentário (SS) e isoproterenol treinado (IT).

Número do spot		Proteína	SS (média + desvio)	IT (média + desvio)	Alteração do volume do spot	Valor de "p"
<b>Glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato</b>						
1	13	Lactate dehydrogenase A chain protein, partial	0.041±0.002	0.029±0.007	-1.4	0.013
2	2	L-lactate dehydrogenase B chain	0.625±0.038	0.567±0.004	-1.1	0.020
<b>Ciclo do ácido tricarboxílico</b>						
3	46	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase precursor	0.408±0.061	0.291±0.031	-1.4	0.012
4	63	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_b	0.344±0.037	0.287±0.042	-1.3	0.049
5	33	Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide), isoform CRA_f	0.313±0.025	0.231±0.067	-1.3	0.051
6	30	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	0.104±0.009	0.063±0.014	-1.3	0.002
<b>Síntese de ATP</b>						
7	23	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	0.965±0.123	1.205±0.226	+1.2	0.034
8	42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2.102±0.281	2.443±0.309	+1.1	0.046
<b>Cadeia de transporte de elétrons</b>						
9	29	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	0.073±0.008	0.051±0.018	-1.4	0.048
<b>Metabolismo de ácidos graxos</b>						
10	17	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.442±0.050	0.609±0.038	+1.4	0.001
11	90	Propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit	0.085±0.006	0.051±0.012	-1.6	0.001
<b>Estresse oxidativo</b>						
12	25	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	0.070±0.009	0.048±0.006	-1.4	0.006
13	6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	0.306±0.060	0.192±0.030	-1.5	0.014
<b>Proteínas de choque térmico</b>						
14	97	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0.507±0.114	0.386±0.035	-1.3	0.048
15	45	Heat shock cognate 71 kDa protein	0.094±0.005	0.110±0.019	+1.1	0.046
16	9	Heat shock protein beta-1	0.062±0.005	0.039±0.011	-1.5	0.008
<b>Proteínas estruturais</b>						
17	47	Vinculin, isoform CRA_b	0.050±0.008	0.025±0.005	-1.9	0.002
<b>Funções variadas</b>						
18	48	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precursor	0.076±0.019	0.059±0.015	-1.3	0.048
19	91	Bifunctional epoxide hydrolase 2 isoform a	0.142±0.019	0.103±0.012	-1.3	0.012
20	68	Carbonic anhydrase 2	0.059±0.002	0.030±0.007	-1.9	0.001
21	79	Creatine kinase B-type	0.047±0.009	0.029±0.003	-1.6	0.009
22	14	Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	0.565±0.150	0.720±0.035	+1.2	0.022
23	89	Fibrinogen beta chain precursor	0.125±0.030	0.047±0.018	-2.6	0.004
24	105	Serum albumin precursor	0.219±0.036	0.070±0.005	-3.0	0.034
25	93	Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	0.029±0.003	0.020±0.003	-1.4	0.003
26	76	T-complex protein 1 subunit beta	0.043±0.005	0.088±0.050	+2.0	0.037
27	78	Tripartite motif-containing protein 72	0.159±0.022	0.019±0.003	-8.2	0.001

Para validar os resultados obtidos na análise proteômica, duas proteínas identificadas foram selecionadas - sarcalumenin e serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma (PP1- $\gamma$ ) – e submetidas a análise de expressão proteica pela técnica de western blotting. Os resultados são mostrados nas figuras 43 e 44 e são consistentes com os resultados proteômicos.

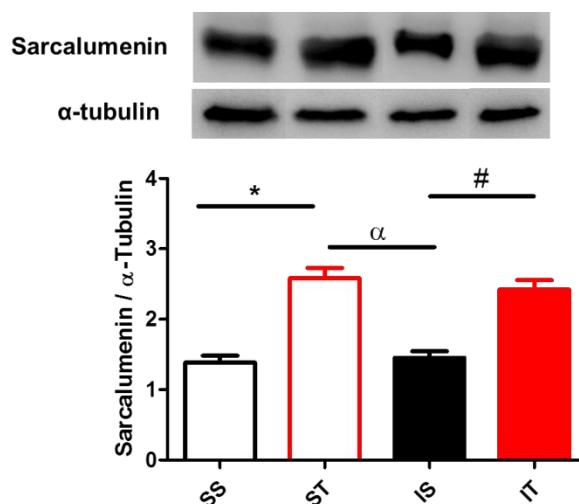


Figura 43 – Expressão proteica da Sarcalumenin no ventrículo esquerdo obtido de animais dos grupos saudável sedentário (SS, n=4), saudável treinado (ST, n=4), isoproterenol sedentário (IS, n=4) e isoproterenol treinado (IT, n=4). Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM.

O treinamento induziu um aumento na expressão proteica da Sarcalumenin tanto nos animais do grupo saudável (ST) quanto nos animais do grupo isoproterenol (IT). Os animais do grupo ST (hipertrofia fisiológica) apresentam uma maior expressão proteica quando comparados com os animais do grupo IS (hipertrofia patológica).

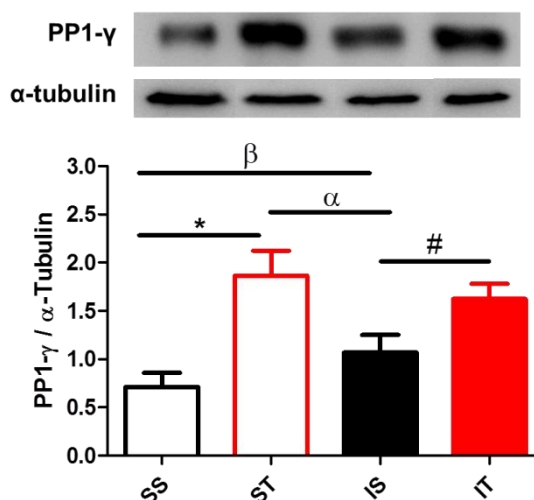


Figura 44 – Expressão proteica da PP1- $\gamma$  no ventrículo esquerdo obtido de animais dos grupos saudável sedentário (SS, n=4), saudável treinado (ST, n=4), isoproterenol sedentário (IS, n=4) e isoproterenol treinado (IT, n=4). Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM.

O tratamento com isoproterenol induziu um aumento na expressão proteica da PP1- $\gamma$  nos animais do grupo IS comparados com os animais SS e o treinamento aumentou a expressão proteica da PP1- $\gamma$ , tanto nos animais do grupo saudável (ST) quanto nos animais do grupo isoproterenol (IT). Os animais do grupo ST (hipertrofia fisiológica) apresentam uma maior expressão proteica quando comparados com os animais do grupo IS (hipertrofia patológica).

## **V. DISCUSSÃO**

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio que quando associada a condições fisiológicas e patológicas leva a um aumento do risco de morbidade e mortalidade, tendo como consequência o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. (Bernardo et al., 2010; Samak et al., 2016; Lazzeroni et al., 2016; Liu et al., 2016). Os benefícios metabólicos, autonômicos e cardiovasculares do exercício, sugerem que o treinamento aeróbico é uma importante conduta não farmacológica na prevenção e tratamento de diversas patologias, dentre elas, as doenças cardiovasculares (Fernandes et al., 2015; Johnson et al., 2015; Bacurau et al., 2016; Eijsvogels et al., 2016).

Este trabalho teve como objetivo gerar novas informações sobre o processo de remodelamento dos tecidos ventriculares na hipertrofia patológica e fisiológica, numa tentativa de compreender os mecanismos pelos quais o treinamento aeróbico interfere na prevenção das complicações cardiovasculares. Para isto foram avaliados parâmetros histomorfométricos e hemodinâmicos, a capacidade aeróbica dos animais e o perfil proteico dos VE por análise proteômica.

Os modelos de hipertrofia cardíaca utilizados neste trabalho foram induzidos pelo isoproterenol - patológica - e por treinamento aeróbico - fisiológica. Considerando que os processos hipertroficantes cardíacos resultam em um aumento da massa cardíaca devido a um aumento no tamanho dos miócitos e/ou aumento do estroma conjuntivo (Samak et al., 2016; Lazzeroni et al., 2016; Liu et al., 2016), nossos modelos foram validados e caracterizados pela mensuração das massas do coração, do VE, pela correlação dessas estruturas com o comprimento da tíbia, correlação da massa do VE com a massa do coração e pela espessura e diâmetro do VE.

Os animais sedentários tratados com isoproterenol apresentaram um aumento na massa do VE e na relação dessa estrutura com o comprimento da tíbia (Figura 13B e 15), na relação da massa do VE pela massa do coração (Figura 16) e na área total do VE (figura 17), o que confirma que o tratamento com isoproterenol resultou em uma hipertrofia no VE. Os animais saudáveis que foram submetidos ao treinamento aeróbico também apresentaram um aumento na relação da massa do VE pela massa do coração (Figura 16) e na área total do VE (figura 17), o que confirma que o treinamento aeróbico resultou em uma hipertrofia no VE. O mesmo resultado foi obtido com os animais tratados com isoproterenol que foram submetidos ao treinamento aeróbico (Figuras 16 e 17), entretanto eles também

apresentaram uma redução na massa do coração e na relação dessa estrutura com o comprimento da tíbia (Figura 13A e 14). O treinamento não levou a essa redução no coração dos animais saudáveis, mostrando esse efeito apenas nos animais que foram tratados com isoproterenol.

Não houve diferença significativa no diâmetro e espessura da parede do VE entre os grupos experimentais, o que impede a identificação do tipo de hipertrofia - concêntrica ou excêntrica (figura 18 e 19).

Dando continuidade na validação e caracterização dos modelos de hipertrofia patológica e fisiológica, as análises histológicas evidenciaram a manutenção na integridade da arquitetura e das células do miocárdio nos animais saudáveis, com uma discreta hipertrofia nos animais que foram submetidos ao treinamento aeróbico (Figuras 20 e 21), evidenciando a indução da hipertrofia fisiológica pelo treinamento, o que está de acordo com dados existentes na literatura (Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Bernardo et al., 2016).

Como esperado, nos animais sedentários e treinados tratados com isoproterenol foi observada uma intensa desorganização das fibras e áreas de fibrose focal difusa no ventrículo esquerdo, os quais são considerados mecanismos de reparo ao dano isquêmico decorrente de um infarto subendocárdico, que são características da hipertrofia patológica. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que evidenciam a indução da hipertrofia patológica pelo tratamento com isoproterenol (Puhl et al., 2016; Wang et al., 2016; Xie et al., 2015; Xu et al., 2016). Estes danos causados pelo isoproterenol parecem ser amenizados com o treinamento aeróbico, o que indica seu efeito benéfico na hipertrofia patológica (Figuras 20 e 21).

Todos os grupos experimentais apresentaram áreas de fibrose no VE, sendo maior nos animais sedentários com hipertrofia patológica (Figura 22). A pequena substituição do tecido cardíaco por tecido fibroso observada nos animais com hipertrofia fisiológica em resposta ao treinamento aeróbico pode ser considerada uma resposta fisiológica, pois não houve alteração nos miócitos. Para manter a integridade do tecido cardíaco, a quantidade de colágeno da matriz aumenta em resposta ao aumento do tamanho dos miócitos, mas não é prejudicial ao tecido já que é acompanhada pelo aumento no calibre das artérias coronarianas e no aumento do fluxo sanguíneo, o que impede que ocorra perda de miócitos (Lucini & Pagani, 2011; Shimizu & Minamino, 2016). Já a substituição do tecido cardíaco por

tecido fibroso em resposta ao tratamento com isoproterenol foi uma resposta patológica, já que houve uma desorganização das fibras e grandes áreas com fibrose, o que confirma que o tratamento com isoproterenol leva ao desenvolvimento da hipertrofia patológica. Essa deposição de colágeno acontece, pois o isoproterenol induz o crescimento do cardiomiócito que excede a capacidade dos capilares de fornecerem nutrientes e oxigênio, levando a hipóxia cardíaca e morte celular, e consequentemente a substituição fibrótica (Ma et al., 2012; Xie et al., 2015; Koeck et al., 2016; Piek et al., 2016; Shimizu & Minamino, 2016). Entretanto o treinamento amenizou esses danos, o que confirma a importância do exercício físico na reabilitação cardíaca (Ma et al., 2015; Barboza et al., 2016).

Diante desses resultados, pode-se afirmar que os modelos escolhidos neste estudo para a indução da hipertrofia patológica e fisiológica foram eficazes, bem como pode-se sugerir um efeito benéfico do treinamento aeróbio na hipertrofia patológica.

Após a validação e caracterização dos modelos, efeitos de cada tratamento (isoproterenol e treinamento aeróbio) sobre alguns parâmetros foram avaliados.

Foi demonstrado que o tratamento com isoproterenol: (i) diminuiu a sobrevivência dos animais em aproximadamente 25% (figura 23); (ii) interfere no ganho de peso corporal apenas durante o período de tratamento, pois foi observado que os animais mantiveram o peso durante esse período (Figura 24 e 25) e que após o tratamento estes apresentaram ganho de peso corporal (Figura 26) (iii) diminuiu a capacidade aeróbica, o que demonstra um efeito prejudicial da administração do isoproterenol no condicionamento desses animais (Figura 30).

E como esperado, o treinamento aeróbio - 8 semanas: (i) reduziu o peso corporal dos animais saudáveis (Figura 26); (ii) foi capaz de melhorar a capacidade aeróbica tanto dos animais saudáveis quanto dos animais com hipertrofia patológica, o que novamente demonstra a importância do exercício físico na reabilitação cardíaca (Figura 27, 29 e 30).

A diminuição da capacidade aeróbica dos animais que foram submetidos ao tratamento com isoproterenol pode ser explicada devido ao fato de que a hipertrofia patológica está associada com a perda de miócitos e a substituição fibrótica, que leva a um aumento da rigidez da câmara ventricular e consequentemente em uma diminuição da função cardíaca. Diante desse fato, ocorre uma diminuição da oxigenação do coração, e como um mecanismo de defesa, ocorre uma diminuição



da oxidação de ácidos graxos e aumento do metabolismo de glicose, que resulta em uma diminuição na produção de ATP, prejudicando assim a capacidade aeróbica desses animais (Mitra *et al.*, 2014; Santacruz *et al.*, 2014; Eijsvogels *et al.*, 2016; Lazzeroni *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

Por outro lado, o treinamento aeróbico melhora a capacidade aeróbica tanto dos animais saudáveis quanto dos animais com hipertrofia patológica, pois induz uma hipertrofia fisiológica que resulta em um aumento na função cardíaca e é capaz de promover a angiogênese, aumentando o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos e para o músculo cardíaco. O treinamento aeróbico promove também adaptações bioquímicas no coração, como um aumento no metabolismo oxidativo do miocárdio (aumento da oxidação de ácidos graxos e glicose) a partir de modificações metabólicas, tais como aumento na atividade de enzimas oxidativas e aumento no número de mitocôndrias, e conseqüentemente resulta em um aumento na produção de ATP, aumentando assim o condicionamento desses animais (Hong *et al.*, 2014; Santacruz *et al.*, 2014; Camera *et al.*, 2016; Eijsvogels *et al.*, 2016; Lazzeroni *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

O efeito do treinamento aeróbico no condicionamento dos animais também pode ser avaliado por medida direta do consumo de oxigênio no repouso ( $VO_2$  repouso) e do consumo máximo de oxigênio durante exercício progressivo até a fadiga ( $VO_2$  máximo). A administração de isoproterenol e o treinamento aeróbico não causaram alterações nesses parâmetros (Figuras 31 e 32), entretanto observa-se uma tendência de aumento no  $VO_2$  máximo tanto nos animais saudáveis quanto nos animais com hipertrofia patológica que foram submetidos ao treinamento aeróbico. O mesmo resultado foi obtido ao mensurar o efeito dos tratamentos nos parâmetros hemodinâmicos dos animais – PAS, PAD e PAM. Nenhum desses parâmetros foi alterado (Figura 33).

Vários estudos tem demonstrado que a hipertrofia patológica e fisiológica induzem remodelamentos distintos no proteoma cardíaco (Juan *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Mitra *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015; Petriz *et al.*, 2015). Entretanto poucos são os estudos que tem utilizado estratégias proteômicas para caracterizar o efeito do treinamento aeróbico no remodelamento do proteoma cardíaco em doenças cardiovasculares. Diante disso, utilizando a eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa,

avaliou-se o efeito dos tratamentos (isoproterenol e treinamento aeróbico) no proteoma cardíaco.

Para realização desta análise 4 extratos proteicos solúveis do VE de animais de cada grupo (replicatas biológicas) foram resolvidos por eletroforese bidimensional. Os géis 2D obtidos apresentaram grande reprodutividade em termos do número total, intensidade e posição relativa dos spots proteicos dentro de cada grupo (Tabela 2) o que permitiu a análise comparativa entre os grupos.

Uma análise preliminar, utilizando a ferramenta estatística “análise de fatores”, indicou que os grupos experimentais apresentavam perfis proteicos distintos (Figura 38). E a partir da análise comparativa dos géis - utilizando o software Image Master 2D Platinun v 7.05 - foram detectados 105 “spots” proteicos com intensidades diferentes entre os grupos (Figura 39), e destes, 58 proteínas foram identificadas por espectrometria de massa e busca no banco de dados do NCBI nr pelo software MASCOT® (Tabela 3).

As proteínas identificadas foram categorizadas em 10 grupos funcionais: (i) 8.62% envolvidas no metabolismo de carboidrato (glicólise, metabolismo de glicogênio e lactato); (ii) 17.24% proteínas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico; (iii) 3.45% síntese de ATP; (iv) 6.90% cadeia de transporte de elétrons; (v) 8.62% metabolismos de ácidos graxos; (vi) 3.45% metabolismo de aminoácidos; (vii) 3.45% estresse oxidativo; (viii) 5.17% proteínas de choque térmico; (viiii) 12.07% proteínas estruturais; (x) 31,03% proteínas de funções variadas (Figura 40 e Tabela 3).

A identificação das proteínas diferencialmente expressas na análise proteômica diferencial é apenas a etapa inicial e pode gerar informações e identificar vias moleculares moduladas por uma determinada condição. Várias ferramentas de bioinformática e banco de dados são utilizadas para assinalar integração de proteínas e associá-las com processos biológicos, o que permite explorar sua potencial relevância funcional.

Redes de interação das proteínas identificadas neste trabalho foram obtidas a partir do banco de dados STRING (*Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), versão 10.0, e 39 apresentaram interações proteína-proteína (Figura 41).

Neste estudo, alterações na intensidade de várias proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco foram observadas entre os grupos estudados (Tabelas 4-9). A alta produção de ATP é extremamente necessária à manutenção do

contínuo trabalho mecânico do coração, por este motivo, como um mecanismo de adaptação e proteção, o coração é capaz de utilizar diferentes substratos de energia, dependendo de sua carga de trabalho e das concentrações destes substratos na corrente sanguínea, permitindo um contínuo fornecimento de ATP a partir de diversas condições fisiopatológicas. No coração saudável normal, a oxidação de ácidos graxos é a principal via metabólica responsável pela geração de energia, por volta de 60-70% da produção de ATP, e a glicose e o lactato são responsáveis por aproximadamente 30% desta produção. Perturbações nos processos de produção de ATP podem afetar diretamente a função contrátil do miocárdio (Van der Vusse et al., 1992).

A hipertrofia fisiológica modulou positivamente a expressão da maioria das proteínas do metabolismo energético que apresentaram diferença significativa ao comparar o grupo SS com ST, entretanto modulou negativamente a expressão das proteínas envolvidas no metabolismo de glicogênio e lactato (Tabela 4). Estes resultados corroboram com dados existentes na literatura de que a hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício físico, resulta em uma diminuição no metabolismo de carboidratos e em um aumento na oxidação de ácidos graxos e no metabolismo aeróbico (Boluyt et al. 2006; Sun et al., 2008; Burniston, 2009; Bansal et al., 2010; Rocha et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Petriz et al., 2015; Dantas et al., 2016). Essas alterações na expressão dessas proteínas envolvidas no metabolismo energético induzidas pelo treinamento aeróbico são consistentes com o aumento na produção aeróbica de ATP, e conseqüentemente do condicionamento dos animais (como observado em resultados anteriores) e uma melhora na função cardíaca (Hong et al., 2014; Santacruz et al., 2014; Camera et al., 2016; Eijsvogels et al., 2016; Lazzeroni et al., 2016; Samak et al., 2016; Shimizu & Minamino, 2016).

Por outro lado, a hipertrofia patológica modulou negativamente a expressão de todas as proteínas do metabolismo energético que apresentaram diferença significativa ao comparar o grupo SS com IS. (Tabela 5). Esta diminuição na expressão de proteínas do metabolismo aeróbico e da oxidação de ácidos graxos está de acordo com dados encontrados na literatura (Bernard et al., 2008; Jacquet et al., 2009; Urbonavicius et al., 2009; Bugger et al., 2010; Lam et al., 2010; Zamilpa et al., 2010; Juan et al., 2012; Li et al., 2014; Liu et al., 2014; Mitra et al., 2014; Datta et al., 2017), entretanto achados da literatura indicam um aumento da utilização da glicose como fonte de energia na hipertrofia patológica (Mitra et al., 2014; Samak et

al.,2016; Shimizu &Minamino, 2016) o que vai de encontro com nossos achados em que a expressão de enzimas da glicólise e metabolismo de glicogênio também foram moduladas negativamente.

As alterações na expressão dessas proteínas podem ser associadas à substituição fibrótica na hipertrofia patológica, que leva a uma diminuição da oxigenação do coração, e como um mecanismo de defesa, ocorre uma diminuição da oxidação de ácidos graxos que resulta em uma diminuição na produção de ATP, prejudicando assim a capacidade aeróbica desses animais (como observado anteriormente) e que resulta na diminuição da função cardíaca (Mitra *et al.*, 2014; Santacruz *et al.*, 2014; Eijsvogels *et al.*, 2016; Lazzeroni *et al.*,2016; Samak *et al.*,2016; Shimizu &Minamino, 2016). Estes dados estão de acordo com a literatura e confirmam que na hipertrofia patológica o metabolismo aeróbico cardíaco está diminuído - modula negativamente a expressão de todas as proteínas do metabolismo energético que apresentaram diferença significativa ao comparar o grupo ST com IS (Tabela 6).

Ao avaliarmos o efeito do treinamento aeróbico no remodelamento do proteoma cardíaco na hipertrofia patológica, foi demonstrado que o treinamento resulta em um aumento do metabolismo aeróbico desses animais. O treinamento aeróbio modula positivamente a expressão de quase todas as proteínas do metabolismo energético que apresentaram diferença significativa ao comparar o grupo IS com IT (Tabela 7). Esses dados são condizentes com os da literatura, que mostram melhora na capacidade oxidativa do coração com o treinamento aeróbico e conseqüentemente melhora da função cardíaca e do condicionamento desses animais (como foi observado anteriormente), permitindo assim que o exercício seja uma importante conduta não farmacológica na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Bozi *et al.*,2013; Hong *et al.*, 2014; Lerchenmüller & Rosenzweig, 2014; Fernandes *et al.*,2015; Johnson *et al.*, 2015; Bacurau *et al.*, 2016; Dantas *et al.*, 2016; Eijsvogels *et al.*, 2016).

Entretanto, ao comparar o efeito do treinamento aeróbico no remodelamento do proteoma cardíaco de animais saudáveis e com hipertrofia patológica, podemos observar que os animais treinados com hipertrofia patológica possuem menor expressão de todas as proteínas do metabolismo energético que apresentaram diferença significativa ao comparar o grupo ST com IT (Tabela 8). A partir desses resultados podemos concluir que a nível proteômico, o treinamento aeróbico tem

melhores efeitos nos animais saudáveis, entretanto é capaz de melhorar a capacidade aeróbica de ambos, saudável e hipertrofia patológica, como observado em resultados anteriores.

O aumento da expressão e atividade de proteínas de choque térmico (HSP), em resposta a situações de estresse (mecânico e oxidativo, mudanças no pH e na temperatura, bem como mutações genéticas) são considerados mecanismos de cardioproteção. Essas proteínas agem como “chaperonas” moleculares e auxiliam no dobramento e montagem final das proteínas, mantendo o equilíbrio correto entre síntese e degradação, contribuindo, dessa forma, para seu adequado funcionamento, e garantindo a correta conformação e localização no interior da célula. Devido à contínua atividade contrátil e metabólica dos cardiomiócitos, faz-se necessário um rígido controle quanto a esses aspectos (Balfoussia et al.,2014; Tarone & Brancaccio, 2014).

As HSP previnem a desnaturação proteica, protegem contra a geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose, promovendo assim a manutenção da integridade celular (Tupling et al., 2008; Balfoussia et al.,2014; Tarone & Brancaccio, 2014). Tanto o exercício quanto a hipertrofia patológica geram um estresse na célula e levam, conseqüentemente, ao aumento da expressão dessas proteínas (Boluyt et al., 2006; Balfoussia et al.,2014; Mitra et al., 2014). Dados da literatura indicam que a estimulação  $\beta$ -adrenérgica de miócitos cardíacos pode ser uma das causas desse aumento (Boluyt et al., 2006).

Neste estudo, foi observado que tanto a hipertrofia fisiológica quanto a hipertrofia patológica modularam positivamente a proteína de choque térmico “heat shock cognate” 71 kDa protein (Tabelas 4 e 5). A família das HSP-70 é capaz de reconhecer aminoácidos hidrofóbicos expostos em proteínas desnaturadas, promovendo a sua remontagem por ciclos repetidos de hidrólise de ATP ou a sua degradação por autofagia, o que garante a correta função contrátil e regulação da massa cardíaca. O aumento da expressão das HSP-70 confere citoproteção as células do músculo cardíaco, pois atuam em combate aos efeitos do estresse oxidativo e no controle dos processos apoptóticos (Tupling et al., 2008; Willis & Patterson, 2013). Por outro lado, a hipertrofia fisiológica modulou negativamente a heat shock protein beta-1 (Tabela 4) e a hipertrofia patológica modulou

negativamente as proteínas 60kDa heat shock protein e heat shock protein beta-1 (Tabela 5).

Como já bem definido, a hipertrofia cardíaca causa remodelamento no ventrículo esquerdo, em resposta a um aumento da atividade ou sobrecarga funcional do coração, para manter a função cardíaca normal. Este remodelamento resulta no aumento da massa cardíaca, devido ao aumento da síntese e incorporação de elementos contráteis, o que induz um aumento da expressão de proteínas estruturais (Shimizu & Minamino, 2016).

Nossos resultados mostram que a hipertrofia fisiológica modulou positivamente a expressão da desmin, myosin regulatory light chain e troponin (Tabela 4) e a hipertrofia patológica modulou positivamente a expressão da myosin regulatory light chain e da myozenin-2 (Tabela 5). O aumento na expressão dessas proteínas estruturais está de acordo com dados encontrados na literatura e garante que o coração mantenha a contração muscular e seu trabalho mecânico (Burniston et al., 2008; Mitra et al., 2014). Entretanto, os resultados mostram que a intensidade do aumento destas proteínas estruturais é maior na hipertrofia fisiológica quando comparada com a patológica (Tabela 6). Este pode ser o motivo pelo qual o treinamento aeróbico mantém a estrutura normal do coração e sua função normal ou aumentada e resulta no aumento da função contrátil do coração e aumento do condicionamento dos animais. Já a hipertrofia patológica apresenta uma estrutura, função cardíaca e capacidade aeróbica prejudicadas.

O treinamento aeróbico nos animais com hipertrofia patológica modula positivamente a desmin e troponin que estavam em menor expressão nos animais sedentários com hipertrofia patológica (Tabela 7). Esse aumento nessas duas proteínas pode explicar a diminuição no dano do tecido cardíaco, já que estas duas proteínas estão associadas com a organização do citoesqueleto e contração muscular.

Em adição as proteínas discutidas acima, os tratamentos utilizados nesse estudo também resultaram no remodelamento de proteínas com funções diversificadas e duas delas foram escolhidas para serem estudadas mais profundamente, a sarcalumenin e a serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma (PP1- $\gamma$ ). O primeiro motivo que explica esta escolha é que tanto a sarcalumenin quanto a PP1- $\gamma$  estão envolvidas no mecanismo de contração e relaxamento do músculo cardíaco, o que pode nos ajudar a explicar algumas

alterações encontradas neste estudo; o segundo motivo é devido ao fato de que as fosfatases ainda são pouco estudadas, já que a maioria dos estudos abordam os efeitos das kinases; e por último devido ao fato de que o papel desta isoforma gamma da PP1 no coração ainda é pouco conhecido e estudado.

Estas duas proteínas foram submetidas à análise de expressão proteica pela técnica de western blotting para validar os resultados da análise proteômica. Os resultados obtidos foram consistentes com os da proteômica (Figuras 43 e 44) confirmando que o treinamento aeróbico acarreta no aumento na expressão proteica da sarcalumenin tanto nos animais saudáveis quanto nos animais com hipertrofia patológica, e que os animais com hipertrofia fisiológica apresentaram uma maior expressão proteica quando comparados com os animais com hipertrofia patológica. Por outro lado, confirmou que a hipertrofia patológica induz aumento na expressão proteica da PP1- $\gamma$  e que o treinamento também aumentou a expressão proteica da PP1- $\gamma$  tanto nos animais saudáveis quanto nos animais com hipertrofia patológica. Do mesmo modo, os animais com hipertrofia fisiológica apresentaram uma maior expressão proteica quando comparados com os animais com hipertrofia patológica.

A sarcalumenin (Sar) é uma glicoproteína ligante ao cálcio, presente no retículo sarcoplasmático próxima a SERCA e a fosfolambam, que acelera a captação de cálcio e modula a estabilidade da SERCA (Figura 44) (Shimura et al, 2008; Jiao et al, 2009; Jiao et al., 2012). Estudos indicam que animais SAR-knockout apresentam disfunções cardíacas que resultam na insuficiência cardíaca (Shimura et al., 2008; Jiao et al., 2012) e que o treinamento aeróbico nesses animais resulta na diminuição da expressão da SERCA e conseqüentemente, em disfunções cardíacas. Diante desses fatos, fica claro que sua interação com a SERCA tem papel crucial na manutenção da função cardíaca em condições de estresse fisiológico e patológico (Shimura et al, 2008; Jiao et al, 2009; Jiao et al., 2012).

Já a PP1- $\gamma$  é uma fosfatase essencial na divisão celular, participa da regulação do metabolismo de glicogênio, contratilidade muscular e síntese de proteínas. Esta proteína desfosforila canais de cálcio do tipo L voltagem-dependentes, localizados na membrana sarcoplasmática, e receptores de rianodina, reduzindo assim a força de contração do coração. Também desfosforila a fosfolambam, que passa a inibir a SERCA e reduz a captação de cálcio, aumentando o tempo de relaxamento do coração (Figura 45) (Heijman et al., 2013; Liu et al., 2015).

Considerando os nossos resultados sobre a modulação da sarcalumenin e PP1- $\gamma$  nos modelos de hipertrofia patológica e fisiológica podemos sugerir que o aumento da expressão da PP1- $\gamma$  é um mecanismo de citoproteção, pois acarreta um aumento na desfosforilação dos canais de cálcio do tipo L voltagem-dependentes, dos receptores de rianodina e da fosfolambam, impedindo que ocorra o 'estresse' do RS - vazamento de cálcio do RS durante a diástole e conseqüentemente a depleção dos estoques internos de cálcio – em resposta a ativação sustentada dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo que este mecanismo é mais eficiente na hipertrofia fisiológica, pois o índice de aumento foi de 1.7 vezes maior nestes animais.

Além disso, ocorre um aumento da expressão da sarcalumenin nos animais com hipertrofia fisiológica, que juntamente com a SERCA garantem a manutenção da função cardíaca e conseqüentemente o aumento do condicionamento desses animais. Entretanto este aumento não foi observado na hipertrofia patológica, o que pode explicar a redução da expressão da SERCA nesses animais e conseqüentemente da recaptação de cálcio para o RS, resultando na depleção dos estoques internos de cálcio e na redução da contratilidade celular. Essas alterações podem explicar os danos ocorridos no tecido cardíaco e na redução da capacidade aeróbica desses animais. Por outro lado, o treinamento aeróbico induz aumento da expressão desta proteína nos animais com hipertrofia patológica, que pode justificar em parte o efeito benéfico do treinamento na diminuição do dano causado pelo isoproterenol no tecido cardíaco e na melhora da capacidade aeróbica desses animais.



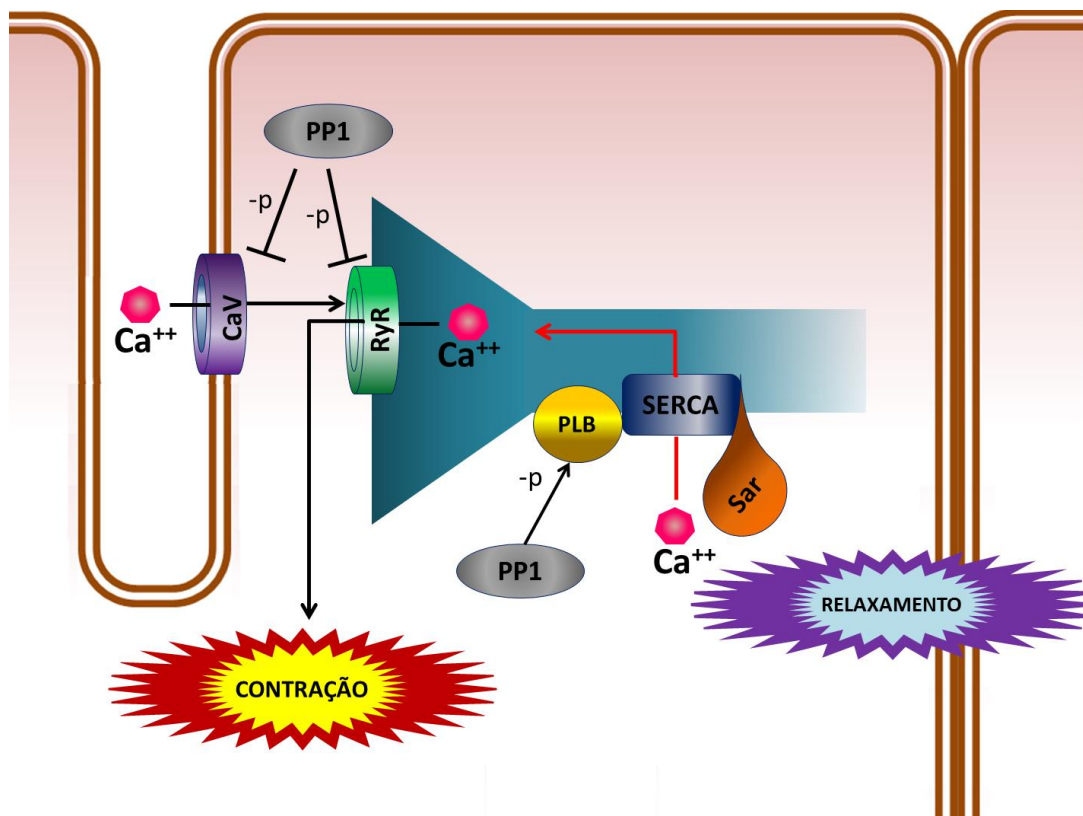


Figura 45 – Figura ilustrativa da ação da PP1- $\gamma$  e da Sarcalumenina (Sar) no acoplamento excitação-contracção do coração.

Nossa análise proteômica demonstrou que existem diferenças significativas entre o proteoma do ventrículo esquerdo nas hipertrofias patológicas e fisiológicas. Além disso, nossos dados corroboram fortemente com a premissa de que o treinamento aeróbico é importante no tratamento de doenças cardiovasculares, pois acarreta um remodelamento proteico benéfico no tecido cardíaco.

## **VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para gerar novas informações sobre o processo de remodelamento dos tecidos ventriculares na hipertrofia patológica e fisiológica, bem como nos mecanismos pelos quais a atividade física interfere na prevenção das complicações cardiovasculares.

Pode se concluir que:

- O treinamento aeróbico moderado na esteira ameniza os danos causados no tecido cardíaco pela administração de isoproterenol.
- O treinamento aeróbico é capaz de melhorar a capacidade aeróbica dos animais com hipertrofia patológica.
- A hipertrofia patológica e fisiológica apresentam perfis proteicos distintos.
- O treinamento aeróbico resulta em um remodelamento benéfico do ventrículo esquerdo dos animais com hipertrofia patológica: aumenta a expressão de proteínas oxidativas, aumentando assim o metabolismo aeróbico, a produção de ATP e o condicionamento dos animais.
- A proteína de choque térmico Heat shock cognate 71 kDa protein tem papel importante na citoproteção tanto na hipertrofia patológica quanto na fisiológica.
- As proteínas estruturais apresentaram um aumento em sua expressão em ambas as hipertrofias, entretanto esse aumento é mais expressivo na hipertrofia fisiológica, o que garante a manutenção da estrutura normal do coração e sua função normal ou aumentada.
- O treinamento aeróbico modula positivamente proteínas estruturais com menor expressão na hipertrofia patológica, o que pode explicar a diminuição no dano do tecido cardíaco nos animais com hipertrofia patológica submetidos ao treinamento, já que estas proteínas estão associadas com a organização do citoesqueleto e contração muscular.

- A sarcalumenin e a PP1- $\gamma$  são importantes proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração, que em resposta ao treinamento aeróbico aumentam suas expressões e atuam na citoproteção cardíaca, sendo responsáveis pela melhora da função cardíaca e condicionamento dos animais com hipertrofia patológica.

Nossos resultados abrem perspectivas para futuras investigações dos benefícios do treinamento aeróbio nas doenças cardiovasculares. Temos como metas futuras: (i) aperfeiçoamento da técnica, com a utilização de método de maior sensibilidade para detecção proteica; (ii) medir os níveis de fosforilação das proteínas em importantes vias de sinalização através da fosfoproteômica.

## VII. REFERÊNCIAS

Abdouch,M.C.D.; Assad,R.S.; Aiello,V.D. Experimental ventricular pressure overload in young animals induces cardiomyocyte hypertrophy in addition to hyperplasia of contractile and noncontractile elements of the myocardium. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 137(6): 1573, 2009.

Agrawal,R.; Agrawal,N.; Koyani,C.N.; Singh,R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research*, 61: 269-280, 2010.

Ahmed,N.; Greening,D.; Samardzija,C.; Escalona,R.M.; Chen,M.; Findlay,J.K.; Kannourakis,G. Unique proteome signature of post-chemotherapy ovarian cancer ascites-derived tumor cells. *Scientific Reports*, 2016.

Aidley,D.J. *Ion channels: molecules in action*. 1. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

Apweiler,R.; Aslanidis,C.; Deufel,T.; Gerstner,A.; Hansen,J.; Hochstrasser,D.; Kellner,R.; Kubicek,M.; Lottspeich,F.; Maser,E.; Mewes,H.W.; Meyer,H.E.; Mullner,S.; Mutter,W.; Neumaier,M.; Nollau,P.; Nothwang,H.G.; Ponten,F.; Radbruch,A.; Reinert,K.; Rothe,G.; Stockinger,H.; Tárnok,A.; Taussig,M.J.; Thiel,A.; Thiery,J.; Ueffing,M.; Valt,G.; Vandekerckhove,J.; Wagener,C.; Wagner,O.; Schmitz,G. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry*, 75(10): 816-32, 2009.

Arnott,D.; O'connell,K.L.; King,K.L.; Stults,J.T. An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. *Analytical Biochemistry*, 258(1):1-18, 1998.

Arrell,D.K.; Neverova,I.; Van Eyk,J.E. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circulation Research*, 88(8): 763-73, 2001.

Bacurau,A.V.; Jannig,P.R.; de Moraes,W.M.; Cunha,T.F.; Medeiros,A.; Barberi,L.; Coelho,M.A.; Bacurau,R.F.; Ugrinowitsch,C.; Musarò,A.; Brum,P.C. Akt/mTOR pathway contributes to skeletal muscle anti-atrophic effect of aerobic exercise training in heart failure mice. *International Journal of Cardiology*, 214: 137-147, 2016.

Balakumar,P. and Jagadeesh,G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: Can the muddy waters be cleared? *Pharmacological Research*, 62: 365-383, 2010.

Balfoussia,E.; Skenderi,K.; Tsironi,M.; Anagnostopoulos,A.K.; Parthimos,N.; Vougas,K.; Papassotiropoulos,I.; Tsangaris,G.T.; Chrousos,G.P. A proteomic study of plasma protein changes under extreme physical stress. *Journal of Proteomics*, 98: 1-14, 2014.

Balke,C.W. and Shorofsky,S.R. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, 37: 290-299, 1998.

Barboza,CA.; Souza,G.I.; Oliveira,J.C.; Silva,L.M.; Mostarda,C.T.; Dourado,P.M.; Oyama,L.M.; Lira,F.S.; Irigoyen,M.C.; Rodrigues,B. Cardioprotective Properties of Aerobic and Resistance Training Against Myocardial Infarction. *International Journal of Sports Medicine*, 37(6): 421-430, 2016.

Barry,S.P.; Davidson,S.M.; Townsend, P.A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40: 2023-2039, 2008.

Bassett,D.R.Jr. and Howley,E.T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(1): 70-84, 2000.

Bernard,C.C.; Mulder,P.; Henry,J.P.; Drobecq,H.; Dubois,E. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *Journal of Proteome Research*, 7: 5004-5016, 2008.

Bernardo,B.C.; Weeks,K.L.; Pretorius,L.; McMullen,J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology and Therapeutics*, 128(1): 191-227, 2010.

Bernardo,B.C.; McMullen,J.R. Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling. *Cardiology Clinics*, 34(4): 515-530, 2016.

Bernstein,D.; Fajardo,G.; Zhao,M. The role of  $\beta$ -adrenergic receptors in heart failure: Differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Progress in Pediatric Cardiology*, 31(1):35-38, 2011.

Bers,D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415: 198-204, 2002.

Bers,D.M. Calcium cycling and signalling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70: 23-49, 2008.

Blair,S.N.; Kampert,J.B.; Kohl,H.W.<sup>3rd</sup>; Barlow,C.E.; Macera,C.A.; Paffenberger,R.S.Jr.; Gibbons,L.W. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA*, 276(3): 205-210, 1996.

Boluyt,M.O.; Brevick,J.L.; Rogers,D.S.; Randall,M.J.; Scalia,A.F.; Li,Z.B. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics*, 6(10): 3154-3169, 2006.

Bozi,L.H.; Maldonado,I.R.; Baldo,M.P.; Silva,M.F.; Moreira,J.B.; Novaes,R.D.; Ramos,R.M; Mill,J.G.; Brum,P.C.; Felix,L.B.; Gomes,T.N.; Natali,A.J. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. *Clinics*, 68(4):549-56, 2013.

Bristow,M. Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation*, 107: 1100–1102, 2003.

Brum,P.C.; Kosek,J.; Patterson,A.; Bernstein,D.; Kobilka,B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(5): H1838-1845, 2002.

Bugger,H.; Schwarzer,M.; Chen,D.; Schrepper,A.; Amorim,P.A.; Schoepe,M.; Nguyen,T.D.; Mohr,F.W.; Khalimonchuk,O.; Weimer,B.C.; Doenst,T. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular Research*, 85(2): 376-384, 2010.

Burniston,J.G. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate intensity endurance exercise. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(7-8): 1077-1086, 2008.

Burniston,J.G. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics* 9(1): 106–115, 2009.

Camera,D.M.; Smiles,W.J.; Hawley,J.A. Exercise-induced skeletal muscle signaling pathways and human athletic performance. *Free Radical Biology & Medicine*, 98: 131-143, 2016.

Carneiro-Júnior,M.A.; Quintão-Júnior,J.F.; Drummond,L.R.; Lavorato,V.N.; Drummond,F.R.; da Cunha,D.N.; Amadeu,M.A.; Felix,L.B.; de Oliveira,E.M.; Cruz,J.S.; Prímola-Gomes,T.N.; Mill,J.G.; Natali, A.J. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 57: 119-128, 2013.

Cens,T.; Rousset,M.; Leyris,J.P.; Fesquet,P.; Charnet,P. Voltage and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 90: 104-117, 2006.

Dantas,P.S.; Sakata,M.M.; Perez,J.D.; Watanabe,R.L.; Bizerra,F.C.; Neves,V.J.; Guzzoni,V.; Marcondes,F.K.; Casarini,D.E.; Cunha,T.S. Unraveling the role of high-intensity resistance training on left ventricle proteome: Is there a shift towards maladaptation? *Life Sciences*, 152: 156-164, 2016.

- Davila-Roman,V.G.; Vedala,G.; Herrero,P.; de las Fuentes,L.; Rogers,J.G.; Kelly,D.P. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(2): 271-277, 2002.
- Di Prampero,P.E. Factors limiting maximal performance in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 90(3-4): 420-429, 2003.
- Du,Y.; Plante,E.; Janicki,J.S.; Brower,G.L. Temporal evaluation of cardiac myocyte hypertrophy and hyperplasia in male rats secondary to chronic volume overload. *The American Journal of Pathology*, 177(3): 1155–1163, 2010.
- Eijsvogels,T.M.; Fernandez,A.B.; Thompson,P.D. Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiological Reviews*, 96(1): 99-125, 2016.
- Eisner,D.A.; Choi,H.S.; Díaz,M.E.; O'Neill,S.C.; Trafford,A.W. Integrative and analyses of calcium cycling in cardiac muscle. *Circulation Research*, 87: 1087-1094, 2000.
- Endlich,P.W.; Firmes,L.B.; Gonçalves,W.L.; Gouvea,S.A.; Moysés,M.R.; Bissoli,N.S.; Reis,A.M.; Abreu,G.R. Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats. *Peptides*, 32: 1706-1712, 2011.
- Erikssen,G. Physical fitness and changes in mortality: the survival of the fittest. *Sports Medicine*, 31(8): 571-576, 2001.
- Fagard,R.H. Exercise therapy in hypertensive cardiovascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 53: 404-411, 2011.
- Fernandes,T.; Baraúna,V.G.; Negrão,C.E.; Phillips,M.I.; Oliveira,E.M. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 309(4): H543-552, 2015.
- Ferreira,R.; Vitorino,R.; Padrão,A.I.; Espadas,G.; Mancuso,F.M.; Moreira-Gonçalves,D.; Castro-Sousa,G.; Henriques-Coelho,T.; Oliveira,P.A.; Barros,A.S.; Duarte,J.A.; Sabidó,E.; Amado,F. Lifelong exercise training modulates cardiac mitochondrial phosphoproteome in rats. *Journal of Proteome Research*, 13(4): 2045-2055, 2014.
- Ferreira,R.; Moreira-Gonçalves,D.; Azevedo,A.L.; Duarte,J.A.; Amado,F.; Vitorino,R. Unrevealing the exercise-related proteome signature in heart. *Basic Research in Cardiology*, 110(1): 454, 2015.
- Fuster,V.; Alexander,R.W.; O'Rourke,R.; Roberts,R.; King,S.B.; Prystowsky,E.N.; Nash,I. *Hurst's the heart*. 9 edition, Hardcover, 1998.
- Garnero,P. Bone markers in osteoporosis. *Current Osteoporosis Report*, 7(3): 84-90, 2009.
- Goessler,K.F.; Martins-Pinge,M.; Veronez da Cunha,N.; Karlen-Amarante,M.; de Andrade,F.G.; Brum,P.C.; Polito,M.D. Treatment with nebivolol combined with physical training promotes improvements in the cardiovascular responses of hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(3): 234-242, 2014.
- Gorg,A.; Weiss,W.; Dunn,M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12): 3665-3685 2004.
- Grimm,M.; Brown,J.H. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(2): 322-330, 2010.
- Guelfi,K.J.; Casey,T.M.; Giles,J.J.; Fournier,P.A.; Arthur,P.G. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(10): 952-957, 2006.



Haberland,M.; Montgomery,R.L.; Olson,E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1): 32–42, 2009.

Haghighi,K.; Gregory,K.N.; Kranias,E.G. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322: 1214-1222, 2004.

Hawley,J.A.; Hargreaves,M.; Joyner,M.J.; Zierath,J.R. Integrative biology of exercise. *Cell*, 159(4): 738-749, 2014.

Hille,B. Ionic channel of excitable membranes. 3 edition, University of Washington, 2001.

Hong,S.; Dimitrov,S.; Pruitt,C.; Shaikh,F.; Beg,N. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: role of beta adrenergic receptors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 39: 113-120, 2014.

Ieda,M. and Fukuda,K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Current Cardiology Review*, 5(4): 289–295, 2009.

Jacquet,S.; Yin,X.; Sicard,P.; Clark,J.; Kanaganayagam,G.S.; Mayr,M.; Marber,M.S. Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(12): 2687-2699, 2009.

Jensen,O.N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(6): 391-403, 2006.

Jiao,Q.; Bai,Y.; Akaike,T.; Takeshima,H.; Ishikawa,Y.; Minamisawa,S. Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(2): H576-582, 2009.

Jiao,Q.; Takeshima,H.; Ishikawa,Y.; Minamisawa,S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell calcium*, 51(1): 31-39, 2012.

Johnson,E.J.; Dieter,B.P.; Marsh, S.A. Evidence for distinct effects of exercise in different cardiac hypertrophic disorders. *Life Sciences*, 123: 100-106, 2015.

Juan,G.H.; Bin,G.C.; Li,G.J.; Jun,L.X.; Bo,S.; Ning,L.X. Comparative proteomic analysis in left ventricular remodeling following myocardial infarction in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(1): 117-123, 2012.

Jones,A.M. and Carter,H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Medicine*, 29(6): 373-386, 2000.

Kadambi,V.J.; Ponniah,S.; Harrer,J.M.; Hoit,B.D.; Dorn,G.W.2nd.; Walsh,R.A.; Kranias,E.G. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 97: 533–539, 1996.

Katz, A. M. *Physiology of the Heart* (Raven Press), 1992.

Kaye,D.M.; Lefkovits,J.; Jennings,G.L.; Bergin,P.; Broughton,A.; Esler,M.D. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 26: 1257–1263, 1995.

Koba,S.; Tanaka,H.; Maruyama,C.; Tada,N.; Birou,S.; Teramoto,T.; Sasaki,J. Physical activity in the Japan population: association with blood lipid levels and effects in reducing cardiovascular and all-cause mortality. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(10): 833-845, 2011.

Koeck,I.; Burkhard,F.C.; Monastyrskaya,K. Activation of common signaling pathways during remodeling of the heart and the bladder. *Biochemical Pharmacology*, 102: 7-19, 2016.

Lam,L.; Lind,J.; Semsarian,C. Application of proteomics in cardiovascular medicine. *International Journal of Cardiology*, 108(1): 12-19, 2006.

Lam,L.; Tsoutsman,T.; Arthur,J.; Semsarian,C. Differential protein expression profiling of myocardial tissue in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(5): 1014-1022, 2010.

Lamonte,M.J.; Fitzgerald,S.J.; Levine,B.D.; Church,T.S.; Kampert,J.B.; Nichaman,M.Z.; Gibbons,L.W.; Blair,S.N. Coronary artery calcium, exercise tolerance, and CHD events in asymptomatic men. *Atherosclerosis*, 189(1): 157-162, 2006.

Langley,S.R.; Dwyer,J.; Drozdov,I.; Yin,X.; Mayr,M. Proteomics: from single molecules to biological pathways. *Cardiovascular Research*, 97(4): 612-622, 2013.

Lau,E.; Cao,Q.; Ng,D.C.; Bleakley,B.J.; Dincer,T.U.; Bot,B.M.; Wang,D.; Liem,D.A.; Lam,M.P.; Ge,J.; Ping,P. A large dataset of protein dynamics in the mammalian heart proteome. *Scientific Data*, 2016.

Lazzeroni,D.; Rimoldi,O.; Camici,P.G. From left ventricular hypertrophy to dysfunction and failure. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 80(3): 555-564, 2016.

Lee,I.M.; Sesso,H.D.; Oguma,Y.; Paffenbarger,R.S.Jr. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. *Circulation*, 107(8): 1110-1116, 2003.

Lee,I.; Shiroma,E.J.; Lobelo,F.; Puska,P.; Blair,S.N.; Katzmarzyk,P.T. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*, 380: 219-229, 2012.

Leeper,N.J.; Myers,J.; Zhou,M.; Nead,K.T.; Syed,A.; Kojima,Y.; Caceres,R.D.; Cooke,J.P. Exercise capacity is the strongest predictor of mortality in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*, 57(3): 728-733, 2013.

Lerchenmüller,C.; Rosenzweig,A. Mechanisms of exercise-induced cardiac growth. *Drug Discovery Today*, 19(7): 1003-1009, 2014.

Levine,B.D. VO<sub>2</sub>max: what do we know, and what do we still need to know? *The Journal of Physiology*, 586(1): 25-34, 2008.

Li,C.; Qiu,Q.; Wang,Y.; Li,P.; Xiao,C.; Wang,H.; Lin,Y.; Wang,W. Time course label-free quantitative analysis of cardiac muscles of rats after myocardial infarction. *Molecular BioSystem*, 10(3): 505-513, 2014.

Lima,N.R.V.; Pereira,W.; Reis,A.M.; Coimbra,C.C.; Marubayashi,U. Prolactin release during exercise in normal and adrenalectomized untrained rats submitted to central cholinergic blockade with atropine. *Hormones and Behavior*, 40: 526-532, 2001.

Lymperopoulos,A.; Rengo,G.; Koch,W.J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation Research*, 113(6): 739-753, 2013.

Lindsey,M.L.; Mayr,M.; Gomes,A.V.; Delles,C.; Arrell,D.K.; Murphy,A.M.; Lange,R.A.; Costello,C.E.; Jin,Y.F.; Laskowitz,D.T.; Sam,F.; Terzic,A.; Van Eyk,J.; Srinivas,P.R. Transformative Impact of Proteomics on Cardiovascular Health and Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 132(9): 852-872, 2015 Liu,R.; Molkentin,J.D. Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101: 44-49, 2016.

- Liu,T.; Chen,L.; Kim,E.; Trand,D.; Phinney,B.S.; Knowlton,A.A. Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure. *Life Sciences*, 101(1-2): 27-36, 2014.
- Liu,R.; Correll,R.N.; Davis,J.; Vagnozzi,R.J.; York,A.J.; Sargent,M.A.; Nairn,A.C.; Molkentin,J.D. Cardiac-specific deletion of protein phosphatase 1 $\beta$  promotes increased myofilament protein phosphorylation and contractile alterations. *Journal of molecular and Cellular Cardiology*, 87: 204-213, 2015.
- Lucini,D. and Pagani,M. Exercise: Should it matter to internal medicine? *European Journal of Internal Medicine*, 22(4): 363-370, 2011.
- Luethy,E.; Scheu,H.; Alsleben,U.; Rothlin,M.; Krayenbuehl,H.P.; Kako,K. Stroke volume and pressure loads in compensated and decompensated hearts. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 16, 94: 692–697, 1964.
- Ma,Y.; Halade,G.V.; Lindsey,M.L. Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5(6): 848-857, 2012.
- Ma,X.; Fu,Y.; Xiao,H.; Song,Y.; Chen,R.; Shen,J.; An,X.; Shen,Q.; Li,Z.; Zhang Y. Cardiac Fibrosis Alleviated by Exercise Training Is AMPK-Dependent. *Plos One*, 10(6), 2015.
- Machida,S.; Kariya,F.; Kobayashi,K.; Narusawa,M. Lack of effect of running training at two intensities on cardiac myosin isoenzyme composition in rats. *The Japanese Journal of Physiology*, 50: 577-83, 2000.
- Macri,J. and Rapundalo,S.T. Application of proteomics to the study of cardiovascular biology. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11(2): 66-75, 2001.
- Maier,L.S. and Bers,D.M. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular Research*, 73: 631–640, 2007.
- Maillet,M.; van Berlo,J.H.; Molkentin,J.D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(1): 38-48, 2013.
- Marx,S.O.; Reiken,S.; Hisamatsu,Y.; Jayaraman,T.; Burkhof,D.; Rosembli,N.; Marks,A.R. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365–376, 2000.
- Mcgregor,E. and Dunn,M.J. Proteomics of the heart: unraveling disease. *Circulation Research*, 98(3): 309-321, 2006.
- Mitra,A.; Basak,T.; Ahmad,S.; Datta,K.; Datta,R.; Sengupta,S.; Sarkar,S. Comparative proteome profiling during cardiac hypertrophy and myocardial infarction reveals altered glucose oxidation by differential activation of pyruvate dehydrogenase E1 component subunit  $\beta$ . *Journal of Molecular Biology*, 427: 2104–2120, 2015.
- Moc,C.; Taylor,A.E.; Chesini,G.P.; Zambrano,C.M.; Barlow,M.S.; Zhang,X.; Gustafsson,Å.B.; Purcell,N.H. Physiological activation of Akt by PHLPP1 deletion protects against pathological hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 105(2): 160-170, 2015.
- Molkentin,J.D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*, 63(3): 467–475, 2004.
- Moore,S.C.; Patel,A.V.; Matthews,C.E.; Gonzalez,A.B.; Park,Y.; Katki,H.A.; Linet,M.S.; Weiderpass,E.; Visvanathan,K.; Helzlsouer,K.J.; Thun,M.; Gapstur,S.M.; Hartge,P.; Lee,I.M. Leisure time physical activity of moderate to vigorous intensity and mortality: a large pooled cohort analysis. *Plos medicine*, 9(11), 2012.

- Morimoto, S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research*, 77: 659-666, 2008.
- Mudd, J.O. and Kass, D.A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 451: 919–928, 2008.
- Myers, J.; Prakash, M.; Froelicher, V. Do, D.; Partington, S.; Atwood, J.E. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *The New England Journal of Medicine*, 346(11): 793-801, 2002.
- Neuhoff, V. and Arold, N. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6): 255-262, 1988.
- Nerbonne, J.M.; Kass, R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiology Review*, 85: 1205-1253, 2005.
- Ni, L.; Zhou, C.; Duan, Q.; Lv, J.; Fu, X.; Xia, Y.; Wang, D.W.  $\beta$ -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. *PLoS One*, 6(11): e27294, 2011.
- Okada, K.; Minamino, T.; Tsukamoto, Y.; Liao, Y.; Tsukamoto, O.; Takashima, S.; Hirata, A.; Fujita, M.; Nagamachi, Y.; Nakatani, T. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*, 110: 705–712, 2004.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Doenças Cardiovasculares. Fact Sheets, n. 317, Mai. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 16 agosto 2016.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). O Dia Mundial do Coração 2013 preconiza hábitos de vida saudável desde a infância. Disponível em: [http://www.paho.org/bireme/index.php?id=219%3Ao-dia-mundial-do-coracao-2013-preconiza-habitos-de-vida-saudavel-desde-a-infancia&option=com\\_content](http://www.paho.org/bireme/index.php?id=219%3Ao-dia-mundial-do-coracao-2013-preconiza-habitos-de-vida-saudavel-desde-a-infancia&option=com_content). Acesso: em 16 agosto. 2016.
- Ori, A.; Toyama, B.H.; Harris, M.S.; Bock, T.; Iskar, M.; Bork, P.; Ingolia, N.T.; Hetzer, M.W.; Beck, M. Integrated Transcriptome and Proteome Analyses Reveal Organ-Specific Proteome Deterioration in Old Rats. *Cell Systems*, 1(3): 224-237, 2015.
- Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4: 552–565, 2003.
- Ostadal, B.; Ostadalova, I.; Dhalla, N.S. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiological Reviews*, 79(3): 635-659, 1999.
- Padrão, A.I.; Ferreira, R.; Amado, F.; Vitorino, R.; Duarte, J.A. Uncovering the exercise-related proteome signature in skeletal muscle. *Proteomics*, 16(5): 816-830, 2016.
- Petriz, B.A.; Gomes, C.P.; Rocha, L.A.; Rezende, T.M.; Franco, O.L. Proteomics applied to exercise physiology: a cutting-edge technology. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3): 885-898, 2012.
- Petriz, B.A.; Almeida, J.A.; Gomes, C.P.; Pereira, R.W.; Murad, A.M.; Franco, O.L. NanoUPLC/MS(E) proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training. *Journal of Proteomics*, 113: 351-365, 2015.
- Petriz, B.A.; Gomes, C.P.; Almeida, J.A.; de Oliveira, G.P.Jr.; Ribeiro, F.M.; Pereira, R.W.; Franco, O.L. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. *Journal of Cellular Physiology*, 2016.

- Piek,A.; de Boer,R.A.; Silljé,H.H. The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 21(2): 199-211, 2016.
- Port,J.D. and Bristow,M.R. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33: 887–905, 2001.
- Puhl,S.L.; Weeks,K.L.; Ranieri,A.; Avkiran,M. Assessing structural and functional responses of murine hearts to acute and sustained  $\beta$ -adrenergic stimulation in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 79: 60-71, 2016.
- Rocha,L.A.; Oliveira,K.S.; Migliolo,L.; Franco,O.L. Effect of Moderate Exercise on Mitochondrial Proteome in Heart Tissue of Spontaneous Hypertensive Rats. *American Journal Hypertension*, 29(6):696-704, 2016.
- Rodrigues,A.G.; Lima,NR.; Coimbra,C.C.; Marubayashi,U. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. *Journal of Applied Physiology*, 97: 333-338, 2004.
- Rotilio,D.; Della Corte,A.; D'imperio,M.; Coletta,W.; Marcone,S.; Silvestri,C.; Giordano,L.; Di Michele,M.; Donati,M.B. Proteomics: bases for protein complexity understanding. *Thrombosis Research*, 129(3): 257-262, 2012.
- Russell,B.; Motlagh,D.; Ashley,W.W. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *Journal of Applied Physiology*, 88: 1127-1132, 2000.
- Samak,M.; Fatullayev,J.; Sabashnikov,A.; Zeriuoh,M.; Schmack,B.; Farag,M.; Popov,A.F.; Dohmen,P.M.; Choi,Y.H.; Wahlers,T.; Weymann,A. Cardiac hypertrophy: An introduction to molecular and cellular basis. *Medical Science Monitor Basic Research*, 22:75-79, 2016.
- Sant'Ana,J.E.; Pereira,M.G.A.G.; Silva,V.J.D.; Dambrós,C.; Costa-Neto,C.M.; Souza,H.C.D. Effect of the duration of daily aerobic physical training on cardiac autonomic adaptations. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 159: 32-37, 2011.
- Santacruz,L.; Hernandez,A.; Nienaber,J.; Mishra,R.; Pinilla,M.; Burchette,J.; Mao,L.; Rockman,H.A.; Jacobs,D.O. Normal cardiac function in mice with supraphysiological cardiac creatine levels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 306(3):H373-381, 2014.
- Santana,L.F.; Cheng,H.; Gómez,A.M.; Cannell,M.B.; Lederer,W.J. Relation between the sarcolemal  $Ca^{2+}$  current and  $Ca^{2+}$  sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circulation Research*, 78: 166-171, 1996.
- Santulli,G.; Iaccarino,G. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. *Maturitas*, 93: 65-72, 2016.
- Shaub,M.C.; Hefti,M.A.; Zuellig,R.A.; Morano,I. Modulation of contractility in human hypertrophy by myosin essential light isoforms. *Cardiovascular Research*, 37: 381-404, 1998.
- Shephard,R.J.; Balady,G.J. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*, 99: 963-972, 1999.
- Stenger,R.J.; Spiro,D. The ultrastructure of mammalian cardiac muscle. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9: 325–351, 1961.
- Shimizu,I.; Minamino,T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97: 245-262, 2016.
- Shimura,M.; Minamisawa,S.; Takeshima,H.; Jiao,Q.; Bai,Y.; Umemura,S.; Ishikawa,Y. Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving  $Ca^{2+}$  handling of the sarcoplasmic reticulum. *Cardiovascular Research*, 77(2): 362-370, 2008.
- Stessman,J.; Hammerman-Rozenberg,R.; Cohen,A.; Ein-Mor,E.; Jacobs,J.M. Physical activity, function, and longevity among the very old. *Archives of Internal Medicine*, 169(16): 1476-83, 2009.

Sun,B.; Wang,J.H.; Lv,Y.Y.; Zhu,S.S.; Yang,J.; Ma,J.Z. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, 3(1): 108-117, 2008.

Tarone,G.; Brancaccio,M.; Keep your heart in shape: molecular chaperone networks for treating heart disease. *Cardiovascular Research*, 102: 346–361, 2014.

Thompson,P.D.; Buchner,D.; Pina,I.L.; Balady,G.J.; Williams,M.A.; Marcus,B.H.; Berra,K.; Blair,S.N.; Costa,F.; Franklin,B.; Fletcher,G.F.; Gordon,N.F.; Pate,R.R.; Rodriguez,B.L.; Yancey,A.K.; Wenger,N.K. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease, 107(24): 3109-3116, 2003.

Tupling,A.R.; Bombardier,E.; Vigna,C.; Quadrilatero,J.; Fu,M. Interaction between Hsp70 and the SR Ca<sup>2+</sup> pump: a potential mechanism for cytoprotection in heart and skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition and metabolism*, 33(5): 1023-1032, 2008.

Urbonavicius,S.; Wiggers,H.; Bøtker,H.E.; Nielsen,T.T.; Kimose,H.H.; Østergaard,M.; Lindholt,J.S.; Vorum,H.; Honoré,B. Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. *Acta Cardiologica*, 64(4): 511-522, 2009.

Van Bilsen,M.; Van Nieuwenhoven,F.A.; Van der Vusse,G.J. Metabolic remodeling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research*, 81(3): 420-428, 2009.

Van Eyk,J.E. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circulation Research*, 108(4): 490-498, 2011.

Van der Vusse,G.J.; Glatz,J.F.; Stam,H.C.; Reneman,R.S. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological Reviews*, 72(4): 881-940, 1992.

Wang,J.J.; Rau,C.; Avetisyan,R.; Ren,S.; Romay,M.C.; Stolin,G.; Gong,K.W.; Wang,Y.; Lusis,A.J. Genetic Dissection of Cardiac Remodeling in an Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model. *Plos Genetics*, 12(7), 2016.

Wang,T.Y.; Chai,Y.R.; Jia,Y.L.; Gao,J.H.; Peng,X.J.; Han,H.F. Crosstalk among the proteome, lysine phosphorylation, and acetylation in romidepsin-treated colon cancer cells. *Oncotarget*, 2016.

Ways,J.A.; Cicila,G.T.; Garret,M.R.; Koch,L.G. A genome scan for Loci associated with aerobic running capacity in rats. *Genomics*. 80(1): 13-20, 2002.

Weiner,R.B. and Baggish,A.L. Exercise-induced cardiac remodeling. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 54: 380-386, 2012.

Willis,M.S.; Patterson,C. Proteotoxicity and cardiac dysfunction—Alzheimer's disease of the heart? *The New England Journal of medicine*, 368:455–464, 2013.

Wilkins,M.R.; Sanchez,J.C.; Gooley,A.A.; Appel,R.D.; Humphery-Smith,I.; Hochstrasser,D.F.; Williams,K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13: 19-50, 1996.

Xie,Y.; Zhang,L.; Zhang,B.; Fang,L. Roles of heat shock factor 1 in isoproterenol-induced myocardial fibrosis in mice. *Molecular Medicine Reportes*, 12(4): 5872-5878, 2015.

Xu,W.; Wang,Y.; Zhou,J.; Zhu,X.; Zhang,S.; Yuan,W.; Liu,X.; Shi,Y.; Cao,L.; Zeng,Q.; Jiang,Z.; Ye,X.; Wan,Y.; Peng,X.; Deng,Y.; Chen,F.; Wang,X.; Dai,G.; Luo,S.; Fan,X.; Mo,X.; Wu,X.; Li, Y. Cardiac Specific Overexpression of hHole Attenuates Isoproterenol-Induced Hypertrophic Remodeling through Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Signalling. *Current Molecular Medicine*, 16(5): 515-523, 2016.

Yang, K.C.; Tseng, Y.T.; Nerbonne, J.M. Exercise training and PI3K $\alpha$ -induced electrical remodeling is independent of cellular hypertrophy and Akt signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 53(4): 532-541, 2012.