UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Caracterização da função e da dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeitos do treinamento físico aeróbico.

JULIANE CRUZ CAMPOS

SÃO PAULO

2012

JULIANE CRUZ CAMPOS

Caracterização da função e da dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeitos do treinamento físico aeróbico.

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento Humano

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

SÃO PAULO

2012

Nome: CAMPOS, Juliane Cruz

Título: Caracterização da função e da dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeitos do treinamento físico aeróbico.

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Dedico essa conquista à memória de minha querida mãe Dalva, exemplo de dedicação, alegria, garra, perseverança, amor e fé. Seus ensinamentos formaram o alicerce da minha história e, apesar de fisicamente ausente, estou certa de sua fiel presença durante a minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu "Chefe", Julio Ferreira, por me aceitar como sua primeira aluna e acreditar em meu potencial. Obrigada pela constante orientação, amizade e sinceridade, que colaboram diariamente para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também por sua paixão pela pesquisa científica, que sempre me contagia.

À minha "avó científica" Patricia Brum, cuja paciência, apoio e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À Aline Bacurau por proporcionar minha entrada no meio científico-acadêmico, pelos ensinamentos, apoio e sincera amizade.

Aos amigos do laboratório e integrantes da família "Pat Brum": Paulo-Gaúcho, Telma, Bozi, Vanessa, Bechara, Dani, Fabi, Chris, Alê, Thiago, Nathalie, Kátia, Bianco, Max, Marcele, Katt, Ney, Alex, Glória e Luciano, por todo auxílio e pelos momentos alegres que passamos juntos. Agradeço a amizade e a paciência.

Ao parceiro de experimentos Bruno Queliconi pelo profissionalismo, ensinamentos, apoio, amizade e principalmente pela disposição nessa longa jornada.

À Alicia Kowaltowski, por sua colaboração cuja importância foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto; e desde agora, pelas colaborações que ainda estão por vir.

À todos do laboratório de Bioenergética, Transporte Iônico e Estado Redox Mitocondriais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela ajuda, profissionalismo, amizade e principalmente pela hospitalidade.

Ao Paulo Magno pela prontidão e disposição para a realização dos exames ecocardiográficos.

À Silvia Guatimosim e a todos do seu laboratório no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à Cibele Resende, pela hospitalidade e colaboração na realização de experimentos com cardiomiócitos isolados.

À Daria Mochly-Rosen por viabilizar a realização de parte deste projeto em seu laboratório e pela oportunidade de vivenciar uma nova cultura.

À Vanessa Zambelli pela amizade, apoio e colaboração científica. Agradeço o acolhimento e a paciência.

Aos meus "pais" Célia e Pedro, e aos meus "irmãos" Fernanda, Fabíola e Danilo pelo amor, carinho, compreensão e respeito. Além de tudo, pelo incentivo e apoio incondicional que tornaram possível a realização deste sonho. Ao meu amado marido Oswaldo por todo o amor, apoio, paciência, compreensão e principalmente pela companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho. Obrigada por me esperar!

À minha avó Ilma pelo amor, cuidado, educação e apoio durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Alex e Dudu pela harmonia, carinho e alegrias que me proporcionaram durante esses anos.

A todos os amigos e familiares, em especial à Tia Cleuza e às famílias Remiro Campos e Ferreira Campos, que sempre me apoiaram e participaram da minha vida.

À Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade, é o a que devem tender os programas e os métodos de ensino.

Rui Barbosa

RESUMO

CAMPOS, J. C. Caracterização da função e da dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: efeitos do treinamento físico aeróbico. 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O infarto do miocárdio é atualmente considerado a etiologia que mais contribui para o aparecimento de insuficiência cardíaca (IC) em humanos. Em detrimento a hiperativação de fatores neuro-humorais, a progressão da IC é caracterizada por uma série de anormalidades celulares associadas à disfunção ventricular. Dentre estas anormalidades, alterações na função e dinâmica mitocondrial merecem destaque, uma vez que a homeostase da organela é essencial para a viabilidade celular e o bom funcionamento da bomba cardíaca. No presente estudo, caracterizamos em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio: a) fenótipo cardíaco; b) função mitocondrial; c) equilíbrio redox; e d) dinâmica mitocondrial. Nossos resultados nos permitem afirmar que doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio, os animais desenvolveram importantes alterações fenotípicas como aumento da massa cardíaca, dilatação ventricular, hipertrofia do cardiomiócito e maior deposição de tecido fibroso cardíaco, que contribuíram para o estabelecimento da disfunção ventricular. Além disso, foi possível confirmar a instalação do quadro de disfunção mitocondrial cardíaca, representada pela redução na capacidade respiratória e perda da homeostase redox. Por fim, encontramos um aumento no número de mitocôndrias cardíacas com menor diâmetro, alterações que vieram acompanhadas de uma menor atividade das enzimas relacionadas à fusão mitocondrial. Uma vez caracterizada a função e a dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca, avaliamos o efeito do treinamento físico aeróbico (TF) nessas variáveis. O TF, atualmente utilizado como um adjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares, foi eficaz em promover o remodelamento cardíaco reverso e melhorar a função cardíaca nos animais infartados. Além disso, melhorou a capacidade respiratória e reduziu o estresse oxidativo, restaurando a função mitocondrial. Aliado a esses achados, o TF normalizou a atividade das enzimas relacionadas à dinâmica mitocondrial, fato associado à normalização do número e tamanho da organela. Esses resultados demonstram que a disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio está associada à um quadro de mitocondriopatia em ratos, com alterações tanto na função quanto estrutura mitocondrial, e que o TF desencadeia efeitos benéficos na manutenção da integridade/função mitocondrial e melhora da função contrátil cardíaca.

Palavras-chave: Disfunção cardíaca. Função mitocondrial. Dinâmica mitocondrial. Treinamento físico aeróbico.

ABSTRACT

CAMPOS, J. C. Characterization of mitochondrial metabolism and dynamics in cardiac dysfunction-induced myocardial infarction in rats: effects of exercise training. 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Myocardial infarction is considered the etiology that most contributes to the onset of heart failure in humans. Among the ventricular dysfunction-associated cellular abnormalities, changes in mitochondrial function and dynamics are critical, since the organelle homeostasis is crucial in maintaining the metabolic, electrical and mechanical properties of the heart. In the present study, we characterized in cardiac dysfunction- induced myocardial infarction in rats: a) cardiac phenotype; b) mitochondrial metabolism; c) redox balance, and d) mitochondrial dynamics. Our results show that twelve weeks after myocardial surgery, the animals developed pathological cardiac remodeling-associated ventricular dysfunction. Furthermore, we observed a reduced mitochondrial respiratory capacity and loss of redox homeostasis. Finally, we found a lower activity of enzymes related to mitochondrial fusion, these changes were accompanied by an increase in the number of small mitochondria. Once characterized mitochondrial function and dynamics, we evaluated the effect of exercise training in these variables in rats with cardiac dysfunction. The exercise training, currently established as an important non-pharmacological treatment for cardiovascular diseases, reversed the pathological cardiac remodeling and minimized the ventricular dysfunction in infarcted animals. Furthermore, exercise training restored the mitochondrial function by increasing respiratory capacity and reducing oxidative stress. Finally, exercise training restored the activity of mitochondrial dynamics-related enzymes and morphology. Taken together, our findings uncover the potential benefits of exercise training in reversing the cardiac mitochondriopathy observed in failing hearts, reinforcing the importance of this intervention as a non-pharmacological tool for heart failure therapy.

Keywords: Cardiac dysfunction. Mitochondrial function. Mitochondrial dynamics. Exercise training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial	25
Figura 2 -	Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesse processo – implicações na morfologia mitocondrial	27
Figura 3 -	Esquema ilustrativo do período experimental, cirurgia e treinamento físico na disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio	38
Figura 4 -	Esquema ilustrativo dos principais parâmetros avaliados no transiente de cálcio	47
Figura 5 -	Imagem representativa de corte transversal do coração de ratos	63
Figura 6 -	Respiração mitocondrial e expressão proteica dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	67
Figura 7 -	Potencial de membrana interna mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	68
Figura 8 -	Captação máxima de cálcio mitocondrial disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	69
Figura 9 -	Transiente de Ca ²⁺ cardíaco na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	71
Figura 10 -	Produção de H ₂ O ₂ durante a respiração mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	73
Figura 11 -	Participação dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons e do desacoplamento mitocondrial na produção de H_2O_2 mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico	

	aeróbico	75
Figura 12 -	Níveis mitocondriais de ânion superóxido na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	76
Figura 13 -	Peroxidação lipídica na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	77
Figura 14 -	Expressão de proteínas carboniladas e formação de adutos de 4-HNE na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	79
Figura 15 -	Atividade antioxidante na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	80
Figura 16 -	Níveis de glutationa na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	81
Figura 17 -	Concentração de ATP na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	82
Figura 18 -	Expressão proteica das enzimas envolvidas na fusão mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	84
Figura 19 -	Expressão proteica das enzimas envolvidas na fissão mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	85
Figura 20 -	Atividade das enzimas envolvidas na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	87
Figura 21 -	Morfologia mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	88
Figura 22 -	Densidade mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição da amostra	40
Tabela 2 -	Medidas ecocardiográficas na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	60
Tabela 3 -	Tolerância ao esforço, morfologia cardíaca, medidas cardiovasculares e antropométricas na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico	64

LISTA DE ABERVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAMKIa	Proteína quinase Iα dependente da calmodulina
CCCP	Desacoplador da membrana interna mitocondrial
CO_2	Dióxido de carbono
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
Drp1	Dynamin-related protein 1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F/F0	Transiente de cálcio; variação global de cálcio intracelular
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FE	Fração de encurtamento
Fis1	Fission 1 homologue protein
GAPDH	Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa oxidada
GSSG	Glutationa reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzimas responsáveis pela hidrólise de GTP
H ₂ O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IC	Insuficiência cardíaca
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
Modo M	Modo monodimensional

NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂	Oxigênio
O_2^-	Ânion superóxido
OPA1	Optical atrophy 1
Pi	Fosfato inorgânico
РКА	Proteína quinase A
PPDi	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPSi	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
SOD	Superóxido dismutase
SHAM	Animais submetidos à cirurgia fictícia de indução de infarto do miocárdio
SIVDi	Septo interventricular na diástole
SIVSi	Septo interventricular na sístole
TF	Treinamento físico aeróbico
VDAC	Voltage-dependent anion channel
4-HNE	4-hidroxinonenal
τ 50	Tempo de recaptação de 50% do cálcio
τ 90	Tempo de recaptação de 90% do cálcio
Λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
$\Lambda_{\rm em}$	Comprimento de onda de emissão
Unidades	
bpm	Batimento por minuto
mmHg	Milímetros de mercúrio
°C	Grau(s) Celsius
μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
nm	Nanômetro
kg	Quilograma
mg	Miligrama
μg	Micrograma
mL	Mililitro
μL	Microlitro

М	Molar
mM	Milimolar
μΜ	Micromolar
nM	Nanomolar
μmol	Micromole
nmol	Nanomole
рН	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	DISFUNÇÃO VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	21
2.2	MITOCÔNDRIA	22
2.2.1	Função mitocondrial	23
2.2.2	Dinâmica mitocondrial	26
2.2.3	Relação Função-Dinâmica mitocondrial	30
2.3	ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS DURANTE A DISFUNÇÃO	
	VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	31
2.3.1	Alterações no metabolismo mitocondrial na disfunção ventricular e	
	insuficiência cardíaca	32
2.3.2	Papel da dinâmica mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência	
	cardíaca	33
2.4	EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA DISFUNÇÃO	
	VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	35
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	AMOSTRA	40
4.2	PROTOCOLO DE CIRURGIA CARDÍACA PARA INDUÇÃO DE	
	INFARTO DO MIOCÁRDIO	40
4.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VENTRICULAR	41
4.4	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ESFORÇO	41
4.5	TREINAMENTO FÍSICO	42
4.6	MEDIDAS CARDIOVASCULARES	42
4.7	SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS	43
4.8	ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS DE RATOS ADULTOS	43
4.9	ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS DE RATOS	
	ADULTOS	44
4.10	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA CARDÍACA	45

4.11	AVALIAÇÃO DO TRANSIENTE DE CÁLCIO NO	
	CARDIOMIÓCITO ISOLADO	45
4.12	CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E DINÂMICA	
	MITOCONDRIAL CARDÍACA	47
4.12.1	Função mitocondrial cardíaca	47
4.12.2	Dinâmica mitocondrial cardíaca	55
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	58
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO DE DISFUNÇÃO	
	CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO:	
	EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO	58
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA	
	EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA	
	AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO	
	FÍSICO AERÓBICO	65
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MITOCONDRIAL	
	CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA	
	ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO	
	TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO	83
6	DISCUSSÃO	92
6.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO DE DISFUNÇÃO	
	CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO:	
	EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO	92
6.1.1	Alterações morfofuncionais cardíacas e parâmetros fisiológicos em	
	modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.	92
6.1.2	Efeitos do treinamento físico aeróbico no remodelamento cardíaco e	
	tolerância aos esforços físicos em modelo animal de disfunção cardíaca	
	associada ao infarto do miocárdio	95
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA	
	EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA	
	AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO	
	FÍSICO AERÓBICO	97

6.2.1	Disfunção mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção	
	cardíaca associada ao infarto do miocárdio	97
6.2.2	Efeitos do treinamento físico aeróbico na função mitocondrial cardíaca	
	em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do	
	miocárdio	102
6.3	CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MITOCONDRIAL	
	CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA	
	ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO	
	TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO	105
6.3.1	Alterações na dinâmica mitocondrial cardíaca em modelo animal de	
	disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio	105
6.3.2	Efeitos do treinamento físico aeróbico na dinâmica mitocondrial	
	cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto	
	do miocárdio	109
6.4	RELAÇÃO FUNÇÃO-DINÂMICA MITOCONDRIAL CARDÍACA	
	EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA	
	AO INFARTO DO MIOCÁRDIO	111
7	CONCLUSÃO	115
8	REFERÊNCIAS	116

1. INTRODUÇÃO

A cardiomiopatia isquêmica é a principal causa da insuficiência cardíaca (IC), uma síndrome clínica de alta incidência e mau prognóstico, caracterizada por alterações morfofuncionais cardíacas, fadiga, dispneia e grande limitação aos esforços físicos, além de diminuição da expectativa de vida (COLUCCI, 1998). Apesar dos grandes avanços no entendimento e no tratamento da IC nos últimos anos, a mortalidade dos pacientes permanece elevada, e oscila em torno de 10% para pacientes nas diferentes classes funcionais de IC, podendo alcançar de 40 a 60% para pacientes em classe funcional IV da *New York Heart Association* (AHMED, ARONOW, FLEG, 2006).

Decorrente da hiperativação sustentada de fatores neuro-humorais, a progressão da disfunção ventricular é caracterizada por uma série de anormalidades celulares que resulta na falência cardíaca (BEER et al., 2002; ROLIM et al., 2007). Dentre os diferentes fatores contribuintes para a disfunção ventricular, o prejuízo no metabolismo energético oriundo da disfunção mitocondrial merece grande atenção, uma vez que parece exercer um papel fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade do cardiomiócito. De fato, a menor produção de trifosfato de adenosina (ATP) (DOENST et al., 2010) e o aumento exacerbado do estresse oxidativo (NOJIRI et al., 2006) são sinais geralmente observados na IC (SHAROV et al., 1998; ROSCA et al., 2008; DOENST et al., 2010). Além das alterações funcionais, atualmente a mitocôndria é reconhecida por sua dinâmica decorrente de flutuações de oxigênio (O₂) e oscilações nas demandas metabólicas celulares, que acabam por modificar a forma, o número e a distribuição da organela para adaptar a célula à disponibilidade de nutrientes (BEREITER-HAHN, 1990; CARLUCCI, LIGNITTO, FELICIELLO, 2008). Essas alterações morfológicas ocorrem pelos processos denominados fusão e fissão mitocondrial. Até o presente momento, não há dados na literatura traçando uma relação de causa-efeito entre função e dinâmica mitocondrial na progressão da disfunção ventricular e IC. Dessa forma, o estudo da inter-relação função-dinâmica mitocondrial em modelo animal de disfunção ventricular oriunda do infarto do miocárdio torna-se necessário.

Utilizado como adjuvante no tratamento da disfunção ventricular e IC, o treinamento físico aeróbico (TF) é considerado uma importante ferramenta na prevenção e no tratamento das alterações desencadeadas durante a progressão da disfunção contrátil cardíaca. De fato, além de promover a melhora na função ventricular esquerda, com consequente aumento na sobrevida dos pacientes, o TF desencadeia uma série de adaptações bioquímicas e

moleculares no músculo cardíaco (SUN et al., 2008), destacando-se a melhora da função mitocondrial (KAVAZIS et al., 2009).

Discorreremos a seguir detalhadamente sobre a importância da função e da dinâmica mitocondrial na disfunção ventricular e IC, bem como e o papel do TF, utilizado como adjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISFUNÇÃO VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A IC resulta da incapacidade dos ventrículos em bombear quantidades adequadas de sangue para manter as necessidades periféricas do organismo (COLUCCI, 1998). Considerada a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório, oriundas primariamente da disfunção ventricular, a IC representa um importante problema de saúde pública no Brasil devido à sua crescente prevalência e morbi-mortalidade associada. Segundo dados do Sistema Único de Saúde¹, em 2007 ocorreram 308.466 óbitos no Brasil devido a doenças do aparelho circulatório, o que representou aproximadamente 30% dos óbitos ocorridos no Brasil naquele ano.

Essa síndrome era descrita primariamente como um distúrbio hemodinâmico associado à diminuição do débito cardíaco, com consequente baixo fluxo renal, levando a retenção de sódio, água e edemas periféricos e pulmonares que acabavam por levar o paciente ao óbito. Atualmente, a IC é vista como uma doença sistêmica e não apenas do coração. Quando o débito cardíaco é reduzido após agressão miocárdica, mecanismos neuro-hormonais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória (CHATTERJEE, 2005). Na tentativa de compensar os efeitos deletérios da doença no estágio inicial e manter o débito cardíaco necessário para atender as demandas energéticas e metabólicas do organismo, uma hiperativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina angiotensina desencadeia respostas compensatórias como taquicardia, aumento da contratilidade miocárdica, hipertrofia cardíaca e remodelamento cardíaco. No entanto, cronicamente essas respostas compensatórias levam a uma disfunção ventricular, aumento do consumo de O₂ pelo miocárdio e aumento da resistência vascular (CHATTERJEE, 2005). Por esses mecanismos, a ativação neuro-humoral contribui de maneira significativa para o aparecimento dos sintomas da síndrome, assim como para a alta mortalidade associada.

Em detrimento a hiperativação de fatores neuro-humorais, a progressão da IC é caracterizada por uma série de anormalidades celulares associadas à disfunção ventricular. De

¹ Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2009/c08.def, consulta realizada em junho de 2011.

fato, a hiperatividade neuro-humoral acarreta na disfunção do transiente de cálcio (Ca^{2+}) cardíaco que resulta no aumento das concentrações de Ca^{2+} citoplasmático na diástole e diminuição da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} (ROLIM et al., 2007). Essas alterações levam por fim a uma disfunção ventricular diastólica (OLIVEIRA et al., 2009). Em paralelo, concentrações elevadas de Ca^{2+} citosólico na diástole também colaboram diretamente para a disfunção mitocondrial, resultando na menor produção de ATP e o maior comprometimento da contratilidade cardíaca na IC (DOENST et al., 2010). Nas décadas de 60 e 70 surgiram os primeiro estudos relacionando a disfunção mitocondrial com esses eventos, onde os cientistas observaram que na tentativa de tamponar o Ca^{2+} citosólico, a mitocôndria começa a captá-lo em excesso (ROSSI, LEHNINGER, 1964; KERR, WYLLIE, CURRIE, 1972). Entretanto, essa sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial resulta no prejuízo do balanço eletroquímico mitocondrial, na abertura dos poros mitocondriais e no extravasamento de citocromo c para o citosol, processos esses que contribuem tanto para a disfunção mitocondrial quanto para a ativação de vias pró-apoptóticas mediadas por caspases (SZABADKAI et al., 2006).

2.2 MITOCÔNDRIA

O significado da palavra mitocôndria (do grego: *mitos*, linha e *chondros*, grão) ilustra que a heterogeneidade da morfologia mitocondrial já era conhecida desde as primeiras descrições da organela. Descoberta em 1857 por Rudolph Albert Von Kolliker, a mitocôndria foi caracterizada como compartimento citoplasmático granular com membrana própria. Em meados de 1950, Palade e Sjostrand publicaram imagens de microscopia eletrônica demonstrando as características ultraestruturais da organela, atualmente conhecida por duas membranas, uma externa e outra interna, um estreito espaço intermembranar e uma ampla matriz. Nesse mesmo período foi demonstrado que a produção de energia é a principal função bioquímica da organela, uma vez que processos como a beta-oxidação, o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa ocorrem no interior da mitocôndria (MITCHELL, MOYLE, 1967). Na década de 60 surgiram os primeiros resultados mostrando a captação de Ca²⁺ pela mitocôndria e o consequente prejuízo em sua função e forma quando a organela era exposta a elevadas concentrações do cátion (ROSSI, LEHNINGER, 1964). Anos mais tarde, Kerr, Wyllie e Currie (1972) descobriram o envolvimento da organela na ativação direta de vias pró-

apoptóticas, adicionando mais uma importante função à mitocôndria (KERR, WYLLIE, CURRIE, 1972).

Com a evolução da microscopia eletrônica e o advento de técnicas de marcação intracelular, na década de 90 foi possível visualizar mudanças na morfologia mitocondrial e no seu rearranjo estrutural frente a diferentes estímulos, caracterizando então a dinâmica mitocondrial e iniciando assim uma nova etapa de estudos (BEREITER-HAHN, 1990).

Paralela à caracterização microscópica da dinâmica mitocondrial, Halles e Fuller (1997) descobriram o primeiro gene relacionado à plasticidade mitocondrial em 1997 (HALLES, FULLER, 1997). Na última década, esse conhecimento ampliou-se drasticamente, e um grupo de genes envolvidos no controle da dinâmica mitocondrial em leveduras foi descoberto, assim como o desenvolvimento dos primeiros modelos transgênicos (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009). Esses foram os estudos pioneiros evidenciando a importância da plasticidade mitocondrial na manutenção da função celular. A mitocôndria, antes considerada uma organela estática, hoje é reconhecida por sua dinâmica, caracterizada pela movimentação intracelular e regulação de sua arquitetura (FREDERICK, SHAW, 2007). Essa dinâmica ocorre em resposta a sinais intra ou extracelulares (ex. hiperativação neurohumoral); às oscilações nas demandas metabólicas, que acabam por modificar a forma, o número e a distribuição da organela para que esta se adapte as necessidades funcionais e energéticas da célula; e às necessidades de manutenção e eliminação do material genético mitocondrial e degradação da organela (BEREITER-HAHN, 1990; CARLUCCI, LIGNITTO, FELICIELLO, 2008). Evidências funcionais foram demonstradas relacionando a dinâmica mitocondrial com o metabolismo oxidativo, apoptose, autofagia e ciclo celular nos últimos anos (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009; ONG et al., 2010).

2.2.1 Função mitocondrial

A mitocôndria, organela central do metabolismo energético, é a principal responsável pelo metabolismo oxidativo dos eucariotos e representa a principal fonte de produção de energia por meio da respiração. O conjunto central de reações envolvidas na produção de ATP é chamado de fosforilação oxidativa, sendo auxiliado pelo Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo de Krebs e pelo processo de beta-oxidação (MITCHELL, MOYLE, 1967). No entanto, vale destacar que a organela também possui outras funções em paralelo à produção de energia

(COLOMBINI, 1987). Atualmente sabemos que a mitocôndria tem um papel-chave na sinalização celular e regulação direta de processos como apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular. Dentre as funções metabólicas que ocorrem na matriz mitocondrial se destaca a síntese de ATP por meio do acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia de transporte de elétrons (CTE). Praticamente toda a energia disponível a partir da oxidação de carboidratos, gorduras e outros substratos é inicialmente armazenada na forma de elétrons de alta energia, provenientes da dissociação dos átomos de hidrogênio em prótons e elétrons, que foram transferidos para o O_2 através de uma série de complexos proteicos (complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase), contendo centros redox consecutivos que possuem afinidade progressiva por elétrons. O gradiente eletroquímico de prótons gerado durante o transporte de elétrons é utilizado para impulsionar a conversão de ADP (adenosina difosfato) + Pi (fosfato inorgânico) em ATP, por meio do complexo ATP sintase (Figura 1) (MITCHELL, MOYLE, 1967).

De forma simplificada, durante o Ciclo de Krebs, por exemplo, os elétrons são doados para carreadores específicos, NAD⁺ (nicotinamida adenina nucleotídeo) e FAD (flavinaadenina dinucleotídeo), formando NADH e FADH₂, respectivamente. Os elétrons provenientes de NADH são transferidos para o complexo I, que na sequência é oxidado, promovendo a redução da coenzima Q. Já os elétrons de FADH₂ são transferidos via complexo II direto para a coenzima Q reduzida. Os elétrons da coenzima Q são transferidos para o complexo III que reduz o citocromo c, uma proteína periférica de membrana. Finalmente, o citocromo c reduz o complexo IV que irá transferir elétrons para o O₂, aceptor final da CTE. A passagem de elétrons por estes carreadores acompanha uma liberação de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, gerando um gradiente eletroquímico que favorece a reentrada de prótons por meio da ATP sintase, esta por sua vez utiliza a energia próton-motriz para fosforilar ADP, gerando ATP. A força próton-motriz é também utilizada para o transporte de íons fosfato para o interior da organela, além da troca de ATP intramitocondrial por ADP extramitocondrial (MITCHELL, MOYLE, 1967).



Figura 1 – Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase; e⁻ - elétrons; H⁺ - íons hidrogênio; NADH – nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida; FADH₂ – flavina-adenina dinucleotídeo reduzida; Q – coenzima Q; Cit c – citocromo c (Adaptado de Tahara et al., 2009) (TAHARA, NAVARETE, KOWALTOWSKI et al., 2009).

Os elétrons transportados pela CTE nem sempre chegam ao seu aceptor final, o O₂ complexado à citocromo c oxidase (complexo IV). Postula-se que aumentos, tanto no consumo de O₂, quanto no fluxo de elétrons pela CTE (SEN, 1995), assim como o potencial de membrana interna mitocondrial (SKULACHEV, 1998), são determinantes para o extravasamento de elétrons e consequente formação de espécies reativas de O₂ (EROs). Os complexos I e III, ao invés de doarem os elétrons para o próximo componente da cadeia, podem doá-los para o O_2 , formando o ânion superóxido (O_2^-) , um radical livre capaz de causar dano oxidativo em diversos componentes mitocondriais e celulares. De fato, Friguet, Bulteau e Petropoulos (2008) demonstraram que a produção exacerbada de EROs pode inativar diretamente proteínas mitocondriais ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, gerando uma disfunção mitocondrial (FRIGUET, BULTEAU, PETROPOULOS, 2008). A alta toxicidade das EROs é atenuada devido à presença de defesas antioxidantes na matriz mitocondrial, tais como a glutationa e a superóxido dismutase (SOD). Esta última, normalmente utilizada como ferramenta analítica de estresse oxidativo, catalisa a reação de O₂⁻ a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), reação de extrema importância para o balanço oxidativo mitocondrial (BARJA, 1999).

Além de participar efetivamente da síntese de ATP e da produção de EROs, a mitocôndria está intimamente relacionada com os processos de envelhecimento e morte

celular programada. Vários estudos vêm demonstrando que sinais intracelulares, como alterações nas concentrações de Ca²⁺, causam modificações no interior da organela e resultam na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), culminando na liberação de importantes proteínas próapoptóticas para o citosol, como o citocromo c (SZABADKAI et al., 2006; ELMORE, 2007). De fato, Kujoth et al. (2005) demonstraram que camundongos transgênicos que possuem um aumento na abertura dos PTPM apresentam um fenótipo de envelhecimento acelerado, acompanhado de apoptose e sarcopenia (KUJOTH et al., 2005). Por outro lado, a literatura atual demonstra que um leve desacoplamento da membrana mitocondrial parece otimizar a função da organela em diferentes tecidos, uma vez que leva à diminuição de EROs e ao aumento nas taxas respiratórias (CALDEIRA DA SILVA et al., 2008; CERQUEIRA, LAURINDO, KOWALTOWSKI, 2011).

Nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa também têm demonstrado a importante contribuição da disfunção mitocondrial no agravamento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson (HOEKSTRA et al., 2011; LIM et al., 2011), bem como na IC (ROSCA, HOPPEL, 2010; JAVADOV et al., 2011). Dessa forma, o melhor entendimento da biologia mitocondrial na progressão de doenças degenerativas pode trazer novas possibilidades terapêuticas no tratamento dessas doenças.

Os estudos relacionando a função mitocondrial no tecido cardíaco, mais especificamente na disfunção cardíaca, serão abordados no item 2.3.1 (Alterações na função mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência cardíaca).

2.2.2 Dinâmica mitocondrial

A dinâmica mitocondrial é um processo que consiste no movimento da organela ao longo da célula, na regulação de sua estrutura (morfologia e distribuição) e em sua conectividade. Esses processos são diretamente mediados pelos processos de fusão e fissão mitocondriais (Figura 2).



Figura 2 – Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesses processos – implicações na morfologia mitocondrial. Drp1 – dynamin-related protein 1; Fis1 – fission 1 homologue protein; Mfn1 – mitofusina 1; Mfn2 – mitofusina 2 e OPA1 – optical atrophy 1 (Adaptado de Liesa, Palacin e Zorzano, 2009) (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009).

Fusão mitocondrial

A fusão mitocondrial caracteriza-se pela união de duas ou mais mitocôndrias, sendo regulada pela ação de duas classes de GTPases: mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e *optical atrophy 1* (OPA1). Essas proteínas têm sua ação ativada pela hidrólise de guanosina trifosfato (GTP), uma purina cuja função se assemelha à do ATP. O processo de fusão mitocondrial é dividido em duas etapas, onde as membranas, externa e interna, se fundem em eventos separados. As mitofusinas estão ancoradas na membrana externa da mitocôndria e são responsáveis pela fusão das mesmas, enquanto que a OPA1, presente na membrana interna atua fundindo as membranas internas das duas organelas (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009) (Figura 2). No entanto, o mecanismo explicando a fusão coordenada das membranas mitocondriais bem como a elucidação dos fatores que sinalizam uma região específica da organela que inicie todo esse processo permanece indeterminado.

A literatura atual vem demonstrando que a fusão mitocondrial é essencial para os processos de desenvolvimento embrionário e morte celular. De fato, a ablação das mitofusinas em roedores resulta em letalidade embrionária (CHEN et al., 2003). Além disso,

camundongos com ablação da Mfn2 apresentam morte das células de Purkinje com concomitante prejuízo no desenvolvimento cerebelar, deficiência no crescimento dos dendritos e na formação da medula espinhal (CHEN, CHAN, 2005). Outro aspecto importante da fusão mitocondrial envolve o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Um estudo genético em humanos demonstrou que mutações na Mfn2 levam à doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, uma neuropatia periférica que prejudica primariamente os neurônios sensório-motores (ZUCHNER et al., 2004).

Além das mitofusinas, a OPA1 também apresenta papel importante no desenvolvimento embrionário. A ablação da OPA1 causa alta mortalidade após nascimento em roedores, onde os camundongos heterozigotos para a proteína, cuja redução dos níveis da proteína foi de aproximadamente 50%, apresentam prejuízos na visão (DAVIES et al., 2007). Alexander et al. (2000) mostraram que mutações na OPA1 causam atrofia óptica dominante em humanos, uma doença degenerativa do nervo ótico (ALEXANDER et al., 2000).

Os estudos relacionando a fusão mitocondrial e o tecido cardíaco, mais especificamente na disfunção cardíaca, serão abordados no item 2.3.2 (Papel da dinâmica mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência cardíaca).

Fissão mitocondrial

A fissão mitocondrial é caracterizada pela divisão de uma mitocôndria em duas ou mais novas organelas, e este processo facilita o transporte da organela dentro da célula, permitindo um rápido tráfego mitocondrial para regiões com maior demanda energética, ou o direcionamento para a degradação lisossomal (SKULACHEV, 2001; PALANIYANDI et al., 2010). As proteínas que participam da fissão mitocondrial identificadas até o momento são: dynamin-related protein 1 (Drp1) e fission 1 homologue protein (Fis1). A Drp1 está localizada principalmente no citosol e sua atividade é semelhante a das proteínas de fusão, ou seja, atua sob a hidrólise de GTP. Durante o processo de fissão, a Drp1 transloca-se do citosol para a membrana externa da mitocôndria e liga-se à proteína Fis1, uma proteína de 17 kDa ancorada na membrana externa da organela. Esse processo parece ser responsável pela fissão da membrana externa mitocondrial (JAMES et al., 2003) (Figura 2). Em relação à fissão da membrana interna, o único gene descoberto em mamíferos que pode estar envolvido nesse processo é o da proteína mitocondrial 18 kDa (MTP18), localizada no espaço intermembranar, que tem uma ação semelhante à Fis1 (TONDERA et al., 2005). Entretanto, os mecanismos que atuam na fissão da membrana interna ainda não foram totalmente elucidados.

Até o presente momento, sabe-se que a fissão mitocondrial parece estar envolvida em processos celulares como: apoptose, função neuronal e ciclo celular. De fato, o aumento na expressão do gene da Drp1 induz uma maior fissão mitocondrial associada à morte celular programada em *Caenorhabditis elegans*, enquanto que sua inibição por um gene mutante dominante negativo diminui essa suscetibilidade ao prevenir a perda do potencial de membrana mitocondrial e consequente translocação do citocromo c para o citosol (FRANK et al., 2001). Li et al. (2004) demonstraram que o aumento na expressão da Drp1 aumenta o número de dendritos em cultura de células de neurônios de ratos (LI et al., 2004), resultados que vão de encontro ao de Wang et al. (2008) que encontraram uma redução na expressão da Drp1 em fibroblastos de pacientes com Alzheimer (WANG et al., 2008), sugerindo a necessidade de uma alta frequência de fissão mitocondrial para a manutenção da função e plasticidade neuronal.

Além dos resultados encontrados com a Drp1, alterações na expressão da proteína Fis1 parecem exercer importante papel na regulação da fissão mitocondrial, onde a superexpressão da Fis1 em cultura de células *Hela* causa uma liberação exacerbada de citocromo c para o citosol e leva à fragmentação da organela. Além disso, a depleção da Fis1 resulta num fenótipo celular resistente a apoptose. Apesar da ação da Fis1 estar intimamente ligada à Drp1, a inibição da Drp1 não previne a morte celular induzida por Fis1, sugerindo um estímulo apoptótico independente (JAMES et al., 2003).

Além dos estudos utilizando animais transgênicos e nocautes no entendimento do papel da Drp1 no processo de fissão mitocondrial, recentemente foi mostrado que alterações pós-traducionais da Drp1 mediadas por quinases e fosfatases específicas são capazes de regular diretamente o processo de fissão mitocondrial. Cribbs e Strack (2007) demonstraram em cérebros de ratos e humanos, que a proteína quinase A (PKA) é capaz de fosforilar a Drp1 na serina 637, inibindo sua atividade GTPase e reduzindo o processo de fissão (CRIBBS, STRACK, 2007). Por outro lado, foi demonstrado que proteínas diretamente reguladas pelas concentrações de Ca²⁺ intracelular, como a proteína quinase I α dependente da calmodulina (CAMKI α) e a calcineurina parecem exercer importante papel na ativação da Drp1. Recentemente, Han et al. (2008) demonstraram em cultura de neurônios de ratos neonatos que o aumento no influxo de Ca²⁺ através dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem pode ativar a translocação da Drp1 do citosol para a membrana externa da mitocôndria, resultando em maior fissão mitocondrial decorrente da fosforilação da Drp1 na serina 600 pela CAMKI α (HAN et al., 2008). Cereghetti et al. (2008) demonstraram em células *Hela* que a desfosforilação da Drp1 na serina 637 pela calcineurina (sítio de fosforilação pela PKA)

29

resultou no aumento da fissão mitocondrial (CEREGHETTI et al., 2008). Entretanto os autores não avaliaram a atividade GTPase da Drp1 para traçar uma relação causal.

Os estudos relacionando fissão mitocondrial e tecido cardíaco, mais especificamente na disfunção cardíaca, serão abordados no item 2.3.2 (Papel da dinâmica mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência cardíaca).

2.2.3 Relação Função-Dinâmica mitocondrial

Como evidência do impacto da estrutura mitocondrial sobre a função da organela, estudos vêm demonstrando que uma ramificação otimizada da mitocôndria, induzida por upregulation do processo de fusão, ou por downregulation da fissão mitocondrial, pode prevenir e até mesmo reduzir a sinalização para apoptose em cultura de células. De fato, Yu et al. (2008) demonstraram, em cultura de cardiomiócitos neonatos exposta a alta concentração de glicose, que a inibição da fissão mitocondrial pela superexpressão do mutante dominante negativo da proteína Drp1 preveniu a superprodução de EROs, a permeabilidade mitocondrial e a subsequente morte celular sustentada pela alta taxa de glicose, sugerindo que o processo de fissão mitocondrial contribui para esses eventos (YU et al., 2008). O mesmo perfil pode ser observado em células HL-1, linhagem de células provenientes do músculo cardíaco, submetidas ao processo de isquemia/reperfusão (ONG et al., 2010). Similarmente, o tratamento de cultura de cardiomiócitos neonatos com ceramida afetou a dinâmica mitocondrial, promovendo a fissão da organela e levando a apoptose (PARRA et al., 2008). Além disso, a fragmentação mitocondrial tem sido associada à redução na capacidade respiratória da organela em cultura primária de fibroblastos e células humanas (KOOPMAN et al., 2005; BERNARD et al., 2007). O oposto parece ocorrer com relação ao processo de fusão mitocondrial. A Mfn2, proteína envolvida na fusão da membrana externa da mitocôndria, influencia diretamente no aumento da expressão de genes relacionados à fosforilação oxidativa, indicando uma sobreposição entre as vias regulatórias para a morfologia mitocondrial e o metabolismo energético (PICH et al., 2005; CHEN et al., 2010). Outra demonstração clara de que a fusão mitocondrial desempenha um papel importante na função da organela é o fato de que camundongos com deleção do gene da Mfn2 acumulam mutações em seu DNA mitocondrial e apresentam, ao longo da vida, uma redução na capacidade oxidativa, além de prejuízos na termogênese e déficit de crescimento (CHEN et al., 2010). Baseado nos trabalhos descritos acima, observa-se que um contínuo balanço entre os processos de fusão e fissão da mitocôndria é importante para a manutenção da função, distribuição e conectividade mitocondrial.

Por outro lado, alterações na função mitocondrial também desencadeiam importantes modificações na estrutura da organela. Guillery et al. (2008) demonstraram que tanto a inibição farmacológica dos complexos respiratórios I, II, IV ou V, como a dissipação do potencial de membrana mitocondrial em fibroblastos leva à fragmentação mitocondrial, e que esse processo é reversível (GUILLERY et al., 2008). Além disso, o desacoplamento do potencial de membrana mitocondrial leva à clivagem da OPA1, proteína envolvida na fusão da membrana interna da organela, prejudicando o processo de fusão mitocondrial (MCBRIDE, SOUBANNIER, 2010).

Esta profunda interdependência entre a morfologia e a função mitocondrial representa uma importante ferramenta de estudos no que se refere às doenças, uma vez que está intimamente relacionada à viabilidade celular. De fato, em patologias como diabetes, miopatia, câncer, doenças do fígado e neurodegenerativas, assim como no envelhecimento, foram observadas alterações na morfologia mitocondrial, bem como uma disfunção mitocondrial (WALLACE, 1999; ZUCHNER et al., 2004; KUJOTH et al., 2005; WANG et al., 2008). Entretanto, a participação efetiva desses processos no desenvolvimento das doenças ainda não foi descrita devido à escassez de métodos bioquímicos capazes de quantificar as frequências de fusão e fissão mitocondriais. Vale ressaltar que essa relação ainda não foi descrita na IC.

2.3 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS DURANTE A DISFUNÇÃO VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

As mitocôndrias representam aproximadamente um terço da massa cardíaca e desempenham um papel crítico na manutenção da função celular, entretanto, elas também são uma poderosa fonte de radicais livres e fatores pró-apoptóticos (ROSCA, HOPPEL, 2010). Dessa forma, a manutenção da homeostase mitocondrial é essencial para a viabilidade celular.

Responsável pela fonte primária de energia na forma de ATP, as mitocôndrias fornecem o combustível necessário para o aparelho contrátil e, portanto, são primordiais para o bombeamento cardíaco. Com o intuito de manter a atividade elétrica e mecânica, o coração

precisa de um fornecimento contínuo de energia, sendo essa exigência alcançada pela síntese diária de aproximadamente 30 quilogramas de ATP, produzida principalmente por fosforilação oxidativa (ASHRAFIAN, FRENNEAUX, 2007). Para o fornecimento adequado de ATP ao cardiomiócito, a função mitocondrial é regulada, de maneira transiente, de acordo com a necessidade energética celular por meio de vias de sinalização que envolvem mensageiros intermediários, como o Ca²⁺ e as EROs. Sendo assim, um contínuo controle de qualidade mitocondrial se faz necessário para garantir a ótima função da organela. Esse controle de qualidade envolve os processos de fusão-fissão, autofagia e biogênese mitocondrial. Nos últimos anos, intervenções que modulam o *turnover* mitocondrial, como o exercício físico, a restrição calórica e os agentes farmacológicos vêm sendo estudados como um meio para melhorar o controle de qualidade mitocondrial, reverter a disfunção cardiovascular e aumentar a longevidade (CALDEIRA DA SILVA et al., 2008; CERQUEIRA, LAURINDO, KOWALTOWSKI, 2011; PALANIYANDI et al., 2010; GOTTLIEB, GUSTAFSSON, 2011).

2.3.1 Alterações no metabolismo mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência cardíaca

Estudos recentes vêm demonstrando que a disfunção mitocondrial está envolvida no agravamento da disfunção cardíaca, uma vez que a diminuição na produção cardíaca de energia se faz presente tanto em modelo animal de disfunção ventricular, como em pacientes com IC e cardiomiopatias. A disfunção ventricular modifica grande parte do aparato energético no cardiomiócito, interferindo na produção de ATP, na oxidação de substratos e na transferência de energia para a contração cardíaca (ROSCA, HOPPEL, 2009). De fato, estudos clínicos e experimentais demonstram que existe uma mudança na utilização de substratos pelo coração em falência, havendo um favorecimento da oxidação de glicose no lugar de ácidos graxos, que acabam por levar o coração a um déficit energético (SHAROV et al., 1998; ROSCA et al., 2008; DOENST et al., 2010). Sharov et al. (1998) identificaram em modelo canino de IC, a redução na produção de ATP cardíaco, fruto do prejuízo na respiração estimulada por ADP (SHAROV et al., 1998). Rosca et al. (2008) encontraram resultados semelhantes, caracterizados pela diminuição na densidade mitocondrial no mesmo modelo de

IC, fator que contribui para a redução na capacidade do miocárdio em oxidar ácidos graxos como substrato energético (ROSCA et al., 2008).

Outra importante modificação metabólica presente na IC relacionada ao déficit energético cardíaco envolve o estresse oxidativo. A disfunção mitocondrial na presença de O_2 resulta, na maioria das vezes, no desacoplamento da CTE e no consequente prejuízo da fosforilação oxidativa, gerando EROs em excesso. Essas alterações na homeostase redox sinalizam para o dano miocárdico e culminam na diminuição progressiva da contratilidade cardíaca. De fato, Nojiri et al. (2006) observaram que camundongos com deficiência na defesa antioxidante apresentavam uma redução na atividade dos complexos da CTE mitocondrial e uma cardiomiopatia dilatada progressiva (NOJIRI et al., 2006).

Além de alterações na respiração, um grande número de evidências experimentais indica que durante o infarto do miocárdio a abertura dos PTPM desempenha um papel crucial nos danos irreversíveis desencadeados após a reperfusão miocárdica (FUJITA et al., 2007; GOMEZ et al., 2009; JAVADOV et al., 2011). Nesse sentido, estudos clínicos recentes suportam a ideia de que a administração de ciclosporina A, uma droga que inibe a formação dos PTPM, imediatamente após o infarto do miocárdio, pode reduzir o tamanho da área infartada e melhorar a recuperação da função contrátil do coração após a reperfusão, além de aumentar a sobrevida dos pacientes e prevenir a instalação da IC (GOMEZ et al., 2009).

Baseado nesses dados, podemos afirmar que o melhor entendimento da disfunção mitocondrial na IC é crucial e constitui a base de uma estratégia terapêutica para manter a integridade mitocondrial, otimizar o metabolismo energético, reduzir o estresse oxidativo, e melhorar a função contrátil do miocárdio.

2.3.2 Papel da dinâmica mitocondrial na disfunção ventricular e insuficiência cardíaca

Até o presente momento, não há relatos na literatura traçando uma relação causal entre dinâmica mitocondrial e IC. O primeiro relato sobre a morfologia mitocondrial em pacientes com IC data do ano de 1974, onde Jones et al. (1975) demonstraram que pacientes com IC congênita apresentavam mitocôndrias desorganizadas e em menor tamanho (JONES et al., 1975). Sete anos mais tarde, ao examinar biópsias cardíacas de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, Baandrup et al. (1981) encontraram mitocôndrias gigantes com baixa densidade de matriz mitocondrial, associadas a um aumento no número dessas mitocôndrias

(BAANDRUP et al., 1981). Além disso, foi demonstrado o mesmo fenótipo em pacientes com cardiomiopatia dilatada (SCHOLZ, DIENER, SCHAPER, 1994) e em modelo canino de IC crônica de gravidade moderada (SHAROV et al., 1998), sugerindo modificações na dinâmica mitocondrial nas doenças cardíacas. Outras alterações em componentes celulares, não mitocondriais, também parecem estar associadas a mudanças na morfologia da organela. De fato, camundongos com mutação na troponina I cardíaca, que mimetiza a cardiomiopatia hipertrófica, apresentam degeneração miofibrilar associada a um aumento no número de mitocôndrias menores com perda da crista e da membrana da organela (TARDIFF et al., 1999). Essas modificações mitocondriais estão associadas, como descrito na seção anterior, a mudanças bioenergéticas da organela, comprometendo o bom funcionamento da bomba cardíaca.

Além das alterações morfológicas, também foram descritas mudanças na expressão dos genes e proteínas relacionados com a dinâmica mitocondrial no coração. Inicialmente, Santel et al. (2003) demonstraram pelas técnicas de Northern e Western blot, a presença das proteínas Mfn1 e Mfn2 no coração de humanos sadios (SANTEL et al., 2003) e posteriormente, Chen et al. (2009) constataram a presença das proteínas envolvidas tanto na fusão (Mfn1, Mfn2 e OPA1) quanto na fissão (Drp1 e Fis1) mitocondrial em corações de humanos e ratos (CHEN et al., 2009). O primeiro e único estudo a investigar as proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial cardíaca na IC foi realizado por Chen et al. (2009). Por meio da técnica de Western blot eles identificaram uma diminuição significativa dos níveis proteicos da OPA1 na mitocôndria cardíaca tanto em modelo de ratos com IC de etiologia isquêmica quanto em biópsias cardíacas de humanos que apresentavam cardiomiopatia dilatada de origem isquêmica. Além disso, no modelo humano também foram observados aumentos nos níveis cardíacos das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1 (CHEN et al., 2009). Esses dados sugerem que as alterações no perfil de expressão das proteínas OPA1, Mfn1, Mfn2 e Drp1 podem estar envolvidas no balanço fusão/fissão da mitocôndria cardíaca e contribuir para o agravamento da IC. Recentemente, Ong et al. (2010) demonstraram uma redução na área de infarto de camundongos submetidos à oclusão da artéria coronária, seguida de reperfusão, após tratamento com um inibidor da divisão mitocondrial (ONG et al., 2010). Em conjunto, esses dados confirmam a participação da dinâmica mitocondrial no processo de disfunção mitocondrial, seguida de morte celular, entretanto, baseado somente nos dados de expressão proteica torna-se difícil traçar uma relação causal entre a dinâmica-função mitocondrial e a progressão da IC.

Recentemente, um trabalho publicado pelo nosso grupo mostrou que o estabelecimento da IC é caracterizado por anormalidades no transiente de Ca²⁺ intracelular, apontadas pela diminuição do pico de Ca²⁺ na sístole e aumento nas concentrações de Ca²⁺ citosólico na diástole, que colaboram diretamente para o agravamento da disfunção ventricular na IC (ROLIM et al., 2007). Em paralelo, observamos em outro trabalho que proteínas diretamente reguladas pelas concentrações de Ca²⁺ citosólico, como a CAMKIa e a calcineurina, estavam hiperativadas, colaborando diretamente para o agravamento da IC (OLIVEIRA et al., 2009). Baseado nos dados publicados por Han (2008) e Cereghetti (2008), mostrando uma regulação direta da Drp1 pelas CAMKIa e calcineurina, acreditamos que a anormalidade no transiente de Ca²⁺ na IC contribui diretamente para o desbalanço entre os processos de fusão e fissão, colaborando para a disfunção mitocondrial cardíaca e o agravamento da síndrome. Além disso, atualmente sabe-se que a atividade da PKA na IC está diminuída em resposta a uma dessensibilização dos receptores β-adrenérgicos cardíacos (REITHMANN, WERDAN, 1989), e sabendo que a PKA é capaz de diminuir a atividade a Drp1 (CRIBBS, STRACK, 2007), acreditamos que a uma menor fosforilação da Drp1 pela PKA pode contribuir para o desbalanço na dinâmica mitocondrial e agravamento da IC.

Vale ressaltar que grande parte dos estudos sobre a dinâmica mitocondrial cardíaca foi realizada em cultura de cardiomiócitos isolados de ratos neonatos, contudo, parece que a morfologia da organela nesse modelo não reflete o fenótipo encontrado no coração de animais adultos (ANESTI, SCORRANO, 2006). Encontrar a maneira mais efetiva de modular a dinâmica mitocondrial na IC representa um importante passo para o futuro das pesquisas no tratamento da síndrome.

2.4 EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA DISFUNÇÃO VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Até o inicio da década de 1970, os pacientes com IC eram aconselhados a restringir suas atividades para evitar aumento exacerbado da ativação nervosa simpática e da frequência cardíaca. A partir da década de 1970 e inicio da década de 1980, no entanto, o efeito do TF na IC começou a despertar interesse. Neste período, demonstrou-se que um programa regular de exercícios físicos é seguro e, sobretudo, eficiente em aumentar a capacidade funcional de pacientes infartados com disfunção ventricular esquerda (CONN, WILLIAMS, WALLACE,
1982). Dentre os principais benefícios do TF, destacam-se: redução da hiperatividade nervosa simpática, melhora na função ventricular esquerda, remodelamento cardíaco reverso, aumento na tolerância aos esforços físicos e mudança no metabolismo muscular esquelético – de glicolítico para oxidativo (ROLIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; ANTUNES-CORREA et al., 2011). Além disso, o TF promove diversas adaptações bioquímicas e moleculares no músculo cardíaco (SUN et al., 2008; KAVAZIS et al., 2009).

Como mencionado nas seções anteriores, tem sido relatado na literatura um déficit energético no músculo cardíaco em pacientes portadores de IC (ROSCA et al., 2008; DOENST et al., 2010). Dessa forma, a melhoria do aporte energético no miocárdio torna-se uma abordagem promissora no tratamento da síndrome. Sabemos também que durante o exercício físico, o metabolismo cardíaco aumenta drasticamente quando comparado à condição basal, resultando no aumento do consumo de O₂ e promoção de uma série de adaptações mitocondriais, que colaborarão para o bom funcionamento do coração (KAVAZIS et al., 2009). De fato, sabemos que o TF propicia importantes adaptações na função mitocondrial cardíaca como o aumento da atividade dos complexos respiratórios I, III e IV da CTE (ALBERTO BOVERIS, 2008), com consequente redução na produção de EROs (JUDGE, 2005).

Como foi descrito anteriormente, a dinâmica mitocondrial é um importante modulador da função mitocondrial, porém não há relatos na literatura sobre os efeitos do TF nesta regulação. Desta maneira, a caracterização da função e da dinâmica mitocondrial na IC de etiologia isquêmica, assim como o efeito do TF nessas variáveis é tema atual e relevante.Considerando-se o fato de que a progressão da disfunção ventricular para a IC é um importante problema de saúde pública², e que a função e dinâmica mitocondrial exercem papéis fundamentais na manutenção da viabilidade celular (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009), hipotetizamos que a plasticidade e função da organela estariam alteradas na disfunção cardíaca, contribuindo para o desenvolvimento da IC. Para isso, utilizamos um modelo de disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, em que a artéria coronária esquerda foi ocluída permanentemente provocando importante isquemia ventricular esquerda. A importância desse modelo é demonstrada pelo fato de que 70% dos casos de IC são oriundos de etiologia isquêmica (GHEORGHIADE, BONOW, 1998). Além disso, estudamos o efeito do TF na função e dinâmica mitocondrial, uma vez que o mesmo desencadeia uma série de

² Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2009/c08.def, consulta realizada em junho de 2011.

adaptações bioquímicas e moleculares no músculo cardíaco (SUN et al., 2008), destacando-se a melhora da função mitocondrial (KAVAZIS et al., 2009). Esse estudo se faz necessário, pois contribuirá para o entendimento do papel da plasticidade mitocondrial no controle da função e integridade mitocondrial na fisiopatologia cardíaca. E futuramente será de grande valia para o emprego de terapias tanto farmacológicas quanto não farmacológicas no tratamento da disfunção ventricular e possível regressão da IC.

3. OBJETIVOS

Investigar a função e a dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio em ratos, bem como estudar o efeito do TF nessa resposta (Figura 3). Para isso, os objetivos foram divididos em três etapas:



Figura 3 – Esquema ilustrativo do período experimental, cirurgia e treinamento físico na disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.

• Caracterizar os parâmetros funcionais e morfológicos cardíacos de ratos controle (SHAM) e com disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio (DISFUNÇÃO CARDÍACA), sedentários e treinados. Para isso avaliamos:

- A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo;
- A tolerância à realização de esforço;
- O comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca no repouso;

- A morfologia cardíaca: área de infarto, diâmetro dos cardiomiócitos e deposição de colágeno cardíaco.

• Estudar a homeostase redox e a função mitocondrial cardíaca de ratos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA, sedentários e treinados. Para isso avaliamos:

- O consumo de oxigênio (O₂) da mitocôndria cardíaca isolada;
- O potencial de membrana interna da mitocôndria cardíaca isolada;
- A permeabilidade dos poros mitocondriais na mitocôndria cardíaca isolada;
- A liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela mitocôndria cardíaca isolada;
- A produção mitocondrial de O₂⁻ no cardiomiócito isolado;
- Os níveis de peroxidação lipídica (malondialdeído) no lisado cardíaco;

- Os níveis de proteínas carboniladas e de adutos de 4-HNE (4-hidroxinonenal) no lisado cardíaco;

- A atividade da catalase no lisado cardíaco;

- A atividade da superóxido dismutase (SOD) no lisado cardíaco;

- Os níveis de glutationa oxidada e reduzida no lisado cardíaco;

- A expressão proteica dos Complexos respiratórios I, III e V da CTE na fração mitocondrial cardíaca;

- Os níveis de ATP no lisado cardíaco.

• Estudar a dinâmica mitocondrial cardíaca de ratos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA, sedentários e treinados. Para isso avaliamos:

- A expressão proteica da Mfn1, Mfn2, OPA1, Drp1 e Fis1 na fração mitocondrial;

- A atividade GTPase específica das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1 na fração mitocondrial;

- A densidade mitocondrial;

- A morfologia mitocondrial cardíaca (número e área).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Para a realização do presente projeto, foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os ratos utilizados neste estudo foram mantidos em Biotério, com temperatura controlada entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro invertido 12: 12 horas e foram divididos em quatro grupos, de acordo com a Tabela 1.

A inversão do ciclo claro-escuro foi realizada através de um *timer* instalado na sala do Biotério. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

Grupos	SHAM	SHAM-TF	DISFUNÇÃO CARDÍACA	DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF	
Número de animais	20	15	15	15	

Tabela 1 – Distribuição da amostra (n total = 65)

4.2 PROTOCOLO DE CIRURGIA CARDÍACA PARA INDUÇÃO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

Os ratos Wistar com oito semanas de idade foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) intraperitoneal e foram entubados para ventilação mecânica (70 pulsos/minuto; 2,5 mL/pulso). Uma toracotomia esquerda, sob condições assépticas, foi realizada no terceiro espaço intercostal e o pericárdio foi aberto. No grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA a artéria coronária esquerda foi ligada distalmente a 2 mm de sua origem com fio de polipropileno não absorvível (5.0, ETHICON, Brasil), finalizando com a retirada do pneumotórax e o fechamento do tórax. No grupo controle (SHAM) os animais foram submetidos ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária

esquerda. Esses experimentos foram realizados em nosso laboratório. As análises foram feitas quatro e doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio.

4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VENTRICULAR

Para confirmar o desenvolvimento da disfunção cardíaca e o efeito do TF na função cardíaca, a avaliação da função ventricular foi realizada por ecocardiografia em colaboração com o Dr. Paulo Magno Martins Dourado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado em todos os ratos quatro e doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio. Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Imagens do modo-M foram adquiridas a partir de um ecocardiógrafo (Acuson Sequoia 512, EUA) equipado com transdutor linear de 15 megahertz. Foram obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDFVE) e sistólico (DSFVE) final do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular na diástole (SIVDi), espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) e parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis) e diástole (PPDi). Essas medidas foram utilizadas para calcular a fração de encurtamento (FE), obtida pela fórmula: FE (%) = $[(DDFVE - DSFVE) / DDFVE] \times 100$. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978).

4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ESFORÇO

Algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Em trabalhos anteriores de nosso laboratório foi observada uma excelente correlação entre os índices de disfunção cardíaca durante o exercício físico e a fração de encurtamento ventricular em modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática (ROLIM et al., 2007). A capacidade máxima de realização do exercício físico foi avaliada na quarta e na décima segunda semana após a cirurgia, ao término do protocolo de TF, utilizando um teste de tolerância ao esforço (FERREIRA et al., 2007). Os animais foram submetidos a exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de seis metros por minuto sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de três metros por minuto até a exaustão do animal. As variáveis medidas compreenderam o tempo total e a distância em metros percorrida por cada animal durante o teste de esforço máximo. Essas análises foram realizadas em nosso laboratório.

4.5 TREINAMENTO FÍSICO

O TF em esteira rolante foi realizado durante oito semanas nos grupos SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, com sessões de exercício com duração de sessenta minutos, cinco vezes por semana a 60% da velocidade máxima atingida no teste de tolerância ao esforço. O treinamento teve início na quarta semana após a cirurgia de infarto do miocárdio (décima segunda semana de vida do animal). Vale destacar que esse protocolo de treinamento individualizado foi padronizado em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007), e corresponde à máxima fase estável do lactato sanguíneo de cada animal. Esse protocolo foi realizado em nosso laboratório.

4.6 MEDIDAS CARDIOVASCULARES

Com o intuito de avaliar as variáveis hemodinâmicas nesse modelo animal, foi realizada a medida indireta da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca através do método de pletismografia de cauda (Kent Scientific, EUA), conforme previamente padronizado em nosso laboratório (ROLIM et al., 2007).

Após um período de adaptação, foram realizados cinco registros consecutivos por meio de um esfigmomanômetro de cauda. Avaliado fotoeletricamente, o fluxo sanguíneo na cauda dos animais produz ondas oscilatórias que foram digitalmente registradas duzentas vezes por segundo por canal, e analisadas antes e durante uma rotina programável de inflagem e desinflagem do manguito. Os valores médios de pressão arterial sistólica caudal e frequência cardíaca de repouso foram obtidos após cada rotina do equipamento. Esses registros foram realizados em três diferentes dias da semana, sendo ulteriormente calculada a média dos valores obtidos. Essas análises foram realizadas em nosso laboratório.

4.7 SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS

Quarenta e oito horas após o último experimento, os animais foram sacrificados por decapitação, método rápido e livre de sofrimentos prolongados conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, <u>www.cobea.org.br</u>). Após o sacrifício, o coração e os pulmões foram cuidadosamente dissecados, pesados e congelados em freezer (-80°C) dependendo do experimento a que foram destinados. Para determinação da hipertrofia cardíaca, o peso total da víscera foi corrigido pelo peso corporal e comparado entre os grupos. Os pulmões foram submetidos à secagem em estufa (37°C) e pesados a cada 24 horas até a estabilização da massa pulmonar, permitindo o cálculo da razão massa úmida/massa seca como um índice de edema pulmonar.

Na tentativa de atender a todos os experimentos propostos neste projeto foi necessária uma divisão dos lotes experimentais, visto que para cada metodologia um processamento específico do tecido cardíaco se faz necessário. Nesse sentido, o número de animais utilizados e a técnica empregada em cada experimento se encontram detalhados ao longo do texto. Vale destacar que as análises bioquímicas foram realizadas no tecido cardíaco livre de infarto (área remota).

4.8 ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS DE RATOS ADULTOS

Logo após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados e os cardiomiócitos foram isolados conforme descrito previamente por Guatimosim et al. (2001) (GUATIMOSIM et al., 2001). O coração foi rapidamente removido e retro-perfundido pelo método de *Langendorff*, com solução *Tyrode* modificada livre de Ca²⁺ (NaCl 130 mM, KCl 5,4mM, Hepes 25mM, NaH2PO4 0,33mM, MgCl₂ 1mM, ácido lático 1mM, piruvato de sódio 3mM e glicose 22mM, pH 7.4), suplementada com 10U/L de insulina para lavagem e retirada do

sangue. Na sequência, o órgão foi perfundido com solução *Tyrode* contendo CaCl₂ 50 μ M e colagenase tipo 2 (1 mg/mL). Após a etapa de digestão química, o coração foi cortado em pedaços de 1mm, agitado por 4 minutos e filtrado através de uma malha de 200 mm para remoção do tecido não digerido. A concentração de CaCl₂ extracelular foi progressivamente aumentada para 500 μ M por meio de três ciclos de centrifugação. As células foram armazenadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco s modified eagle médium*) até o seu uso (dentro de 8 horas). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (22-24 °C). Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, no Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.9 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS DE RATOS ADULTOS

Logo após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados e a mitocôndria foi isolada conforme descrito previamente por Cancherini, Queliconi e Kowaltowski (2007) (CANCHERINI, QUELICONI, KOWALTOWSKI, 2007). O tecido foi colocado no tampão de lise (Sacarose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2, 4° C) e triturado na presença de 0,1mg/mL de protease do tipo I (*bovine pancreas*) para liberação das mitocôndrias das fibras musculares cardíacas. Após esse procedimento, a suspensão foi lavada no mesmo tampão, na presença de 0,1 mg/mL de BSA e homogeneizada em um moedor de tecido de 40 mL. O homogenato foi centrifugado a 1000g por 5 minutos (4°C). O sobrenadante resultante foi centrifugado a 9500g por 10 minutos (4°C). O precipitado resultante foi lavado, ressuspendido no tampão de lise e submetido a uma nova centrifugação (9500g por 10 minutos, 4°C). O precipitado final foi ressuspendido no tampão de lise. Esses procedimentos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.10 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA CARDÍACA

Doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio, período pós-protocolo experimental, realizamos as análises morfológicas cardíacas com o intuito de avaliar qual o remodelamento cardíaco observado no nosso modelo animal. Foram avaliados: o diâmetro do cardiomiócito, a fração de colágeno cardíaco na área ventricular esquerda livre de infarto e a área infartada. Após quarenta e oito horas de fixação em formalina tamponada (10%), o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual, com cortes de quatro micra e coloração por Hematoxilina-eosina, tricroma de Masson e Picrossírius *red*.

A medida do diâmetro transverso dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500, Inglaterra) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Os cardiomiócitos mensurados, orientados em corte longitudinal, compreenderam a área cardíaca não infartada (área remota). Para determinação do grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo, o diâmetro dos miócitos foi considerado a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal.

Outra parte do ventrículo esquerdo armazenado em formalina foi destinada à análise quantitativa de colágenos. O ventrículo esquerdo foi cortado, no sentido transversal, em cinco anéis equidistantes de 5 µm ao longo de seu maior eixo. Os anéis foram embebidos em parafina e corados com Picrossírius *red*. A seguir, o grau de fibrose do miocárdio foi avaliado pelo método de volumetria de pontos em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500, Inglaterra) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 200 vezes.

Por fim, a porcentagem da área de infarto foi avaliada, em corte medial do ventrículo esquerdo, pela razão entre o volume da área marcada com o corante tricroma de Masson e o volume total do coração. Todas as análises morfométricas foram realizadas em nosso laboratório.

4.11 AVALIAÇÃO DO TRANSIENTE DE CÁLCIO EM CARDIOMIÓCITO ISOLADO

A aquisição de imagens e a medida da concentração intracelular de Ca²⁺ no miócito cardíaco foram realizadas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), na configuração *line-scan*, com o intuito de obter informações sobre

a amplitude e a cinética do transiente de Ca^{2+} , conforme descrito por Guatimosim et al. (2001) (GUATIMOSIM et al., 2001). Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados com Fluo4-AM 5 μ M (Invitrogen, EUA), uma sonda fluorescente sensível ao Ca²⁺ (Λ_{ex} = 488nm e Λ_{em} =515nm), durante 30 minutos em temperatura ambiente (25-30°C). Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionamos solução Tyrode para a realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio confocal, e no momento do experimento estimuladas a 1 hertz, com um pulso quadrado de duração de 5 milissegundos e 30 volts. Para o registro do transiente de Ca²⁺, oito pulsos elétricos foram aplicados e foram realizadas varreduras ao longo de uma linha (512 x 3000 pixels), com laser de argônio (488 nm) e frequência de aquisição de 1,54 milissegundos. Os parâmetros avaliados foram: relação F/F0, máxima fluorescência / fluorescência basal, tempo para o pico da máxima fluorescência e tempo de recaptação de 50 (τ 50) e 90% (τ 90) do Ca²⁺. A Figura 4 representa a análise final para uma imagem de variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo. O ponto de início representa o instante de tempo em que é considerado o início da variação de fluorescência. O ponto de máxima fluorescência é o instante de tempo no qual é considerado o ponto de máxima intensidade de fluorescência (F). O ponto de fluorescência basal é considerado o *background* de fluorescência (F0), sendo a relação entre os dois (F/F0) o representante de variação global de Ca^{2+} . Os pontos em cinza representam de 10-90% da recaptação de Ca²⁺. Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, no Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.



Figura 4 – Esquema ilustrativo dos principais parâmetros avaliados no transiente de cálcio (Adaptado de Campos, DR, 2011).

4.12 CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E DINÂMICA MITOCONDRIAL CARDÍACA

4.12.1 Função mitocondrial cardíaca

Com o intuito de caracterizar a função mitocondrial na disfunção cardíaca, assim como o efeito do TF nessa variável, realizamos uma avaliação bioenergética/funcional mais pontual e informativa na mitocôndria. Para isso analisamos o consumo de O_2 , o potencial da membrana interna, a permeabilidade dos poros mitocondriais e a produção de H_2O_2 na mitocôndria isolada cardíaca, bem como a quantidade de ATP no lisado cardíaco. É importante ressaltar que a maior parte dos resultados encontrados está expressa na forma de porcentagem do grupo controle (SHAM) para evitar uma dispersão aumentada dos dados, pois as detecções fluorimétricas foram realizadas em lotes de animais em diferentes períodos. Esses procedimentos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Além disso, avaliamos o transiente de Ca²⁺, a qualidade da estrutura mitocondrial e a produção mitocondrial de EROs em cardiomiócitos isolados dos ratos adultos dos diferentes grupos experimentais, em colaboração com a Prof. Dra. Silvia

Carolina Guatimosim Fonseca, no Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Posteriormente a essas análises, avaliamos a homeostase redox no lisado cardíaco por meio da quantificação da peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e formação de adutos de 4-HNE, atividade das enzimas antioxidante catalase e SOD, e níveis de glutationa cardíacos.

Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada

A medida do consumo de O₂ mitocondrial foi realizada utilizando-se um eletrodo específico de O₂ (do tipo Clark) acoplado a um registrador (Oxygraph System, Hansatech), previamente descrito por Da Silva et al. (2003) (DA SILVA et al., 2003). O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de O2 na superfície do cátodo. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes, 10mM, KH2PO4 2 mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125mg/mL. Os registros de consumo de O₂ foram feitos na presença dos substratos succinato (2mM) e malatoglutamato (2mM). O máximo consumo de O2 no Estado 3 da respiração foi mensurado na presença de ADP (1mM). Para a avaliação do máximo consumo de O₂ no Estado 4 da respiração mitocondrial, um inibidor do complexo V (Oligomicina 1µg/mL) foi adicionado ao ensaio. Vale destacar que a medida do controle respiratório é quantificada pela razão dos Estados 3 e 4 da respiração mitocondrial. Além disso, utilizamos um desacoplador da membrana interna mitocondrial (CCCP - Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone, 1µM) para estimular o consumo máximo de O₂. Os valores relativos foram expressos na forma de porcentagem do grupo controle (SHAM). Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Potencial da membrana interna da mitocôndria cardíaca isolada

O potencial da membrana interna da mitocôndria foi avaliado por espectrofluorimetria (TAHARA, NAVARETE, KOWALTOWSKI, 2009). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes, 10mM, KH2PO4 2 mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125mg/mL. Após a adição de safranina O (5µM), succinato (2mM) e malato-glutamato (2mM), o

potencial da membrana interna foi estimado por mudanças na fluorescência (Λ_{ex} = 485nm e Λ_{em} = 586nm). Utilizamos um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (CCCP 1µM) para inibir seu potencial da membrana. O ensaio baseia-se no acúmulo de safranina O, um cátion lipofílico, no interior ou na proximidade da membrana mitocondrial interna, reduzindo a fluorescência da suspensão de forma proporcional ao balanço eletroquímico mitocondrial. Os dados obtidos foram corrigidos por um gradiente de potássio na presença de valigomicina (4,5mM), um ionóforo altamente seletivo ao potássio que facilita sua entrada na matriz desfazendo o potencial de membrana e liberando a safranina na suspensão. Os valores, expressos em milivolts foram determinados por meio da equação de Nernst. Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Análise qualitativa da estrutura mitocondrial do cardiomiócito isolado

A visualização da mitocôndria no cardiomiócito isolado foi obtida através de imagens realizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados com uma sonda fluorescente sensível ao potencial de membrana mitocondrial [*Mitotracker Green* 200nM (Molecular Probes, EUA)] durante 30 minutos à 37°C. Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionamos solução *Tyrode* (NaCl 130 mM, KCl 5,4mM, Hepes 25mM, NaH2PO4 0,33mM, MgCl₂ 1mM, ácido lático 1mM, piruvato de sódio 3mM e glicose 22mM, pH 7.4) para a realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio confocal, a marcação das mitocôndrias foi identificada pelos comprimentos de onda de 490nm para excitação e 516nm para emissão. Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, no Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Permeabilidade dos poros da mitocôndria cardíaca isolada

A abertura dos poros mitocondriais foi determinada pela máxima captação de Ca²⁺ medida por espectrofluorimetria (FORNAZARI et al., 2008). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes, 10mM, KH2PO4 2 mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125mg/mL. Após a adição de *Calcium Green* (0,1 μ M), succinato (2mM), malato-glutamato (2mM) e subsequentes adições de 50 μ M de CaCl₂, a abertura dos poros foi determinada por

mudanças na fluorescência (Λ_{ex} = 506nm e Λ_{em} = 532nm), e os valores foram expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína. Para confirmar se o inchamento é derivado da abertura dos PTPM, realizamos o mesmo ensaio na presença de um inibidor da abertura dos PTPM, a ciclosporina A (15nM). Os valores encontrados estão expressos na forma de porcentagem do grupo controle (SHAM). Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria cardíaca isolada

A produção de H_2O_2 mitocondrial foi avaliada por espectrofluorimetria (TAHARA, NAVARETE, KOWALTOWSKI, 2009). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes, 10mM, KH2PO4 2 mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125mg/mL. A produção de H_2O_2 foi determinada pela geração de resorufina, fruto da oxidação do *Amplex Red* (25µM) na presença de *horseradish peroxidase* (0,5 U/mL), identificada pelos comprimentos de onda de 563nm para excitação e 587nm para emissão. O ensaio foi realizado na presença de succinato (2mM), malato-glutamato (2mM), ADP (1mM) e Oligomicina (1µg/mL). Também foi realizada a quantificação da produção de H_2O_2 na presença de inibidores do complexo I (rotenona, 2µM), complexo III (antimicina A, 0,15µg/mL) e CCCP (1µM). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com quantidades conhecidas de H_2O_2 , e expressos na forma de porcentagem do grupo controle (SHAM). Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Produção mitocondrial de ânion superóxido no cardiomiócito isolado

A quantificação do O_2^- mitocondrial no cardiomiócito isolado foi obtida através de imagens realizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), adaptado de Batandier et al. (2006) (BATANDIER et al., 2002). Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados, durante 30 minutos à 37°C, com *MitoSOX Red* 3µM (Molecular Probes, EUA), uma sonda fluorescente que é oxidada na presença do O_2^- , emitindo a coloração vermelha. Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionamos solução *Tyrode* para a realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio confocal e a produção mitocondrial de O_2^- foi

estimada por mudanças na fluorescência (Λ_{ex} = 510nm e Λ_{em} = 580nm). Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, no Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Avaliação da peroxidação lipídica no lisado cardíaco

A peroxidação lipídica é um importante marcador de estresse oxidativo intracelular (NIKI, 2008). Tal fenômeno refere-se ao dano oxidativo sofrido por ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os presentes na membrana, podendo levar à morte celular (GROC et al., 2001). O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo ensaio de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o protocolo descrito por Oxi-Tek TBARS Assay Kit (Zeptometrix, EUA). De forma resumida, 100 µl de solução dodecil sulfato de sódio foram adicionadas à 100 µl do lisado cardíaco. Na sequência, 2,5mL do tampão reagente de ácido tiobarbitúrico (0,5 g de ácido tiobarbitúrico, 50 mL de ácido acético e 50 mL de hidróxido de sódio) foram adicionados à mistura, então incubada à 95°C por 60 minutos. Após este período as amostras foram resfriadas em gelo durante 10 minutos, e centrifugadas à 3000 rotações por minuto, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e a intensidade da fluorescência determinada pelos comprimentos de onda de 530nm para excitação e 550nm para emissão. Esse ensaio baseia-se na mensuração do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, que quando aquecido na presença de ácido tiobarbitúrico forma um composto de cor rosa que pode ser medido por fluorimetria (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990). A concentração de TBARS foi expressa em nmol/mg de proteína, por interpolação da curva de MDA, nas concentrações de 0 a 200 nM.

Análise dos níveis de proteínas carboniladas e adutos de 4-HNE no lisado cardíaco

Para análise dos níveis de proteínas carboniladas e adutos de 4-HNE foi utilizada como base a técnica de *Western Blotting*. As amostras de tecido cardíaco coletadas foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (Manitol 210mM, sacarose 70mM, MOPS 5mM, EDTA 1mM, 0.1%Triton X100, pH 7.4), e os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto em temperatura de 4°C.

O nível de proteínas carboniladas foi avaliado conforme descrito por Antony et al. (2004). Nesse método, 20 μ g do lisado cardíaco foram incubados com DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) por 15 minutos, promovendo a reação de DNPH com grupos carbonil das cadeias laterais das proteínas, resultando em 2,4-dinitrofenilhidrazona (ANTONY et al.,

2004). Após essa etapa, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean, Bio-Rad, Alemanha), e em seguida foi realizada uma transferência elétrica (1 hora/100 volts) das proteínas separadas no gel para uma membrana de fluoreto de polivilideno utilizando-se o equipamento Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Alemanha) (TOWBIN, OZBEY et al., 2001). As membranas foram coradas com Ponceau S para a verificação da integridade das proteínas e eficiência da transferência. A ligação inespecífica de proteínas na membrana foi diminuída pela incubação destas com 10 mL de solução bloqueadora (5% de leite ou albumina em TBS-T) por 2 horas em temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com um anticorpo primário específico para 2,4-dinitrofenilhidrazona por 1 hora em temperatura ambiente. Na sequência as mesmas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com solução TBS-T (solução tampão Tris acrescida de tween-20) e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora. A imunodetecção das bandas foi promovida pela reação quimioluminescente após uso do sistema ECL Western blotting Detection Reagents (Amersham, EUA) e posteriormente quantificadas pelo sistema ImageJ, fornecido gratuitamente pelo NIH (EUA) via Internet. A proteína GAPDH (gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizada como normalizadora.

Para avaliação da formação dos adutos de 4-HNE no lisado cardíaco, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) e submetidas aos processos de eletroforese e transferência descritos acima. Os adutos de 4-HNE foram identificados pelo anticorpo primário anti-4-HNE (Calbiochem, EUA), diluídos em solução bloqueadora a 4°C *overnight*, e posteriormente reconhecidos após 2 horas de incubação com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase.

Atividade da catalase no lisado cardíaco

A atividade da catalase foi mensurada no lisado cardíaco através da produção de O_2 utilizando-se um eletrodo específico de O_2 (do tipo Clark) acoplado a um registrador (*Oxygraph System, Hansatech*) (AEBI, 1984). 500mM de H₂O₂ foram diluídos em 2 mL de tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes, 10mM, KH2PO4 2 mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, pH 7.2), na presença de succinato (2mM) e malato-glutamato (2mM). Após 2 minutos de estabilização, 20 µg do lisado cardíaco foram adicionados à mistura parda determinação da atividade da catalase. Esse ensaio baseia-se na reação de dismutação catalisada pela enzima, que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e O₂, conforme equação abaixo:

$2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$

Os valores estão expressos em unidades por miligrama de proteína, no qual uma unidade corresponde a 1 μ mol de O₂ produzido por minuto. Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Atividade da superóxido dismutase (SOD) no lisado cardíaco

A atividade da enzima foi avaliada por um método que consiste na inibição da redução de citocromo C por radicais superóxidos gerados pelo sistema xantina-xantina oxidase, proporcionada pela SOD presente na amostra testada, que competirá com citocromo C pelos radicais gerados (McCORD, FRIDOVICH, 1969). Os corações foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS 50mM, pH 7,4 + EDTA 1mM) e centrifugados à 12000g durante 15 minutos (4°C). Inicialmente, a taxa de redução de citocromo C foi avaliada na ausência de amostra, pela leitura da taxa de alteração de absorbância à 550nm durante 5 minutos, em solução contendo citocromo C (19mM), xantina (1,18mM) e xantina oxidase diluídos em tampão fosfato (50mM, pH 7,8). A concentração de xantina oxidase foi ajustada para uma velocidade de redução de citocromo C de 0,025 unidades de absorbância por minuto. Na sequência a taxa de redução de citocromo C foi acompanhada durante 5 minutos na presença da amostra diluída na solução supracitada. A atividade de SOD foi então calculada pela diferença entre a taxa de oxidação de citocromo C na ausência e na presença de amostra diluída mostra solução de citocromo C na ausência e na presença de amostra e os valores estão expressos em unidades de SOD por minuto por miligrama de proteína. Esse experimento foi realizado em nosso laboratório.

Os níveis de glutationa oxidada e reduzida no lisado cardíaco

Além da atividade das enzimas antioxidantes, optamos por avaliar também os níveis de glutationa no lisado cardíaco, fruto da ação da enzima glutationa peroxidase. Esse importante composto orgânico pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), e sua relevância é tamanha que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (TOUSSAINT, HOUBION, REMACLE, 1993). O ensaio fluorimétrico foi feito de acordo com o protocolo descrito em *DetectX* – *Glutathione fluorescent detection kit* (Arbor Assays, EUA) cujo princípio baseia-se na redução da glutationa na presença de NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e

glutationa redutase. Com esse método foi possível calcular a glutationa total, a glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), bem como a razão GSH/GSSG. Os corações foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS 100mM, pH 7,0) e centrifugados à 14000 rotações por minuto durante 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi incubado com 5% de ácido sulfossalicílico por 10 minutos (4°C) e submetido a mais uma centrifugação, sendo misturado ao tampão de ensaio na proporção 1:2,5 ao final do processo. Na sequência, 50 µL da amostra tratada foram incubados com *ThisStar Reagent* (25 µL) em temperatura ambiente por 15 minutos para obtenção da GSH após mudanças na fluorescência (Λ_{ex} = 370-410nm e Λ_{em} = 510 nm). Para determinação da glutationa total, as amostras contidas na placa foram incubadas com uma mistura de NADPH e glutationa redutase (25 µL) por mais 15 minutos em temperatura ambiente, e os valores foram determinados após a mesma leitura de fluorescência. Vale destacar que os valores estão expressos em nmol por miligrama de proteínas e o nível de GSSG foi determinado conforme fórmula abaixo. Esse experimento foi realizado em nosso laboratório.

$$\frac{\text{GSSG: (glutationa total - GSH)}}{2}$$

Quantificação do ATP cardíaco

Após a retirada dos corações, 50mg de tecido foram imediatamente homogeneizados em 1mL de ácido tricloroacético (1%) para que ocorra a precipitação das proteínas e preservação do ATP, conforme descrito previamente por Stanley (1986) (STANLEY, 1986). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi congelado em freezer -80°C. Previamente às análises, o pH deverá ser ajustado para 7.0. As concentrações de ATP foram determinadas pela emissão de luz no comprimento de onda de 560nm, de acordo com o protocolo descrito por *ATP Determination Kit* (Invitrogen, EUA), e os valores foram expressos em picomoles por miligrama de proteína. O ensaio baseia-se na clivagem da luciferina (substrato) pela luciferase (enzima recombinante), na presença de ATP e O_2 , emitindo luz, conforme equação abaixo. Esse experimento foi realizado em nosso laboratório.

 $ATP + luciferina + O_2 \longrightarrow oxiluciferina + AMP + pirofosfato + CO_2 + luz$

Na tentativa de avaliar se possíveis alterações na função mitocondrial cardíaca estão associadas a mudanças na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca, avaliamos a expressão proteica da Mfn1, Mfn2, OPA1, Drp1 e Fis1 na mitocôndria cardíaca isolada, a atividade GTPase específica das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1 na fração mitocondrial, a densidade e a morfologia mitocondrial cardíaca (número e área). Esses procedimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Daria Mochly-Rosen, no Departamento de Química e Biologia de Sistemas da Universidade de Stanford (CA-EUA).

Expressão proteica das GTPases envolvidas na dinâmica mitocondrial

A análise da expressão proteica das GTPases envolvidas na dinâmica mitocondrial no tecido cardíaco foi realizada por meio da técnica de *Western blotting*. Para isso, a fração mitocondrial cardíaca dos animais estudados foi submetida aos processos de eletroforese e transferência, e as proteínas relacionadas à fusão – Mfn1, Mfn2, OPA1 e fissão mitocondrial – Drp1 e Fis1, foram identificadas após incubação com os anticorpos primários anti-Mfn1 e Mfn2 (Abnova, EUA), OPA1 e Drp1 (BD Bioscience, EUA), e Fis1 (Alexis Biochemicals, Reino Unido) diluídos em solução bloqueadora a 4°C *overnight*. A proteína VDAC (*voltage-dependent anion channel*) foi utilizada como normalizadora. A metodologia completa da técnica de *Western Blotting* está descrita detalhadamente na seção *Análise dos níveis de proteínas carboniladas e adutos de 4-HNE no lisado cardíaco*.

Imunoprecipitação e avaliação da atividade GTPase específica das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial

Além da avaliação da expressão proteica das GTPases envolvidas na dinâmica mitocondrial, decidimos analisar a atividade específica das GTPases Mfn1, Mfn2 e Drp1 na mitocôndria cardíaca isolada. Para isso, 250 µg da fração mitocondrial foram incubadas com anticorpos específicos para cada proteína, conforme citados anteriormente, em 1mL de tampão RIPA (NaCl 150mM, EDTA 5mM, Tris-HCl 10mM, 0.1%Triton X100, pH 7.4) durante três horas (4°C). Em seguida, a mistura foi incubada com 40 µL de *beads* de proteína agarose-G por uma hora (4°C) e ao final os imunocomplexos foram lavados três vezes com tampão RIPA, com centrifugações de 5000 rotações por minuto durante 3 minutos entre as lavagens.

A atividade específica de cada GTPase foi avaliada por espectrofotometria conforme protocolo descrito por *GTPase Assay Kit* (Innova Biosciences, Reino Unido). O ensaio da atividade da GTPase baseia-se na liberação de fosfato inorgânico (Pi), na presença do substrato GTP, sendo o Pi reconhecido por um corante que emite cor esverdeada que pode ser reconhecido à 590-660 nm.100 μ L do imunoprecipitado foram incubados com 100 μ L do tampão substrato (Tris 0,5M, MgCl₂ 0,1M, GTP 10mM, ph 7.4), somados à 50 μ L de Pi. Com o intuito de evitar a hidrólise não enzimática do GTP, um estabilizador (20 μ L) é adicionado à mistura após 2 minutos. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente a leitura foi realizada. A quantificação da atividade GTPásica foi feita após uma calibração com concentrações conhecidas de Pi e os valores, expressão em unidades/mL, foram corrigidos pela expressão proteica das respectivas GTPases.

Morfologia mitocondrial cardíaca

A morfologia mitocondrial no coração foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica, com o intuito de verificar possíveis mudanças na estrutura da organela. A preparação das telas foi feita conforme descrito por Karnovsky (1964) (KARNOVSKY, 1964), e as imagens foram registradas em computador acoplado ao microscópio eletrônico, conectado a um sistema fotográfico. Posteriormente, o número e a área mitocondrial foram quantificados pelo sistema ImageJ, fornecido gratuitamente pelo NIH (EUA) via Internet. Para o cálculo do número de mitocôndrias foram analisados 10 campos visuais por animal (n=3 por grupo) e a média está apresentada na forma de número de mitocôndrias por 100 μ m². A área mitocondrial está expressa em μ m² e foi quantificada a partir da análise de 300 mitocôndrias por grupo.

Densidade mitocondrial

Avaliamos a densidade mitocondrial por meio da expressão proteica das proteínas VDAC (i.e. *voltage-dependent anion channel*) e IDH2 (isocitrato desidrogenase 2) no lisado cardíaco, pela técnica de *Western Blotting*. Vale destacar que a VDAC está presente na membrana externa mitocondrial e a IDH2 é uma proteína de matriz mitocondrial, e que a razão VDAC/IDH2 indica a densidade mitocondrial. A metodologia completa da técnica de *Western Blotting* está descrita detalhadamente na seção *Análise dos níveis de proteínas carboniladas e adutos de 4-HNE no lisado cardíaco*.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente a distribuição dos dados obtidos nesse estudo foi testada por meio do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Os dados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão e comparados pela análise de variância (ANOVA) de dois caminhos (fenótipo e TF como fatores independentes) ou de três caminhos (fenótipo, TF e período experimental como fatores independentes, considerando o tempo como uma medida repetida). Essa análise foi executada no programa *Statistica* (StatSoft, Inc., EUA) *e* para todas as análises foi utilizado post-hoc de *Duncan* e nível de significância p≤0,05.

5. RESULTADOS

Para o melhor entendimento dos resultados, essa sessão será apresentada em três diferentes subseções: 5.1 Caracterização fenotípica do modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio; 5.2 Efeito do treinamento físico aeróbico na função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio e 5.3 Efeito do treinamento físico aeróbico na dinâmica mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio e 5.3 Efeito do treinamento físico aeróbico na dinâmica mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associado ao infarto do miocárdio.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADO AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

Uma vez que optamos pelo modelo de disfunção cardíaca de etiologia isquêmica, decidimos realizar, *a priori*, uma caracterização da evolução da disfunção ventricular após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior nesse modelo. Para isso, analisamos parâmetros funcionais e morfológicos, quatro e doze semanas após a cirurgia de ligadura da coronária com o intuito de confirmar o quadro de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.

Para confirmar a disfunção cardíaca e o efeito do TF na função cardíaca, foi avaliada a função ventricular dos animais quatro e doze semanas após a cirurgia fictícia ou de infarto do miocárdio (oito semanas após o período de TF ou sedentarismo) pelo exame ecocardiográfico, em colaboração com o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Vale destacar que essas análises correspondem às etapas pré e pós-TF ou sedentarismo nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. Como demonstrado na Tabela 2, no período pré-TF os animais submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio (DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) apresentaram uma significante redução da FE quando comparados aos animais dos grupos SHAM e SHAM-TF. O TF foi capaz de promover uma significante melhora na função cardíaca do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF quando

comparado ao período pré-TF e ao grupo que permaneceu sedentário (DISFUNÇÃO CARDÍACA).

Ainda na Tabela 2 podemos observar os dados referentes ao diâmetro e espessura do ventrículo esquerdo. Os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio desenvolveram um aumento nos diâmetros diastólico (DDFVE) e sistólico (DSFVE) final do ventrículo esquerdo, pré-TF, em relação àqueles que foram submetidos apenas à cirurgia fictícia. Esses dados corroboram a redução da FE, que possivelmente pode estar relacionada ao aumento no volume residual cardíaco em sístole, confirmando assim a disfunção ventricular. Além disso, foi observada uma redução na espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) nos grupos DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, quando comparados aos animais controle, sem nenhuma alteração na espessura do mesmo em diástole (SIVDi). Também observamos nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio, uma redução significante na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis). O grupo SHAM-TF apresentou redução na parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole (PPDi) quando comparado aos demais grupos para o mesmo período.

O TF foi eficaz em restaurar os diâmetros diastólico (DDFVE) e sistólico (DSFVE) final do ventrículo esquerdo do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para valores próximos aos do grupo controle. Além disso, aumentou a espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) desse mesmo grupo quando comparado ao período pré-TF. No entanto, vale destacar que no período pós-TF não foi observada nenhuma diferença entre os grupos nessa variável. Ambos os grupos infartados (DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) tiveram um aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis) após o período experimental de oito semanas, abolindo a diferença observada anteriormente. Contudo, o grupo SHAM-TF apresentou um aumento significante na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo comparado aos grupos SHAM, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. A melhora na morfologia cardíaca dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio e realizaram o TF corrobora a melhora na FE.

PRÉ-TREINAMENTO FÍSICO				PÓS-TREINAMENTO FÍSICO				
Parâmetros	SHAM (8)	SHAM-TF (8)	DISFUNÇÃO CARDÍACA (14)	DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF (12)	SHAM (8)	SHAM-TF (7)	DISFUNÇÃO CARDÍACA (13)	DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF (12)
FE (%)	40 ± 2	40 ± 2	25 ± 2* ^{&}	24 ± 1* ^{&}	40 ± 1	39 ± 2	24 ± 2**	34 ± 2 ^{\$} * ^{&#</sup></th></tr><tr><th>DDFVE (mm)</th><th>7,41 ± 0,33</th><th><math>7,50 \pm 0,34</math></th><th>8,83 ± 0,36*&</th><th>8,74 ± 0,36*&</th><th><math>8,05 \pm 0,42</math></th><th>8,01 ± 0,22</th><th>8,71 ± 0,43*&</th><th>8,26 ± 0,39</th></tr><tr><th>DSFVE (mm)</th><th>4,46 ± 0,19</th><th><math>4,55 \pm 0,39</math></th><th>6,73 ± 0,42*&</th><th>6,60 ± 0,39*&</th><th><math>4,94 \pm 0,35</math></th><th>5,16 ± 0,39</th><th>6,70 ± 0,59*&</th><th><math>5,55 \pm 0,42</math></th></tr><tr><th>SIVDi (mm)</th><th><math>0,90 \pm 0,09</math></th><th><math>0,85 \pm 0,09</math></th><th><math>0,91 \pm 0,04</math></th><th><math>0,97 \pm 0,05</math></th><th><math>1,15 \pm 0,09</math></th><th><math>1,14 \pm 0,08</math></th><th><math>1,03 \pm 0,05</math></th><th><math>1,05 \pm 0,06</math></th></tr><tr><th>SIVSis (mm)</th><th>1,90 ± 0,19</th><th><math>1,85 \pm 0,12</math></th><th>1,45 ± 0,10*<sup>&</sup></th><th>1,38 ± 0,12*<sup>&</sup></th><th><math>1,89 \pm 0,11</math></th><th><math>2,05 \pm 0,20</math></th><th><math>1,70 \pm 0,10</math></th><th><math>1,86 \pm 0,14^{\\$}</math></th></tr><tr><th>PPDi (mm)</th><th><math>1,29 \pm 0,05</math></th><th>0,95 ± 0,07*</th><th>1,23 ± 0,07<sup>&</sup></th><th>1,33 ± 0,05<sup>&</sup></th><th><math>1,38 \pm 0,12</math></th><th><math>1,71 \pm 0,08^{\\$}</math>*</th><th>1,33 ± 0,05<sup>&</sup></th><th>1,30 ± 0,08<sup>&</sup></th></tr><tr><th>PPSis (mm)</th><th><math>2,31 \pm 0,05</math></th><th><math>2,31 \pm 0,09</math></th><th>2,06 ± 0,08*&</th><th>1,90 ± 0,14*&</th><th><math>2,40 \pm 0,14</math></th><th><math>2,63 \pm 0,17</math></th><th>2,48 ± 0,16<sup>\$</sup></th><th><math>2,40 \pm 0,11^{\\$}</math></th></tr></tbody></table>}

Tabela 2 - Medidas ecocardiográficas na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico

FE – fração de encurtamento; DDFVE – diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE – diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; SIVDi – espessura do septo interventricular na diástole; SIVSis – espessura do septo interventricular na sístole; PPDi – espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole e PPSis - espessura da parede posterior do ventrículo em sístole dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, pré- e pós-treinamento físico.\$ diferença significante vs. o mesmo grupo no período Pré-treinamento físico (p< 0,05); * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05); & diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05); # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de três caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

A disfunção cardíaca está relacionada à intolerância ao esforço físico, que é definida como redução da capacidade de realização de exercício físico. E algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Nesse sentido, avaliamos a capacidade máxima de realização do exercício físico nos diferentes grupos experimentais na quarta e décima segunda semana após a cirurgia fictícia ou de infarto do miocárdio (Figura 3). Como podemos observar na Tabela 3, os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio não apresentaram intolerância aos esforços físicos quando comparados ao grupo controle (SHAM), tanto pré-, quanto pós-período experimental. Esses dados estão representados pela similaridade na distância total percorrida no teste máximo até a exaustão. Por outro lado e como esperado, os grupos submetidos ao protocolo de TF (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) aumentaram a tolerância aos esforços físicos, comprovando a eficácia do TF.

Posteriormente, e com o intuito de avaliar as variáveis hemodinâmicas nesse modelo animal, realizamos as medidas da pressão arterial e frequência cardíaca através do método indireto de pletismografia de cauda (Kent Scientific, EUA), conforme descrito no item 4.6. Como demonstrado na Tabela 3, ambas as variáveis, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica, permaneceram similares entre os diferentes grupos no período pré-TF, quatro semanas após a cirurgia fictícia ou de infarto do miocárdio. Ao final do protocolo experimental os grupos submetidos ao TF (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) apresentaram bradicardia de repouso quando comparados ao período pré-TF e quando comparados aos grupos que permaneceram sedentários (SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA). Por outro lado, os valores de pressão arterial sistólica permaneceram similares entre os grupos ao final do protocolo experimental, doze semanas após a cirurgia fictícia ou de infarto do miocárdio. É importante ressaltar que a ausência de modificações na pressão arterial está de acordo com a literatura, que demonstra que ratos com infartos menores que 30% (Tabela 3) não apresentam anormalidades hemodinâmicas (PFEFFER et al., 1979).

Atualmente sabe-se que uma característica marcante do mau prognóstico da IC é a hipertrofia cardíaca. O remodelamento cardíaco em doenças cardiovasculares é caracterizado pelo aumento da massa cardíaca e dá-se em resposta ao aumento do estresse hemodinâmico e neuro-hormonal, culminando em um rearranjo nas vias de sinalização celular (CHATTERJEE, 2005). Doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio, período pós-TF, realizamos as análises morfológicas cardíacas com o intuito de avaliar qual o remodelamento cardíaco

observado no nosso modelo animal. Foram avaliadas: a massa ventricular esquerda corrigida pelo peso corporal, diâmetro do cardiomiócito, fração de colágeno cardíaco na área ventricular esquerda livre de infarto e a área infartada.

Na Tabela 3 podemos observar que o grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentou um aumento na razão massa ventricular esquerda pela massa corporal, quando comparado ao grupo controle. É importante lembrar que os animais estudados não apresentaram diferenças quanto ao peso corporal. No entanto, essa variável não diferiu dos demais grupos experimentais (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF). Esse aumento na massa do ventrículo esquerdo nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio e permaneceram sedentários pode ser explicado como resultado do crescimento da área remanescente cardíaca como mecanismo compensatório pela redução de tecido contrátil. E para confirmar essa hipótese quantificamos o diâmetro dos cardiomiócitos, e o que observamos foi um aumento nessa variável no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA, quando comparados aos grupos SHAM e SHAM-TF. O TF foi eficaz em normalizar essa hipertrofia cardíaca nos animais infartados submetidos às oito semanas de protocolo (Tabela 3). Cabe ressaltar que essas análises complementam os dados obtidos no ecocardiograma (Tabela 2).

Realizamos também a quantificação do volume de colágeno cardíaco, e os animais com DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentaram um aumento significante na deposição de colágeno no coração em relação ao grupo SHAM (Tabela 3). Esse quadro reflete a progressão da disfunção ventricular, uma vez que o processo do remodelamento cardíaco patológico envolve mudanças adaptativas e não adaptativas na morfologia do cardiomiócito, fibrose cardíaca e inflamação (CHATTERJEE, 2005). Por outro lado, o TF foi eficaz em reduzir o volume de colágeno cardíaco em ambos os grupos treinados (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) quando comparados aos grupos sedentários.

Além disso, podemos notar na Tabela 3, a porcentagem da área de infarto dos grupos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA, avaliada pela razão entre o volume da área marcada com o corante tricroma de Masson e o volume total do coração. Os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio, sedentários e treinados, apresentaram similaridade na porcentagem da área de infarto. A Figura 5 apresenta imagens de cortes transversais dos corações dos grupos estudados, na altura dos músculos papilares. Essas imagens ilustram o efeito da cirurgia de infarto do miocárdio sobre a estrutura cardíaca dos animais com disfunção cardíaca.



SHAM-TF

- DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF
- Figura 5 Imagem representativa de corte transversal do coração de ratos. SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. O corte foi realizado na altura dos músculos papilares.

PRÉ-TREINAMENTO FÍSICO				PÓS-TREINAMENTO FÍSICO				
Parâmetros	SHAM	SHAM-TF	DISFUNÇÃO CARDÍACA	DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF	SHAM	SHAM-TF	DISFUNÇÃO CARDÍACA	DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF
Distância máxima percorrida (metros)	469 ± 32 (8)	516 ± 30 (8)	457 ± 49 (14)	469 ± 31 (12)	445 ± 24 (8)	909 ± 56 ^{\$} * (7)	$437 \pm 28^{\&}$ (13)	855 ± 70 ^{\$} *# (12)
Pressão arterial sistólica caudal (mmHg)	113 ± 3 (8)	113 ± 3 (8)	116 ± 4 (14)	122 ± 3 (12)	114 ± 2 (8)	112 ± 4 (7)	117 ± 3 (13)	112 ± 5 (12)
Frequência cardíaca (bpm)	481 ± 16 (8)	467 ±12 (8)	480 ± 19 (14)	464 ± 13 (12)	480 ± 14 (8)	$407 \pm 16^{\$}$ (7)	479 ± 17 ^{&} (13)	393 ± 16 ^{\$} *# (12)
Massa corporal (g)	412 ± 11 (8)	395 ± 11 (8)	393 ± 07 (14)	395 ± 09 (12)	452 ± 16 ^{\$} (8)	409 ± 24 * (7)	424 ± 14 (13)	431 ± 08 (12)
Massa pulmão (peso úmido/peso seco)					5,26 ± 0,39 (8)	5,46 ± 0,34 (7)	5,17 ± 0,22 (7)	$5,59 \pm 0,42$ (6)
Massa ventrículo esquerdo (mg/g)					$2,83 \pm 0,08$ (8)	2,99 ± 0,06 (7)	3,10 ± 0,07* (7)	$3,05 \pm 0,07$ (6)
Diâmetro do cardiomiócito (µm)					$14,33 \pm 0,17$ (7)	$14,03 \pm 0,16$ (5)	14,90 ±0,17 * ^{&} (7)	$14,42 \pm 0,22$ (7)
Fração de colágeno cardíaco (%)					$0,05 \pm 0,003$ (7)	$0,03 \pm 0,002$ * (5)	0,07±0,004 * & (7)	0,06±0,003 ^{&} # (7)
Área de infarto (%)							28,07 ± 4,45 (7)	28,78 ± 3,19 (7)

 Tabela 3 – Tolerância ao esforço, morfologia cardíaca, medidas cardiovasculares e antropométricas na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico

\$ diferença significante vs. Pré-treinamento físico (p< 0,05); * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05); & diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05), # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de três caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Portanto, os resultados obtidos nesse estudo referentes à caracterização fenotípica do modelo animal nos permitem afirmar que doze semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio nosso modelo animal desenvolveu importantes alterações estruturais cardíacas, tais como: redução da função cardíaca, dilatação das câmaras e hipertrofia cardíaca, o que culminou na disfunção ventricular. Por outro lado, os animais não apresentaram alteração nas variáveis hemodinâmicas (pressão arterial sistólica e frequência cardíaca), tampouco manifestação de sinais clínicos da IC, como a intolerância à realização de esforço físico e edema pulmonar. O TF foi eficaz em promover o remodelamento cardíaco reverso, minimizando a disfunção ventricular no nosso modelo animal. Além disso, promoveu bradicardia de repouso e dobrou a tolerância aos esforços físicos nos grupos que foram submetidos a oito semanas de exercício físico. Acreditamos que os achados desse trabalho podem contribuir para o melhor entendimento da progressão da disfunção ventricular e o estabelecimento da IC.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADO AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

A partir da caracterização fenotípica do modelo animal, nosso próximo objetivo foi avaliar a função mitocondrial cardíaca. Para isso, optamos por fazer as análises na mitocôndria cardíaca isolada a fim de melhor quantificar os parâmetros funcionais da organela. A maior parte dos resultados encontrados está expressa na forma de porcentagem do grupo controle (SHAM), pois as detecções fluorimétricas foram realizadas em diferentes lotes experimentais e a variação do sinal fluorimétrico entre os diferentes lotes aumentaria a dispersão dos dados. Vale destacar que todos os ensaios foram feitos na presença de succinato, malato e glutamato, substratos que conhecidamente participam das funções respiratórias fisiológicas no tecido cardíaco. Além disso, com o intuito de complementar os estudos sobre a função mitocondrial, realizamos ensaios no cardiomiócito isolado e no lisado cardíaco dos animais estudados.

Inicialmente avaliamos o consumo de O_2 mitocondrial por meio da respiração máxima no Estado 3 (sob a estimulação de ADP) e Estado 4 (sob a estimulação de oligomicina), e do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3 pelo Estado 4. A Figura 6A mostra que o controle respiratório está reduzido no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA quando comparado aos animais SHAM. Esses dados sugerem que a disfunção ventricular apresentada pelos animais que foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio é acompanhada pela redução na função mitocondrial. Além disso, o TF foi eficaz em aumentar o controle respiratório nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio (DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF), corroborando os dados da literatura que mostram a eficácia de um protocolo de exercícios físicos nessa importante variável da função mitocondrial (KAVAZIS et al., 2009).

Também observamos um aumento no consumo máximo de O_2 mitocondrial em cada estado respiratório (Figuras 6B e 6C) nos grupos que realizaram TF (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) quando comparados aos animais sedentários. Esses dados indicam um aumento na quantidade de complexos respiratórios da CTE. Para confirmar essa hipótese avaliamos a expressão proteica dos complexos I, III e V da CTE pela técnica de *Western Blotting*, conforme demonstrado na Figura 6 (D-G). Como podemos observar, os grupos SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF apresentaram um aumento na expressão proteica dos complexos respiratórios I (Figura 6D), III (Figura 6E) e V (Figura 6F) quando comparados aos seus respectivos grupos sedentários. Por outro lado nenhuma diferença pode ser observada nos animais infartados quando comparados aos controles sedentários. Cabe salientar que a similaridade na expressão dos complexos respiratórios não significa uma atividade semelhante dos mesmos, pois alterações pós-traducionais dos complexos podem resultar em disfunção da CTE e consequente progressão da disfunção contrátil nas doenças cardiovasculares (NOJIRI et al., 2006).

Em conjunto, esses dados apontam o exercício físico como um importante modulador positivo da função mitocondrial cardíaca.



Figura 6 – Respiração mitocondrial e expressão proteica dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Controle respiratório mitocondrial (Estado 3/ Estado 4) (A); respiração máxima no Estado 3 (na presença de ADP) (B); respiração máxima no Estado 4 (na presença de oligomicina) (C); expressão proteica dos complexos respiratórios I (D), III (E) e V (F) da CTE, e figuras representativas (G) na mitocôndria cardíaca dos grupos dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Na sequência realizamos o ensaio fluorimétrico para verificar o potencial de membrana interna da mitocôndria cardíaca isolada. A Figura 7A mostra uma similaridade no potencial de membrana interna mitocondrial entre os animais estudados. Além disso, realizamos a análise qualitativa da morfologia mitocondrial no cardiomiócito isolado a fim de detectar possíveis alterações em sua função, uma vez que esse ensaio fluorimétrico depende

do potencial de membrana mitocondrial para reconhecer a organela. Como podemos observar na figura 7B, complementando os dados na mitocôndria isolada, nenhuma diferença pode ser observada entre os diferentes grupos. Vale destacar que apesar de ser um método qualitativo, analisamos quantitativamente a fluorescência nos cardiomiócitos e não observamos nenhuma diferença entre os grupos (dados não apresentados). Em conjunto, esses resultados indicam que a cirurgia de infarto do miocárdio e/ou TF não provocaram alterações significantes no potencial de membrana mitocondrial.



Figura 7 – Potencial de membrana interna mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Potencial de membrana mitocondrial na mitocôndria cardíaca isolada (A) e imagens ilustrativas da mitocôndria em cardiomiócito isolado incubado com *Mitotracker Green* (B) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF.

Avaliamos a permeabilidade dos poros mitocondriais utilizando o ensaio de captação máxima de Ca²⁺ pelo método fluorimétrico, que é baseado em adições subsequentes em concentrações exponenciais do íon (iniciando com a concentração de 50µM), sendo este reconhecido por um fluoróforo (*Calcium Green*). Com esse experimento foi possível demonstrar que a mitocôndria cardíaca dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio possui um baixo limiar ao Ca²⁺ quando comparada ao grupo controle (Figura 8). Esse resultado indica que a organela do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA perde sua integridade estrutural, e consequentemente sua função antecipadamente. Por outro lado, o TF foi eficaz, não só em prevenir essa redução, mas também em aumentar o limiar ao Ca²⁺ no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF (Figura 8), o mesmo resultado ocorreu para o grupo SHAM-TF (Figura 8). Repetimos esse mesmo ensaio, agora na presença de ciclosporina A,

um inibidor da formação dos PTPM, e não observamos a diferença (antes constatada) entre os grupos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA (Figura 8). Esse resultado indica uma abertura dos PTPM no coração dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio, uma vez que quando a formação desses poros foi impedida (na presença de ciclosporina A), a organela não apresentou déficit na captação de Ca²⁺. Os grupos treinados se comportaram da mesma forma que no ensaio controle (Figura 8), aumentaram sua captação máxima de Ca²⁺, mostrando o efeito benéfico do TF nessa variável. Baseado nesses resultados, podemos sugerir que a mitocôndria cardíaca dos animais do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresenta um baixo limiar ao Ca²⁺, e que o TF teve importante participação na elevação deste limiar, contribuindo para a melhora da função mitocondrial.

Sabendo que a mitocôndria apresenta importante papel no tamponamento do Ca^{2+} (EISNER et al., 2000) e que prejuízos no transiente de Ca^{2+} são geralmente observados durante a disfunção cardíaca (HASENFUSS, PIESKE, 2002; ROLIM et al., 2007), nos questionamos se a reduzida captação de Ca^{2+} pela mitocôndria estaria associada ao acúmulo do íon na organela, decorrente do exacerbado nível de Ca^{2+} citosólico durante a diástole no grupo disfunção cardíaca. Esse processo seria um mecanismo compensatório na tentativa de minimizar uma falha sustentada da maquinaria contrátil cardíaca oriunda do acúmulo de Ca^{2+} citosólico. Com o intuito de testar essa hipótese, avaliamos a transiente de Ca^{2+} e o acúmulo do íon na mitocôndria no cardiomiócito isolado dos diferentes grupos estudados.



Figura 8 – <u>Captação máxima de cálcio mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do</u> <u>treinamento físico aeróbico.</u> Captação máxima de Ca²⁺ mitocondrial, na ausência e presença de ciclosporina A, na mitocôndria cardíaca dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p<0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p<0,05), # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p<0,05) e[†] diferença significante vs. captação controle de Ca²⁺ (p<0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Ao contrário do que esperávamos, os animais do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentaram um aumento no transiente de Ca²⁺ intracelular, representado pelo aumento na razão F/F0, quando comparados aos animais controle (Figura 9A). O TF foi eficaz em reduzir esse transiente no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para valores próximos ao grupo SHAM e não interferiu na resposta dos animais controles treinados (Figura 9A). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no tempo para o pico da máxima fluorescência (Figura 9B). Além disso, pudemos constatar no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, um aumento na velocidade de recaptação de 50% (Figura 9C) e 90% (Figura 9D) do Ca²⁺ citosólico quando comparados ao grupo SHAM, e o TF reverteu esse quadro nos animais DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF (Figuras 9C e 9D). Os animais controles que realizaram o TF demonstraram um menor tempo de recaptação de 90% do Ca²⁺ em relação aos grupos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF (Figura 9D), não apresentando modificações no τ 50 (Figura 9C).

Esses resultados sugerem que o baixo limiar ao Ca^{2+} apresentado pelas mitocôndrias dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio não está relacionada ao acúmulo citosólico do íon durante a diástole. Nesse sentido, outros mecanismos intrínsecos da organela, bem como a interação mitocôndria-retículo sarcoplasmático, podem contribuir para a homeostase do Ca^{2+} (DE BRITO, SCORRANO, 2008).

Além de avaliar o transiente de Ca²⁺, também tentamos avaliar o acúmulo de Ca²⁺ mitocondrial em cardiomiócitos isolados. Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados, durante 1 hora em temperatura ambiente, com Rhod-2 AM 3µM (Invitrogen, EUA), uma sonda fluorescente que reconhece o Ca²⁺ mitocondrial. Após a marcação, existe a necessidade de permeabilização das células com o intuito de remover o Ca2+ e a sonda remanescentes no citosol. No entanto, devido ao baixo rendimento na obtenção de células nos grupos DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, optamos por realizar os experimentos sem permeabilizar as células, uma vez que a permeabilização de células danificadas com saponina inviabiliza o experimento. Contudo, os resultados encontrados sem permeabilizar as células não mostraram nenhuma diferença entre os grupos, e considerando a interferência do Ca²⁺ citosólico no ensaio, a interpretação e validade desses resultados são questionáveis. Dessa forma, com o intuito de superar essas limitações, pretendemos avaliar os níveis de Ca²⁺ na mitocôndria através da expressão no cardiomiócito do construto PERICAM com sinal direcionador para a mitocôndria (PERICAM-mt). Para isso, os cardiomiócitos isolados dos ratos adultos serão transfectados com o plasmídeo carregando o PERICAM-mt. Diferente da sonda Rhod2, o PERICAM apresenta menor ruído e facilita a quantificação das quantidades de Ca²⁺ em tempo real sem a necessidade de permeabilização da célula. Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Atsushi Mitwaki do Instituto RIKEN (Japão).



Figura 9 – Transiente de cálcio cardíaco na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Transiente de Ca²⁺ no cardiomiócito isolado (A), tempo para o pico da máxima fluorescência (B) e tempo de recaptação de 50 (C) e 90% (D) do Ca²⁺ dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Para completar as análises funcionais na mitocôndria cardíaca isolada, avaliamos a produção de EROs, aqui representada pelo H_2O_2 . Quantificamos a produção de H_2O_2 nos Estados 2, 3 e 4 da respiração mitocondrial cardíaca por fluorimetria. A quantificação de H_2O_2 no Estado 2 foi feita apenas na presença da mitocôndria, no Estado 3 foi quantificada após adição de ADP (estímulo à respiração máxima), e no Estado 4, após a adição de
oligomicina (inibição do Complexo V). Nossos resultados demonstram que não houve diferença na produção absoluta de EROs entre os grupos estudados nos estados respiratórios mitocondriais 2 (Figura 10A), 3 (Figura 10B) e 4 (Figura 10C). No entanto, quando corrigimos a produção de H_2O_2 pelo consumo de O_2 mitocondrial em cada um dos estados respiratórios, a homeostase redox se reduzida nos animais infartados. Como podemos observar ainda na figura 10, em todos os estados respiratórios houve um aumento na produção de H_2O_2 pelo grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA, quando comparado aos demais grupos (Figuras 10D, 10E e 10F). O TF foi eficaz em reverter esse quadro e normalizar a produção de EROs no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF nos Estados respiratórios 2 (Figura 10D), 3 (Figura 10E) e 4 (Figura 10F) para valores próximos aos do grupo SHAM. Além disso, os animais controles que realizaram exercício físico tiveram a produção de EROs normalizada nos Estados 2 (Figura 10D) e 3 (Figura 10E), e apresentaram uma redução (p=0,06) na liberação de H_2O_2 no Estado 4 quando comparados aos controles sedentários (Figura 10F).



Figura 10 – Produção de peróxido de hidrogênio durante a respiração mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Produção de H₂O₂ no Estado 2 (A), Estado 3 (B) e Estado 4 (C); e razão da produção de H₂O₂ pelo consumo de O₂ no Estado 2 (D), Estado 3 (E) e Estado 4 (F) na mitocôndria isolada cardíaca dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.</p>

Nas análises de EROs, também quantificamos a produção de H_2O_2 após a inibição dos complexos I e III da CTE, e após o desacoplamento mitocondrial. Os grupos que realizaram o TF (SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) apresentaram um aumento na liberação de H_2O_2 proveniente da inibição do complexo I quando comparados ao grupo controle (Figura 11A). Além disso, essa produção também se mostrou aumentada na presença de antimicina A, um inibidor do complexo III, quando comparados aos dois grupos que permaneceram sedentários (SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA) (Figura 11B). A interpretação desses dados poderia sugerir uma piora na homeostase redox com o TF. No entanto acreditamos que esse resultado pode estar associado ao aumento no número de complexos respiratórios após o protocolo experimental (Figuras 6 D-G), visto que um dos benefícios do TF na mitocôndria envolve a biogênese mitocondrial (SUN et al., 2011). Vale ressaltar que nenhuma diferença na produção de H_2O_2 foi ser observada entre os grupos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA após a inibição dos complexos (Figura 11A-B).

Os animais submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram aumento na produção de H_2O_2 após o desacoplamento mitocondrial, obtido na presença de CCCP, quando comparados ao grupo SHAM (Figura 11C). Interessantemente o TF normalizou a liberação de EROs no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para valores próximos do grupo controle (Figura 11C), mostrando-se mais uma vez eficaz no combate à disfunção mitocondrial cardíaca presente nos animais com disfunção cardíaca.

As Figuras 11D, 11E e 11F ilustram, respectivamente, a mesma produção de EROs após a inibição dos complexos I e III, e após o desacoplamento mitocondrial, mas agora comparadas ao Estado 2 do grupo SHAM. Essa comparação foi realizada para demonstrar a porcentagem de participação dos complexos respiratórios I e III e também do desacoplamento mitocondrial no estresse oxidativo. Em conjunto, os dados de produção de EROs na mitocôndria cardíaca isolada indicam que os animais que foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio apresentam um maior estresse oxidativo.



Figura 11 – Participação dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons e do desacoplamento mitocondrial na produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Produção de H₂O₂ após a inibição do complexo I (A) e do complexo III (B) e após o desacoplamento mitocondrial (C) na mitocôndria isolada cardíaca dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA F. As figuras D, E e F representam as respectivas produções de H₂O₂ baseadas na porcentagem do grupo SHAM no Estado 2. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0.05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0.05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Além das análises do estresse oxidativo na mitocôndria cardíaca isolada, avaliamos a quantidade de EROs mitocondriais, aqui representado pelo O_2^- , no cardiomiócito isolado dos ratos adultos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, e observamos o mesmo padrão encontrado anteriormente. O grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentou um aumento de O_2^- mitocondrial quando comparado aos animais controles (SHAM e SHAM-TF), e o TF restaurou a homeostase redox, reduzindo o estresse oxidativo para valores próximos aos do grupo controle (Figura 12A). Esse padrão reforça os resultados encontrados na mitocôndria cardíaca isolada e confirmam os benefícios de um programa de TF na manutenção da homeostase redox na disfunção cardíaca.



Figura 12 – Níveis mitocondriais de ânion superóxido na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Quantificação do ânion superóxido (O₂) na mitocôndria do cardiomiócito isolado (A), e imagens ilustrativas (B) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. Os valores dos grupos SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF estão normalizados pelos valores do grupo SHAM. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Para completar as análises sobre o estresse oxidativo avaliamos a peroxidação lipídica, a carbonilação de proteínas e a formação de adutos de 4-HNE no lisado cardíaco.

Como podemos observar na Figura 13 o grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentou um aumento na peroxidação lipídica quando comparado aos animais controles (SHAM e SHAM-TF). A literatura descreve que o aumento de hidroperóxidos lipídicos apresenta forte associação com os danos celulares observados em diferentes tecidos e situações patológicas, incluindo o tecido cardíaco nas doenças cardiovasculares (ANDERSON, KATUNGA, WILLIS, 2012). Interessante, o TF foi mais uma vez eficaz em normalizar esses valores no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para próximos dos grupos controles, corroborando dados da literatura que demonstram a eficácia de um programa regular de exercícios na redução da peroxidação lipídica (BALCI et al., 2010).



Figura 13 – Peroxidação lipídica na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Peroxidação lipídica no lisado cardíaco nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. MDA – malondialdeído. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Além da peroxidação lipídica, grande atenção é voltada à carbonilação proteica, uma vez que o acúmulo desses compostos pode formar agregados proteicos que levam a uma série de efeitos deletérios na célula (NYSTROM, 2005). Observamos um aumento na oxidação de proteínas no lisado cardíaco no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA quando comparados aos animais controle (Figura 14A). Esses resultados corroboram dados preliminares do nosso grupo, que demonstraram um acúmulo de proteínas danificadas seguido de morte celular em cultura primária de cardiomiócito isolado após a indução da disfunção mitocondrial (dados não publicados). Em contrapartida, os animais que realizaram o TF após a cirurgia de infarto do miocárdio (DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) apresentaram uma normalização na carbonilação proteica, dados que confirmam os efeitos do TF na manutenção da homeostasia redox e função mitocondrial. Vale destacar que os animais controles submetidos ao TF não sofreram alterações na carbonilação de proteínas.

Recentemente, foi reportado na literatura que a formação e o acúmulo de aldeídos decorrentes do estresse oxidativo são extremamente cardiotóxicos e contribuem para o agravamento das doenças cardiovasculares (CHEN et al., 2010). Dentre os aldeídos acumulados no coração, o 4-HNE, originado a partir da oxidação de fosfolipídios presentes na membrana interna da mitocôndria, apresenta grande poder nocivo ao coração. Esse aldeído eletrofílico é capaz de atacar aminoácidos nucleofílicos e formar adutos com proteínas (adutos de Michaelis), resultando na inativação de proteínas-alvo e consequente desarranjo/disfunção celular. Sendo assim, decidimos avaliar a formação dos adutos de 4-HNE no lisado cardíaco. Os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram um aumento na formação dos adutos quando comparados ao grupo SHAM (Figura 14B). O TF foi mais uma vez eficaz em restaurar esses valores para próximos do grupo controle no grupo DISFUNÇÃO CARDÍCA-TF (Figura 14B), não alterando a expressão no grupo SHAM-TF.

Os resultados acima descritos reforçam a premissa de disfunção mitocondrial e perda da homeostasia redox no nosso modelo animal de disfunção cardíaca. Por outro lado, o TF tem se mostrado uma ferramenta eficaz no combate ao estresse oxidativo em diversas patologias, incluindo as doenças cardiovasculares (BERTAGNOLLI et al., 2008; XU et al., 2010), quadro que vai ao encontro dos resultados encontrados na presente pesquisa, no qual houve uma redução do estresse oxidativo nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio.



Figura 14 – Expressão de proteínas carboniladas e formação de adutos de 4-HNE na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Expressão de proteínas carboniladas (A) e formação de adutos de 4-HNE (4-hidroxinonenal) (B) no lisado cardíaco nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), * diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Uma vez que a homeostasia redox é determinada pelo equilíbrio entre as vias pró e antioxidantes, atenção também deve ser dada aos mecanismos responsáveis pela defesa antioxidante intracelular, que conta com importante ação das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase.

Inicialmente quantificamos a atividade da catalase no lisado cardíaco conforme descrito anteriormente, e observando a Figura 15A podemos notar que os animais do grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA apresentaram uma redução na atividade da enzima catalase quando comparados aos animais controle. Interessante, esse quadro foi revertido após TF nos animais infartados (DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF). Por outro lado, nenhuma modificação

foi observada na atividade desta enzima antioxidante no grupo SHAM-TF. Também avaliamos a atividade da SOD no lisado cardíaco e não identificamos alterações significantes entre os grupos estudados (Figura 15B).



Figura 15 – Atividade antioxidante na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Atividade da catalase (A) e da superóxido dismutase (SOD) (B) nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Além da atividade das enzimas antioxidantes, optamos também por avaliar os níveis de glutationa no lisado cardíaco, conforme demonstrado na Figura 16. Nenhuma diferença significante foi encontrada para os níveis de glutationa total (Figura 16A), glutationa reduzida (GSH) (Figura 16B) e oxidada (GSSG) (Figura 16C), bem como na razão GSH/GSSG (Figura 16D) entre os grupos SHAM e DISFUNÇÃO CARDÍACA. Por outro lado, o grupo SHAM-TF apresentou uma redução nos níveis de glutationa oxidada – p=0,08 (Figura 16C) e uma consequente melhora no estado redox representado pela razão GSH/GSSG – p=0,06 (Figura 16D) quando comparados aos controles sedentários. Além disso, os animais infartados submetidos ao TF apresentaram aumentos na glutationa total (Figura 16A) e reduzida (Figura 16B) quando comparados ao grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA.

Sabendo que as enzimas antioxidantes contribuem em parte para a atenuação dos efeitos deletérios sofridos pela musculatura cardíaca (CAMPOLO et al., 2007; DAÍ et al., 2009), o prejuízo na atividade antioxidante encontrado nos animais com disfunção cardíaca,

em conjunto com os resultados anteriores, reforça a premissa que a perda da homeostase redox está associada ao agravamento da disfunção ventricular e estabelecimento da IC. A melhora na defesa antioxidante promovida pelo TF no nosso modelo animal confirma os efeitos positivos dessa medida não farmacológica na restauração da homeostasia redox.



Figura 16 – <u>Níveis de glutationa na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico.</u> Níveis totais de glutationa (A), GSH–glutationa oxidada (B), GSSG– glutationa reduzida (C) e a razão GSH/GSSG (D) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Após constatarmos a disfunção mitocondrial em animais com reduzida contratilidade cardíaca, decidimos investigar se esse quadro estaria associado a possíveis alterações dos níveis de ATP cardíaco. De fato, observamos uma redução no conteúdo de ATP nos corações

dos ratos que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio quando comparados aos animais controles (Figura 17). Interessante, o TF foi eficaz em restaurar esse conteúdo no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para valores próximos aos do grupo SHAM. Nenhuma alteração foi observada nos animais controles que realizaram o protocolo de TF (Figura 17).



Figura 17 – Concentração de ATP na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Níveis de ATP no lisado cardíaco dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), * diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Baseados nos dados funcionais da organela constatamos uma clara disfunção mitocondrial nos animais com disfunção cardíaca, representada pela redução na capacidade respiratória, na taxa de captação de cálcio e nos níveis de ATP. Associado a essa resposta encontramos no grupo disfunção cardíaca uma perda da homeostase redox, representada pelo acúmulo de produtos derivados da oxidação (hidroperóxidos lipídicos, 4-HNE e proteínas carboniladas) nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio. Além disso, foi encontrado aumento na produção de H₂O₂ e redução na atividade antioxidante cardíaca nos animais com disfunção ventricular. Nenhuma diferença foi observada no potencial de membrana mitocondrial. A partir desses dados podemos confirmar a instalação do quadro de disfunção mitocondrial no nosso modelo de disfunção cardíaca. O TF foi responsável por promover uma melhora na função mitocondrial nos animais infartados, quadro constatado a partir da restauração da capacidade respiratória, e consequentemente dos níveis energéticos cardíaco para valores próximos aos dos animais saudáveis. Aliado a essas mudanças houve

um aumento taxa de captação máxima de cálcio mitocondrial, uma redução no estresse oxidativo (produção de H_2O_2 e de produtos derivados da oxidação) e uma melhora na defesa antioxidante dos animais com disfunção ventricular submetidos ao protocolo experimental. Esses resultados confirmam os efeitos benéficos de um programa de TF nas doenças cardiovasculares, reforçando a utilização do mesmo como uma terapia não farmacológica adjuvante no tratamento da fisiopatologia cardiovascular.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MITOCONDRIAL CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADO AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

Uma vez que um dos objetivos do projeto também inclui a caracterização da dinâmica mitocondrial em animais com disfunção cardíaca, bem como a influência do TF nesse processo, decidimos avaliar o perfil de expressão das proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondriais na tentativa de elucidar os mecanismos celulares envolvidos nas adaptações cardíacas patológicas (decorrentes do infarto do miocárdio) e fisiológicas (decorrentes do TF). A Figura 18 apresenta os dados da expressão proteica referentes às proteínas envolvidas na fusão mitocondrial (Mfn1, Mfn2 e OPA1) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. Como podemos observar, os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram um aumento na expressão das proteínas Mfn1 (Figura 18A), Mfn2 (Figura 18B) e OPA1 (Figura 18C) quando comparados ao grupo SHAM. O TF foi capaz de normalizar a expressão dessas GTPases no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. Além disso, também encontramos um aumento na expressão proteica da OPA1 nos animais controles submetidos ao protocolo de TF (Figura 18C).



Figura 18 – Expressão proteica das enzimas envolvidas na fusão mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Expressão proteica da Mfn1 (A), Mfn2 (B) e OPA1 (C), e as figuras representativas (D) nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

As proteínas relacionadas à fissão mitocondrial também foram analisadas, e como podemos observar na Figura 19, tanto a Drp1 (Figura 19A), quanto a Fis1 (Figura 19B) se apresentaram reduzidas na mitocôndria cardíaca isolada dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio, mesmo padrão observado no grupo SHAM-TF. Por outro lado, o grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF apresentou um aumento na expressão da Drp1 quando comparado aos grupos SHAM-TF e DISFUNÇÃO CARDÍACA, não diferindo dos animais controles sedentários. Contudo, o TF não interferiu na expressão da Fis1 nesse grupo, que permaneceu reduzida.

Nossos resultados sugerem um aumento na expressão proteica das GTPases relacionadas à fusão e uma redução na expressão das proteínas envolvidas na fissão na fração mitocondrial dos animais com disfunção cardíaca.



Figura 19 – Expressão proteica das enzimas envolvidas na fissão mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Expressão proteica da Drp1(A) e Fis1 (B), e as figuras representativas (C) nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Considerando que alterações pós-traducionais (ex. fosforilação, acetilação, nitrosilação e ubiquitinação), bem como localização, podem interferir na função proteica, as diferenças encontradas na expressão das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial não refletem, necessariamente, o padrão de sua atividade. Sendo assim, decidimos avaliar a atividade GTPase específica das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1 na mitocôndria cardíaca isolada. Diferentemente do perfil encontrado para a expressão proteica, a atividade da Mfn1 se

mostrou diminuída no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA quando comparado ao grupo SHAM (Figura 20A), quadro que foi revertido após o TF nos animais infartados. Os três grupos experimentais (SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF) apresentaram o mesmo padrão para a atividade da Mfn2, reduzindo seus valores quando comparados aos animais controles (Figura 20B). Por outro lado, os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram um aumento na atividade da Drp1 quando comparados ao grupo SHAM (Figura 20C), valores que foram normalizados após oito semanas de TF pelo grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. Vale destacar que a atividade das proteínas em questão foi normalizada por suas respectivas expressões proteicas.

Atualmente, devido à escassez de métodos bioquímicos eficazes, não é possível quantificar a frequência com que os processos de fusão e fissão ocorrem *in vivo*, entretanto, nossos dados sugerem que há uma maior ativação da maquinaria celular associada ao processo de fissão mitocondrial, em detrimento à fusão, na disfunção cardíaca, e que o TF é capaz de restaurar o perfil de ativação para valores similares ao dos animais saudáveis.



Figura 20 – Atividade das enzimas envolvidas na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Atividade GTPase específica das proteínas de fusão mitocondrial Mfn1 (A) e Mfn2 (B) e de fissão mitocondrial Drp1 (C) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com post-hoc de Duncan.

Após constatarmos alterações na expressão e atividade das proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial, partimos para a investigação da morfologia da organela no coração, por meio da técnica de microscopia eletrônica, com o intuito de verificar possíveis mudanças na estrutura das mitocôndrias. A Figura 21A retrata o aumento no número de mitocôndrias cardíacas no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA quando comparado ao grupo SHAM, enquanto que a Figura 21B demonstra que os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentam uma área mitocondrial reduzida quando comparados aos animais saudáveis. Esse fenótipo pode ser melhor observado pelas imagens representativas de cortes transversais do coração dos animais estudados em diferentes magnitudes – 3000x e

6000x (Figura 21C). Em contrapartida, o TF foi eficaz em alterar esse fenótipo mitocondrial no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF, normalizando a quantidade de mitocôndrias e restaurando a área da organela para valores similares aos dos animais saudáveis (Figura 21). Além disso, os animais saudáveis submetidos a oito semanas de TF apresentaram um aumento no número de mitocôndrias com maior área. Esse resultado assinala o efeito positivo do TF na biogênese mitocondrial.



Figura 21 – Morfologia mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Número de mitocôndrias – 100 μm² (A), área mitocondrial – μm² (B) e imagens representativas (C) dos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*. S – sarcômero, M – mitocôndria e N – núcleo.

Uma vez quantificado o número e o tamanho das mitocôndrias cardíacas, nos propusemos a avaliar também a densidade mitocondrial nesses animais, visto que essa

característica está relacionada ao bom funcionamento da organela (ROSCA et al., 2008). Como podemos observar na Figura 22A ocorreu um aumento na expressão proteica da VDAC no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA, esses dados corroboram o aumento no número de mitocôndrias identificado pela técnica de microscopia eletrônica (Figura 21A). Entretanto o aumento no número de mitocôndrias não veio acompanhado pelo maior expressão da IDH2, uma proteína presente na matriz mitocondrial, nos animais infartados (Figura 22B). Sendo assim, a razão VDAC/IDH2 se mostrou elevada nos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio quando comparados aos animais controles, indicando uma menor densidade mitocondrial (Figura 22C). O resultado encontrado no nosso modelo de disfunção cardíaca corrobora o quadro apresentado até agora e reforça a premissa de que modificações na estrutura mitocondrial estão associadas a mudanças bioenergéticas na célula, comprometendo o bom funcionamento da bomba cardíaca.

O TF foi eficaz em reduzir a expressão proteica da VDAC no grupo DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF para valores próximos aos do grupo SHAM, quadro que complementa a redução do número de organelas encontrada pela técnica de microscopia eletrônica (Figura 21A). Esse resultado veio acompanhado de uma normalização da razão VDAC/IDH2 (Figura 22C), uma vez que os animais infartados submetidos ao TF não demonstraram alteração na expressão proteica da IDH2 (Figura 22B). Além disso, o grupo SHAM-TF apresentou um aumento na expressão da IDH2 quando comparado aos animais controles que permaneceram sedentários (Figura 22B), não diferindo nas demais variáveis analisadas. Aliado aos resultados descritos anteriormente, essas alterações confirmam o efeito positivo do TF sob a estrutura e função mitocondrial cardíaca, fato que está intimamente associado à melhora da contratilidade do cardiomiócito e consequentemente da função cardíaca nos animais infartados.



Figura 22 – Densidade mitocondrial na disfunção cardíaca: efeitos do treinamento físico aeróbico. Expressão proteica das proteínas VDAC (A) e IDH2 (B), e a razão VDAC/IDH2 (C) no lisado cardíaco, e as figuras representativas (D) nos grupos SHAM, SHAM-TF, DISFUNÇÃO CARDÍACA e DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF. * diferença significante vs. SHAM (p< 0,05), [&] diferença significante vs. SHAM-TF (p< 0,05) e # diferença significante vs. DISFUNÇÃO CARDÍACA (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de *Duncan*.

Em conjunto, os dados referentes à dinâmica mitocondrial denotaram um aumento na expressão das proteínas envolvidas na fusão mitocondrial, com concomitante redução na atividade GTPase da Mfn1 e Mfn2; além de uma redução na expressão das proteínas relacionadas à fissão mitocondrial, acompanhada de uma maior atividade da GTPase Drp1. Essas alterações vieram acompanhadas de mudanças na morfologia da organela, levando a um maior número de mitocôndrias com tamanho reduzido na disfunção cardíaca. Aliado a esses achados, os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram uma menor densidade mitocondrial quando comparados ao grupo SHAM. O TF foi capaz de restaurar o fenótipo mitocondrial em nosso modelo animal de disfunção cardíaca, uma vez

que restaurou, para valores próximos do grupo controle, a expressão proteica das GTPases Mfn1, Mfn2, OPA1 e Drp1, bem como a atividade da Mfn1 e Drp1. Essa normalização está associada à restauração do fenótipo da organela. Além disso, oito semanas de TF aumentaram a densidade mitocondrial nos animais com DISFUNÇÃO CARDÍACA-TF quando comparados ao grupo disfunção cardíaca que permaneceu sedentário. Cabe ressaltar que, como dito anteriormente, a participação efetiva dos processos de fusão e fissão mitocondriais no desenvolvimento da IC, bem como após TF, ainda não foi descrita devido à falta de métodos bioquímicos capazes de quantificar as frequências com que esses processos ocorrem *in vivo*.

6. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que caracteriza os efeitos do TF na estrutura e função mitocondrial cardíaca após infarto do miocárdio em ratos. O entendimento global da função e dinâmica da organela no coração constitui a base para o melhor entendimento das alterações celulares decorrentes do infarto do miocárdio, visto que a mitocôndria é peça fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade do cardiomiócito.

Nossos resultados demonstram uma proeminente disfunção mitocondrial cardíaca, aliada às alterações na dinâmica da organela em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio, fatores que contribuem para o agravamento da disfunção ventricular. Por outro lado, o TF mostrou-se eficaz em minimizar os efeitos deletérios sofridos pela mitocôndria após a cirurgia de infarto do miocárdio, além de promover o remodelamento cardíaco reverso e melhorar a função contrátil ventricular.

6.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Sabendo que a cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio em animais é utilizada para mimetizar o quadro de disfunção ventricular e IC observado em humanos (PFEFFER et al., 1979; FERREIRA et al., 2012), e com o intuito de confirmar a disfunção cardíaca no modelo animal proposto, foi parte deste estudo uma caracterização inicial do fenótipo dos animais quatro e doze semanas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior. Para isso, avaliamos parâmetros morfofuncionais cardíacos e fisiológicos nos grupos estudados.

6.1.1 Alterações morfofuncionais cardíacas e parâmetros fisiológicos em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Inicialmente avaliamos a função e estrutura cardíaca por meio do exame ecocardiográfico quatro e doze semanas após a indução do infarto do miocárdio. Como

observado nos resultados, quatro semanas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária os animais apresentaram significante redução da função contrátil cardíaca, que veio acompanhada de uma dilatação das câmaras, contribuindo para a disfunção ventricular. Essas mesmas alterações puderam ser observadas doze semanas após o infarto do miocárdio, confirmando o quadro de disfunção cardíaca no modelo animal proposto. Atualmente, a utilização do ecocardiograma na avaliação morfofuncional cardíaca é extremamente recomendada para fins de prognóstico e como indicadores de progressão da disfunção ventricular e IC (FRIGERIO, ROUBINA, 2005), e suas variáveis são utilizadas para a identificação da síndrome tanto em humanos (WANG et al., 2005), quanto em roedores (SANTOS et al., 2006; FERREIRA et al., 2012).

Acreditamos que a disfunção ventricular esquerda observada nesses animais foi consequência da perda exacerbada de tecido contrátil cardíaco decorrente do processo isquêmico, visto que após a cirurgia os animais apresentaram uma área infartada em torno de 30% da área cardíaca total. Além disso, é consenso na literatura que a hiperativação dos sistemas neuro-humorais, desencadeada inicialmente pela lesão do miocárdio, contribui significantemente para a disfunção contrátil cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda ao longo do tempo (BRUM et al., 2006). De fato, observamos um remodelamento cardíaco patológico ao término do protocolo nos animais com disfunção cardíaca, representado pela hipertrofia cardíaca patológica e aumento na deposição de colágeno doze semanas após o infarto do miocárdio.

Aliado ao prejuízo na função cardíaca, a intolerância à realização de esforço físico também é utilizada como um marcador do quadro de IC. Definida como uma redução na capacidade de realizar exercício físico devido a sintomas como dispneia ou fadiga, a intolerância aos esforços é comumente utilizada para diagnóstico ou prognóstico de doenças cardíacas (RUBIM et al., 2006). Na tentativa de verificar o estabelecimento da IC nesses animais avaliamos a capacidade física por meio de teste de esforço progressivo até a exaustão e em ambos os períodos de análises não foi possível detectar alterações na tolerância aos esforços físicos entre os animais infartados e controles. Outro fator que acompanha a progressão da disfunção ventricular é a formação de edema pulmonar. Esse sintoma clínico, presente tanto em humanos, quanto em modelos experimentais de IC (REMO, 2005; NISHI et al., 2006), reflete o acúmulo de líquido nos pulmões como consequência da incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear quantidades adequadas de sangue (FIGUEROA, PETERS, 2006). Como descrito anteriormente, não observamos edema pulmonar nos animais infartados.

As alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes do infarto do miocárdio também desencadeiam importantes modificações hemodinâmicas e periféricas (COLUCCI, 1998), contudo, não foi possível identificar alterações no comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais quatro e doze semanas após a cirurgia. A literatura reporta que as alterações após o infarto do miocárdio dependem, primariamente, do tamanho e localização da área infartada (PFEFFER et al., 1979; OLIVETTI et al., 1991). De fato, segundo Pfeffer et al. (1979) ratos com infartos até 30% não apresentam anormalidades hemodinâmicas (PFEFFER et al., 1979). Além disso, moderadas alterações hemodinâmicas podem desaparecer rapidamente durante o processo de cicatrização de reduzidas áreas de infarto (OLIVETTI et al., 1991).

Por fim, com o intuito de melhor entender os mecanismos celulares envolvidos no remodelamento cardíaco patológico, avaliamos o transiente de Ca^{2+} intracelular, visto que uma série de estudos na literatura aponta um prejuízo nessa variável em corações insuficientes (HASENFUSS, PIESKE, 2002; ROLIM et al., 2007). Ao contrário do sugerido pela literatura, nossos resultados apontam para um aumento no pico de Ca^{2+} sistólico, bem como uma maior velocidade de recaptação do mesmo. Esses dados corroboram resultados recentes do nosso grupo de pesquisa, que demonstraram uma melhora no transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados de ratos adultos dez semanas após cirurgia de infarto do miocárdio. Contudo, também foi observado que este resultado não reflete na melhora na contratilidade cardíaca, uma vez que houve um prejuízo na contratilidade dos cardiomiócitos isolados não publicados). Tem sido reportado na literatura que a redução na contratilidade cardíaca nas doenças cardiovasculares é reflexo, dentre outros fatores, de uma dessensibilização dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} (BRUM et al., 2011). Sendo assim, nossos dados sugerem que o comportamento da dinâmica do Ca^{2+} pode não refletir o fenótipo da célula cardíaca nesse modelo.

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo de caracterização fenotípica nos permitem afirmar que doze semanas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária nosso modelo animal desenvolveu significantes alterações na função e estrutura cardíaca, no entanto, devido à ausência de sinais clássicos de IC, optamos classificá-los como um modelo de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.

6.1.2 Efeitos do treinamento físico aeróbico no remodelamento cardíaco e tolerância aos esforços físicos em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Após a confirmação do quadro de disfunção cardíaca no modelo animal proposto, nosso próximo objetivo foi verificar os efeitos do TF no remodelamento cardíaco e tolerância aos esforços físicos na disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio. Conforme apresentado nos resultados, mostramos que oito semanas de TF melhoraram significantemente a função ventricular e a tolerância à realização de esforços físicos nos animais submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária, além de promover remodelamento cardíaco reverso.

Está bem documentado na literatura a melhora da função cardíaca decorrente de um programa de TF em diversas etiologias da doença, observada tanto em humanos (CONN, WILLIAMS, WALLACE, 1982; ANTUNES-CORREA et al., 2011), quanto em modelos experimentais (ROLIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). De fato, essa melhora decorre de alterações benéficas na musculatura cardíaca, propiciando uma atenuação da dilatação das câmaras e uma redução na tensão da parede ventricular (ORENSTEIN et al., 1995). Corroborando os dados da literatura, demonstramos que oito semanas de TF promoveram um aumento na fração de encurtamento dos animais infartados quando comparados aos que permaneceram sedentários. Além disso, as análises ecocardiográficas também demonstraram uma normalização dos diâmetros diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo no nosso modelo de disfunção cardíaca.

Aliada às alterações na função cardíaca, nossos resultados demonstram que o TF também preveniu o remodelamento patológico no coração dos animais com disfunção cardíaca, uma vez que impediu o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e da deposição excessiva de colágeno. Vale à pena ressaltar que é consenso na literatura o efeito positivo do TF positivo no remodelamento cardíaco reverso. De fato, um programa regular de exercícios físicos promove redução na via de sinalização da calcineurina, relacionada à hipertrofia patológica (OLIVEIRA et al., 2009) e nas proteínas relacionadas à fibrose cardíaca (XU et al., 2008). Isto se faz importante, uma vez que o remodelamento patológico está altamente relacionado ao óbito em pacientes com IC (MERIS et al., 2009).

Outro efeito positivo do TF durante o processo de falência do miocárdio envolve a normalização da dinâmica intracelular do Ca^{2+} , uma vez que a função ventricular está acoplada ao transiente de Ca^{2+} cardíaco (BRUM et al., 2011). De fato, Rolim et al. (2007) demonstraram que o TF foi capaz de normalizar a expressão de proteínas envolvidas na

homeostase do cálcio cardíaco, colaborando para a melhora da função ventricular em modelo genético de IC induzida por hiperatividade simpática (ROLIM et al., 2007). E conforme demonstramos, o TF promoveu uma normalização no transiente de Ca^{2+} no coração dos animais infartados que treinaram, restaurando os valores para próximos aos do grupo controle. Esse resultado pode estar associado a um aumento na sensibilidade dos miofilamentos contráteis Ca^{2+} , visto que esta é mais uma das benfeitorias de um programa regular de exercícios físicos no combate à disfunção cardíaca (KEMI; WISLOFF, 2010). Nesse contexto, nossos dados sugerem que a melhora da função ventricular decorrente do TF na disfunção cardíaca é fruto das mudanças, pelo menos em parte, envolvidas na homeostase cardíaca de Ca^{2+} .

Além de estar associado à melhora da função cardíaca, o TF está intimamente relacionado à capacidade de realização de esforço físico e consequente atenuação dos sintomas das doenças cardiovasculares (BENITO, NATTEL, 2009). A medida da tolerância ao esforço faz-se importante, uma vez que existe uma excelente correlação entre os índices de disfunção cardíaca durante o exercício físico e a fração de encurtamento ventricular mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos de cardiomiopatia (DESAI et al., 1997). Como já citado, quatro semanas após a cirurgia de infarto não foram encontradas alterações na distância total percorrida durante o teste máximo quando comparados aos animais controles, no entanto, após oito semanas de TF os animais foram capazes de aumentar em 82% a tolerância aos esforços. Essa resposta é fruto da associação de um melhor desempenho cardíaco com adaptações benéficas em alvos não cardíacos. Dentre estas adaptações podemos destacar a resposta vasodilatadora no endotélio vascular, na musculatura esquelética, na distribuição do débito cardíaco e na resposta ventilatória (PINA, DAOUD, 2004), assim como modificações estruturais e metabólicas na musculatura esquelética (BACURAU et al., 2009).

É importante ressaltar que os efeitos benéficos do TF nas doenças cardiovasculares também estão associados ao controle neural do sistema cardiovascular, cuja redução no efluxo simpático e consequente restauração do balanço simpato-vagal contribuem diretamente para a melhora da morbidade e mortalidade observada tanto em modelos animais (ROLIM et al., 2007; JORGE et al., 2011), quanto em humanos portadores de doenças cardiovasculares (ROVEDA et al., 2003; FRAGA et al., 2007).

Por fim, mas não menos importante, demonstramos que o TF promoveu aumento na tolerância aos esforços, redução na deposição de colágeno cardíaco e bradicardia de repouso nos animais controles submetidos a oito semanas de exercício físico. A redução da frequência cardíaca de repouso após um período de TF sugere uma melhora no balanço autonômico nos

animais treinados e comprova a eficácia do programa de exercícios físicos (BRUM et al., 2011). Além disso, valores elevados de frequência cardíaca têm sido relatados como um preditor independente de mortalidade na população em geral e nas doenças (DYER et al., 1980; KANNEL et al., 1987; GILLMAN et al., 1993). Cabe salientar que os animais infartados submetidos ao TF também apresentaram bradicardia de repouso, reafirmando o efeito benéfico do TF na redução dos fatores de risco associados às doenças cardiovasculares. Dessa forma, nossos achados confirmam o papel do TF como uma eficiente terapia não farmacológica no tratamento das doenças cardiovasculares.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

6.2.1 Disfunção mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Baseados nos dados funcionais da organela, obtidos nos ensaios com a mitocôndria e/ou cardiomiócito isolados, constatamos uma clara disfunção mitocondrial nos animais com disfunção cardíaca, representada inicialmente pela redução na capacidade respiratória mitocondrial. A diminuição na eficiência respiratória mitocondrial cardíaca nas doenças cardiovasculares vem sendo demonstrada em estudos clínicos e experimentais, que apontam a redução na atividade dos complexos da CTE como um fator determinante para o prejuízo na transferência de energia para a contração cardíaca e a consequente progressão da disfunção ventricular (SHAROV et al., 1998; NOJIRI et al., 2006; ROSCA, HOPPEL, 2009). Entretanto, é importante destacar que a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial não depende, exclusivamente, da atividade individual dos complexos respiratórios, mas também do arranjo apropriado entre os componentes da CTE, gerando unidades funcionais (supercomplexos). A formação incorreta dessas unidades, assim como mudanças na biogênese/morfologia mitocondrial e um remodelamento metabólico da organela que acompanha o desenvolvimento da disfunção cardíaca, pode desempenhar um importante papel fisiopatológico na IC (ROSCA et al., 2008; HAUSENLOY, RUIZ-MEANA, 2010). De fato,

97

Rosca et al. (2008) demonstraram em modelo canino de IC moderada a grave que a redução na fosforilação oxidativa foi acompanhada de um arranjo incorreto das unidades funcionais. Cabe salientar que os autores não encontraram alterações na expressão proteica e/ou atividade individual dos complexos da CTE (ROSCA et al., 2008). Nossos dados vão ao encontro da literatura e sugerem que a ineficiência respiratória nos animais infartados pode estar associada a um desarranjo dos componentes da CTE, uma vez que nenhuma modificação foi detectada na expressão proteica dos complexos respiratórios mitocondriais.

Em adição ao papel já bem estabelecido da mitocôndria no metabolismo energético, a regulação da morte celular tem emergido como outra função da organela. Tal regulação está intimamente relacionada ao fato da mitocôndria ser a maior fonte intracelular de EROs, geradas em sua maioria pelos complexos I e III da CTE. A formação excessiva de EROs pode provocar danos irreversíveis à diversos componentes celulares levando a um prejuízo no funcionamento celular, e em última instância à apoptose (FRIGUET, BULTEAU, PETROPOULOS, 2008). Por outro lado, níveis moderados de EROs são cruciais para o funcionamento adequado da célula, uma vez que atuam como segundos-mensageiros em diversos processos celulares (ZHANG, GUTTERMAN, 2007; KOWALTOWSKI et al., 2009). De fato, esse duplo papel das EROs tem sido observado no tecido cardíaco. O estresse oxidativo mitocondrial, acompanhado de uma maior concentração intracelular de Ca2+ e reduzida produção de ATP, está intimamente relacionado à formação dos PTPM e consequente morte celular durante o processo de isquemia/reperfusão cardíaca (VERCESI et al., 2006). Interessante, após um período de pré-condicionamento, a geração moderada de EROs desencadeia sinalizações intracelulares capazes de prevenir a redução do ATP e o acúmulo do Ca2+ durante a isquemia. Consequentemente essas condições atenuam a formação dos PTPM e protegem o tecido cardíaco durante o processo de reperfusão (VANDEN HOEK et al., 1998; JAVADOV et al., 2011).

Conforme descrito nos resultados, encontramos no grupo disfunção cardíaca uma perda da homeostase redox, representada pelo aumento exacerbado na produção de H_2O_2 e O_2^- . Esse quadro é fruto da disfunção mitocondrial, caracterizada na maioria das vezes pelo desacoplamento da CTE e consequente prejuízo da fosforilação oxidativa (NOJIRI et al., 2006). Vale ressaltar que o exacerbado aumento de EROs também contribui para o mau funcionamento da maquinaria bioenergética mitocôndria, estabelecendo então um ciclo de retroalimentação positiva entre disfunção mitocondrial e produção de EROs na disfunção cardíaca. Além disso, constatamos um acúmulo de produtos derivados da oxidação (hidroperóxidos lipídicos, 4-HNE e proteínas carboniladas) no coração dos animais que

passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio. A literatura reporta que o aumento cardíaco de produtos derivados da oxidação contribui efetivamente para a disfunção mitocondrial, uma vez que pode levar a um prejuízo na atividade dos complexos respiratórios I, III e V da CTE mitocondrial, bem como a um aumento na permeabilidade mitocondrial (ANDERSON, KATUNGA, WILLIS, 2012). De fato, Yarian, Rebrin e Sohal (2005) demonstraram que o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos cardíacos leva à modificação oxidativa do polipeptídeo F1 do complexo respiratório ATP sintase em camundongos idosos, fato relacionado à redução de 18% na atividade desse complexo (YARIAN, REBRIN, SOHAL, 2005)._Além disso, em pacientes com IC, esse aumento tem sido positivamente correlacionado com a severidade da doença (BELCH et al., 1991; MALLAT et al., 1998). De fato, o acúmulo de agentes oxidantes vem sendo reconhecido como um fator causal em diversos quadros patológicos (ex. diabetes e doenças cardiovasculares) (NEGRE-SALVAYRE et al., 2010). Nas enfermidades em que o aumento do estresse oxidativo, agudo ou crônico, se faz presente, os produtos derivados da oxidação estão sendo considerados os agentes mais potentes, persistentes e relevantes na fisiologia desse estresse.

Associado ao aumento de EROs, encontramos uma redução na atividade antioxidante no coração dos animais infartados, representada pela menor atividade da catalase. Apesar de ser a maior fonte celular de EROs, a mitocôndria também exerce um papel decisivo no combate ao estresse oxidativo. De fato, a eliminação de produtos oxidativos gerados durante uma série de processos fisiológicos, como o metabolismo de lipídeos e carboidratos, representa um mecanismo protetor intrínseco da célula, contribuindo para a manutenção da sua viabilidade (HAUSENLOY, RUIZ-MEANA, 2010). Nesse contexto, a diminuição na defesa antioxidante tem sido reportada na literatura como um contribuinte na progressão da IC, fruto do prejuízo na respiração mitocondrial e exacerbada formação de EROs (NOJIRI et al., 2006). Nojiri et al. (2006) demonstraram que camundongos com deleção do gene da SOD no músculo cardíaco desenvolveram uma cardiomiopatia dilatada associada à uma progressiva intolerância aos esforços físicos. Esse quadro veio acompanhado de um aumento na formação de EROs, contribuindo para a redução na produção de ATP por meio da ativação das enzimas desacopladoras mitocondriais (NOJIRI et al., 2006). Além disso, a melhora no sistema de defesa antioxidante, obtido pela superexpressão das enzimas antioxidantes, atenua o remodelamento cardíaco patológico e preserva a função cardíaca em modelo animal de doença cardiovascular (SHIOMI et al., 2204; SHEN et al., 2006). Entretanto é importante destacar que recentes estudos clínicos e experimentais atribuem a perda da homeostase redox nas doenças cardiovasculares apenas ao aumento exacerbado da produção de EROs, enquanto

que a atividade antioxidante permanece preservada (TSUTSIU et al., 2001). Esse quadro corrobora nossos demais resultados envolvendo as enzimas antioxidantes, e indica que o estresse oxidativo no nosso modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio está primariamente relacionado ao aumento da produção de EROs, frente ao declínio da defesa antioxidante.

Desde a década de 1970 a mitocôndria, em conjunto com o retículo sarcoplasmático, vem sendo considerados importantes estruturas no controle da homeostase do Ca^{2+} cardíaco. A proximidade entre as organelas facilita a troca do Ca^{2+} e permite a manutenção dos níveis fisiológicos do íon, contribuindo diretamente para a contração cardíaca. Nesse sentido, a mitocôndria vem sendo considerada uma organela capaz de tamponar o excesso de Ca^{2+} citosólico (EISNER et al., 2000). De fato, em condições normais, a força eletroquímica decorrente do potencial de membrana interna mitocondrial permite a entrada de Ca^{2+} através de transportadores/trocadores específicos, e o balanço influxo/efluxo do íon é mantido (O ROURKE, 2007). Entretanto, quando a concentração de Ca^{2+} mitocondrial se torna muito elevada, ocorre a formação e ativação dos PTPM, levando à ruptura da organela (KUJOTH et al., 2005). Essa situação pode ser observada em diversas patologias, incluindo as doenças cardiovasculares, e contribui diretamente para a progressão da doença, uma vez que está diretamente associada à morte celular (FUJITA et al., 2007; GOMEZ et al., 2009; JAVADOV et al., 2011).

Conforme demonstramos, a mitocôndria cardíaca dos animais infartados perde sua integridade estrutural quando desafiada com baixas concentrações de Ca^{2+} quando comparados aos animais saudáveis, quadro que foi revertido após a inibição dos PTPM (na presença de Ciclosporina A). Baseado nesses resultados, podemos sugerir que a mitocôndria cardíaca dos animais que passaram pela cirurgia de ligadura da artéria coronária apresenta um baixo limiar ao Ca^{2+} . Acreditamos que esse fenômeno é resultado de uma sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial decorrente da anormalidade no transiente de Ca^{2+} observada nesses animais, e contribui para o agravamento da disfunção ventricular. De fato, altas concentrações do íon desencadeiam uma progressiva redução na fosforilação oxidativa, explicada em parte pelas alterações no potencial de membrana mitocondrial e consequente falha na síntese de ATP (DI LISA; BERNARDI, 1998). Estudos clínicos recentes demonstraram que a não captação de cálcio pela mitocôndria, por meio da inibição da formação dos PTPM, pode reduzir o tamanho da área infartada e melhorar a recuperação da função contrátil do coração após a reperfusão (GOMEZ et al., 2009). Além disso, atualmente sabe-se que o acúmulo de Ca^{2+} citosólico na diástole contribui para a disfunção contrátil (OLIVEIRA et al., 2009) e

100

acreditamos que esse Ca^{2+} tende a translocar-se para a mitocôndria com o intuito de evitar uma falha sustentada na maquinaria contrátil cardíaca. Uma das futuras propostas do laboratório é entender melhor a contribuição do elevado transiente de Ca^{2+} na disfunção cardíaca para com a dinâmica/metabolismo mitocondrial.

A combinação de elevadas concentração de Ca^{2+} e EROs, com posterior formação dos PTPM, pode levar a alterações no potencial de membrana mitocondrial interferindo no bom funcionamento da célula. Em condições fisiológicas, pequenas oscilações no potencial de membrana mitocondrial ocorrem naturalmente e auxiliam na manutenção da homeostase celular. Contudo, sob estresse essa variação pode extrapolar o limiar fisiológico interferindo diretamente na função da organela. Além disso, a ineficiência celular em manter o potencial de membrana mitocondrial adequado contribui para a desestabilização do potencial de ação do cardiomiócito levando às arritmias cardíacas (AKAR et al., 2005). A literatura vem demonstrando que tanto o desacoplamento (redução do potencial de membrana), quanto a hiperpolarização mitocondrial (aumento no potencial de membrana) interferem na função da organela (LYON et al., 2010; KADENBACH et al., 2011). De fato, Lyon et al. (2010) demonstraram um aumento exacerbado no potencial de membrana mitocondrial após a isquemia cardíaca. Esse mecanismo compensatório inicial resultou numa reduzida síntese de ATP e consequente aumento do estresse oxidativo (LYON et al., 2010). Por outro lado, o desacoplamento mitocondrial tem sido observado em situações crônicas de estresse, como na IC, no qual o déficit energético resultante contribui sobremaneira para a falha na maquinaria contrátil cardíaca (KADENBACH et al., 2011). Além disso, a literatura descreve que o leve desacoplamento mitocondrial parece otimizar o funcionamento mitocondrial (CALDEIRA DA SILVA et al., 2008; CERQUEIRA, LAURINDO, KOWALTOWSKI, 2011). Caldeira da Silva et al. (2008) demonstraram que camundongos tratados com dinitrofenol, um desacoplador mitocondrial, apresentaram um aumento nas taxas respiratórias associado à diminuição na formação de EROs, fatores que contribuíram para um aumento na expectativa de vida desses animais. Nesse sentido, os autores sugerem que o leve desacoplamento mitocondrial constitui uma efetiva estratégia antioxidante (CALDEIRA DA SILVA et al., 2008).

Cabe ressaltar que nenhuma diferença foi observada no potencial de membrana mitocondrial no coração dos animais infartados. Esse resultado isolado poderia sugerir que a mitocôndria cardíaca mantém sua função preservada mesmo após a cirurgia de ligadura da artéria coronária, visto que essa característica interfere na função da organela (KADENBACH et al., 2011). Entretanto, baseado no exposto acima nosso resultado sugere que em estágios

iniciais da disfunção ventricular, mesmo na presença de uma disfunção mitocondrial, o potencial de membrana mitocondrial não sofre prejuízos.

Todas as alterações descritas acima contribuíram para uma redução nos níveis de ATP cardíaco. Esses dados vão ao encontro da literatura e confirmam que a disfunção ventricular prejudica o aparato energético do cardiomiócito, interferindo na oxidação de substratos e na síntese de ATP, o que acaba por levar o coração a um déficit energético (SHAROV et al., 1998; ROSCA et al., 2008; DOENST et al. 2010).

Em conjunto, nossos resultados confirmam a instalação do quadro de disfunção mitocondrial em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio.

6.2.2 Efeitos do treinamento físico aeróbico na função mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Após constatarmos uma disfunção mitocondrial no nosso modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio, demonstramos que o TF foi responsável por promover uma melhora na função mitocondrial no coração dos animais infartados. A prática regular de exercícios físicos, especificamente o exercício aeróbico, tem se mostrado uma excelente medida no combate à lesão cardíaca (ROLIM et al., 2007; SUN et al., 2008; KAVAZIS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; ANTUNES-CORREA et al., 2011). Os mecanismos propostos para explicar os efeitos cardioprotetores do TF são mediados, em parte, por alterações na função mitocondrial que incluem a melhora na fosforilação oxidativa e homeostase redox (ASCENSAO, FERREIRA, MAGALHAES, 2007).

Demonstramos que os animais infartados apresentaram uma restauração da capacidade respiratória após oito semanas de TF, confirmada pela normalização da razão entre os estados respiratórios 3 e 4 quando comparados aos animais controles. Uma série de trabalhos confirma esse efeito positivo do TF na regulação da função mitocondrial cardíaca e descreve que a adaptação ao exercício físico regular envolve a biogênese mitocondrial e a síntese de componentes da CTE com o intuito de apoiar o aumento da demanda energética celular, fator que contribui para a melhora da contratilidade do cardiomiócito (STUEWE et al., 2000; ASCENSAO, FERREIRA, MAGALHAES, 2007; ALBERTO BOVERIS, 2008). De fato, ambos os grupos submetidos ao programa de exercícios físicos apresentaram um aumento no consumo máximo de O_2 mitocondrial nos estados respiratórios 3 e 4, quadro que foi explicado pela maior expressão dos complexos respiratórios identificada no coração dos animais

estudados, fato que pode explicar o aumento na tolerância aos esforços físicos apresentado pelos grupos treinados. Nesse sentido, Navarro et al. (2004) demonstraram em ratos exercitados uma correlação linear entre a atividade do complexo IV da CTE e o sucesso no teste físico na corda bamba (*tightrope test*) (NAVARRO et al., 2004). Este fato associa a qualidade da função mitocondrial com a tolerância aos esforços físicos e confirma o efeito do TF na restauração do dano celular e disfunção fisiológica presentes em diversas patologias.

Durante e após o exercício físico, vários mecanismos estão ativados em diferentes órgãos e sistemas na tentativa de promover a manutenção/restauração da homeostase celular. Agudamente, alterações na concentração intracelular de ATP, reduções no estoque de glicogênio, mudanças na temperatura e pH, perda da homeostase do Ca²⁺ e um desacoplamento na respiração mitocondrial desencadeiam a formação de EROs (PHANEUF, LEEUWENBURGH, 2001; SIU et al., 2004). De fato, o aumento no consumo de O₂ favorece momentaneamente o dano oxidativo celular (ASCENSAO, FERREIRA, MAGALHAES, 2007). Contudo, apesar de induzir a produção de EROs durante sua prática, o exercício físico também é responsável pela ativação aguda do sistema de defesa antioxidante do organismo, o qual é reportado na literatura como sendo um mecanismo de defesa celular em condições de estresse oxidativo. Além disso, tem sido descrito um aumento na síntese de proteínas desacopladoras cardíacas após o TF (BO et al., 2008), situação que pode levar à redução das EROs por meio de uma ligeira dissipação do potencial de membrana mitocondrial, condição denominada leve desacoplamento (CALDEIRA DA SILVA et al., 2008; CERQUEIRA, LAURINDO, KOWALTOWSKI, 2011). Sendo assim, o TF, se sistematizado e praticado corretamente, pode promover efeitos positivos na restauração da homeostase redox (ATALAY, SEN, 1999; FINAUD, LAC, FILAIRE, 2006). Nossos resultados denotam uma redução no estresse oxidativo, representado pela menor formação de H2O2, O2, e produtos derivados da oxidação, e pela restauração da atividade antioxidante nos animais com disfunção ventricular submetidos ao TF. Essa restauração da homeostase redox confirma as importantes adaptações na função mitocondrial cardíaca propiciadas pelo TF na IC (JUDGE, 2005), uma vez que a literatura aponta uma correlação inversa entre a carbonilação de proteínas e a atividade dos complexos respiratórios mitocondriais (ALBERTO BOVERIS, 2008). Dessa forma, o TF tem se mostrado uma ferramenta eficaz no combate ao estresse oxidativo em diversas patologias, incluindo as doenças cardiovasculares (BERTAGNOLLI et al., 2008; XU et al., 2010). Além disso, os grupos submetidos ao TF apresentaram um aumento na formação de H₂O₂ provenientes da inibição dos complexos respiratórios I e III, esse resultado é fruto da biogênese mitocondrial promovida pela prática regular de exercícios

físicos (SUN et al., 2011), visto que, como citado acima, houve um aumento na expressão desses complexos respiratórios após o protocolo experimental.

É importante destacar que a influência positiva do TF sobre a defesa antioxidante ainda é um assunto de intenso debate. Vários estudos examinaram o efeito da prática regular de exercícios físicos na atividade de enzimas antioxidantes, mas devido às variações no desenho experimental, modelo utilizado e procedimentos analíticos, uma grande dispersão nos resultados pode ser observada. No entanto, a maior parte das evidências científicas aponta efeitos benéficos do TF em algum componente enzimático do sistema antioxidante (ATALAY, SEM, 1999; FINAUD, LAC, FILAIRE, 2006; ASCENSAO, FERREIRA, MAGALHAES, 2007). Como descrito nos resultados, encontramos uma redução nos níveis de glutationa oxidada e uma consequente melhora na razão GSH/GSSG nos animais controles submetidos ao TF, fato que contribuiu para uma redução na formação de H₂O₂ nos estados respiratórios mitocondriais quando comparados aos animais saudáveis que permaneceram sedentários. Esse quadro enfatiza a influência benéfica do TF na defesa antioxidante cardíaca e na promoção da saúde global do coração.

Aliado a essas mudanças houve um aumento na taxa de captação máxima de Ca²⁺ mitocondrial. Esse íon pode exercer efeito antagônico na função respiratória mitocondrial. Como detalhado na seção anterior, o acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial pode levar à ruptura da organela, mas por outro lado, a captação moderada de Ca²⁺ pela mitocôndria estimula a ação da piruvato desidrogenase e de enzimas relacionadas ao Ciclo de Krebs, resultando em maior produção de NADH e uma consequente síntese melhorada de ATP (JOUAVILLE et al., 1999; BROOKES et al., 2004). Além disso, tem sido sugerido na literatura que a prática regular de exercícios físicos pode reduzir a suscetibilidade a formação dos PTPM, bem como minimizar os efeitos deletérios do Ca^{2+} na respiração mitocondrial. De fato, Ascensao et al. (2005) demonstraram que quatorze semanas de TF preveniram a formação dos PTPM, a redução na fosforilação oxidativa e a formação de produtos derivados da oxidação em animais tratados com doxorrubicina, um fármaco cardiotóxico utilizado no tratamento contra o câncer. Os autores sugerem que devido ao fato dos PTPM apresentarem etiologia oxidativa, é provável que os efeitos benéficos do TF nessa variável sejam mediados, dentre outros fatores, pela restauração da homeostase redox no cardiomiócito dos animais treinados, contribuindo diretamente para a redução da morte celular programada (ASCENSAO et al., 2005). Nossos resultados demonstram que o aumento do limiar mitocondrial ao Ca²⁺ nos animais submetidos ao TF reflete positivamente na função da organela e auxilia na função contrátil cardíaca, visto que o íon participa efetivamente do processo de contração muscular.

Por fim, todas as alterações benéficas na função mitocondrial promovidas pelo TF contribuíram para a restauração dos níveis energéticos no coração dos animais infartados para valores próximos aos do grupo controle. Apesar de não termos avaliado a curva de sobrevida dos animais estudados, parâmetro mais sensível para descrever os efeitos do envelhecimento e da sobrevivência em condições patológicas, vale destacar que o exercício físico exerce influência direta nesse parâmetro (CHARANSONNEY, 2011). A literatura demonstra que animais submetidos a um programa de TF aumentam em aproximadamente 15% o tempo médio de vida (NAVARRO et al., 2004), e que a prática diária de pelo menos 15 minutos de exercício físico pode elevar a expectativa de vida em até três anos em humanos saudáveis ou portadores de fatores de risco para doenças cardiovasculares (WEN et al., 2011).

Evidências experimentais sugerem que a modulação positiva do TF ocorre em diferentes níveis da organização celular, e que a mitocôndria, organela central do metabolismo energético, representa um importante mediador das perturbações bioquímicas e mecânicas impostas pelo exercício físico (ASCENSAO; FERREIRA; MAGALHAES, 2007). Nesse sentido, nossos resultados confirmam o efeito cardioprotetor do TF nas doenças cardiovasculares, mediado em parte pela restauração da função mitocondrial cardíaca, reforçando a utilização do mesmo como uma terapia não farmacológica adjuvante no tratamento da fisiopatologia cardiovascular.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MITOCONDRIAL CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

6.3.1 Alterações na dinâmica mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Seguindo os objetivos propostos neste projeto, avaliamos a dinâmica mitocondrial cardíaca no coração dos animais infartados. O significado fisiológico dos contínuos processos de fusão/fissão mitocondrial emerge na literatura como um tema atual e relevante. Conservados durante a evolução, esses processos aparecem como um mecanismo de controle de qualidade mitocondrial, atuando na proteção e melhora da saúde mitocondrial. A fusão da

organela permite a troca de DNA e proteínas mitocondriais, com o intuito de reparar a função mitocondrial ao promover a dispersão das mutações e enzimas senescentes por toda a rede. Já a fissão mitocondrial restaura a morfologia da organela e contribui para a manutenção da viabilidade celular ao separar e encaminhar as mitocôndrias filhas danificadas para degradação (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009). Alterações na dinâmica mitocondrial têm sido demonstradas em diversas patologias, incluindo as doenças cardiovasculares (WALLACE, 1999; ZUCHNER et al., 2004; KUJOTH et al., 2005; WANG et al., 2008). De fato, desde os primeiros relatos, a morfologia mitocondrial na IC já era conhecida por suas diferenças e desorganizações. Em diversas etiologias da síndrome é possível observar mitocôndrias desorganizadas e com diferenças em sua área (JONES et al., 1975; BAANDRUP et al., 1981; SHAROV et al., 1998; TARDIFF et al., 1999). Nossos dados vêm acrescentar à literatura a informação de que nos estágios iniciais da IC, quando somente a disfunção ventricular se faz presente, mudanças na forma/dinâmica da organela já ocorrem.

Inicialmente, os resultados relacionados à fusão mitocondrial denotaram um aumento na expressão das mitofusinas 1 e 2, e da OPA1 no coração dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio. A literatura sobre o assunto ainda é restrita, o único trabalho realizado até o momento demonstrou um aumento na expressão da OPA1 em ratos com IC de etiologia isquêmica. Além disso, também foram observados aumentos nos níveis cardíacos das proteínas Mfn1 e Mfn2 em pacientes com cardiomiopatia isquêmica e dilatada (CHEN et al., 2009). Contudo, baseado somente na expressão proteica torna-se difícil traçar uma relação causal entre a dinâmica/função mitocondrial e a progressão das doenças cardiovasculares. Nesse sentido, avaliamos a atividade GTPase específica das mitofusinas e encontramos uma redução em ambas as enzimas no coração dos animais infartados. Recentemente foi demonstrado que a redução na fusão mitocondrial contribui para a piora da função cardíaca através de alterações na morfologia mitocondrial. De fato, Chen, Liu e Dorn II demonstraram que a ablação das mitofusinas em camundongos promoveu uma fragmentação mitocondrial que levou à dilatação cardíaca e consequente IC após oito semanas (CHEN, LIU, DORN II, 2011). Nossos resultados confirmam o envolvimento da fusão mitocondrial no processo de disfunção da organela e sugerem que a redução desse processo, representada pela menor atividade das mitofusinas, contribui para a patologia cardíaca por interferir diretamente na dinâmica mitocondrial.

Em contrapartida à fusão, encontramos um aumento na atividade da principal GTPase envolvida na fissão mitocondrial (Drp1), mesmo na presença de uma redução de sua expressão proteica. Até o presente momento a fissão mitocondrial não foi diretamente observada em cardiomiócitos adultos, no entanto, modelos experimentais demonstram que uma exacerbada fissão da organela contribui para um prejuízo da função celular (ONG et al., 2010; HOM et al., 2010). De fato, Ong et al. (2010) demonstraram que células HL-1 submetidas à isquemia apresentaram uma fragmentação mitocondrial seguida de disfunção da organela e morte celular. Quadro que foi revertido na presença de um inibidor da fissão mitocondrial (ONG et al., 2010). Além disso, cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos tratados com tapsigargina ou cloreto de potássio, responsáveis pelo aumento na concentração de Ca²⁺e formação exacerbada de EROs, sofrem um rápido processo de fissão mitocondrial (HOM et al., 2010). Essas informações corroboram nossos dados e sugerem que a fissão mitocondrial contribui diretamente para o dano no tecido cardíaco em condições estressoras, como na disfunção cardíaca desencadeada pelo infarto do miocárdio.

Conforme descrito nos resultados, encontramos mudanças na morfologia da organela, representado pelo maior número de mitocôndrias com tamanho reduzido no coração dos animais com disfunção cardíaca. Acreditamos que a sobreposição da fissão mitocondrial em detrimento à fusão da organela pode estar associada à essa resposta. Entretanto, não existem trabalhos na literatura traçando uma relação causal entre as proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial e a forma da organela nas doenças cardiovasculares Apenas o trabalho desenvolvido por Chen et al. (2009) correlaciona uma redução na expressão da OPA1 com a fragmentação mitocondrial (aumento na quantidade de mitocôndrias com área reduzida) observada pela técnica de microscopia eletrônica em biópsias cardíacas de humanos que apresentavam cardiomiopatia dilatada de origem isquêmica (CHEN et al., 2009). Além disso, está descrito que a dinâmica mitocondrial parece exercer importante papel na morfologia da organela em células altamente compartimentalizadas, como os mioblastos e os neurônios, no qual mutações nas proteínas relacionadas aos processos de fusão/fissão resultam em alterações no fenótipo mitocondrial (LI et al., 2004; VERSTREKEN et al., 2005). Nesse sentido, trabalhos que estudem as diferentes fases da progressão da IC, bem como as diferentes etiologias, são necessários para estabelecer uma melhor relação entre a atividade das GTPases e os processos de fusão e fissão mitocondrial.

Tradicionalmente, e como demonstrado neste projeto, a maior parte do conhecimento sobre a morfologia mitocondrial deriva de imagens de microscopia eletrônica (HOM, SHEU, 2009), entretanto, esse método fornece apenas um instante no tempo e espaço, não permitindo a visualização direta da dinâmica mitocondrial. Recentemente, novas técnicas tem sido desenvolvidas com o intuito de otimizar o monitoramento dos processos de fusão e fissão mitocondrial (TWIG et al., 2006; HUANG, CHOI, FROHMAN, 2010). Contudo, essa
monitoração *in vitro* foi realizada apenas em cultura de células, e futuras pesquisas são necessárias com o intuito de permitir um rastreamento fiel da morfologia mitocondrial no contexto das doenças cardiovasculares.

Associado às mudanças descritas até o momento, uma baixa expressão dos componentes da via de biogênese mitocondrial tem sido relatada nas doenças cardiovasculares. De fato, uma redução na expressão cardíaca de fatores de transcrição mitocondriais, bem como uma diminuição de enzimas da CTE e do Ciclo de Krebs, foi encontrada em diversos modelos experimentais (GARNIER et al., 2003; SUN et al., 2007; WATSON et al., 2007). Em contraste, os prejuízos mitocondriais iniciais têm sido associados a uma proliferação da organela nas cardiomiopatias, tanto em humanos, quanto em modelos experimentais. Por exemplo, Sebastiani et al. (2007) encontraram um aumento na proliferação da organela associada à um desarranjo miofibrilar em biópsias cardíacas de pacientes com doenças cardiovasculares de diferentes etiologias (SEBASTIANI et al., 2007). Essa resposta também foi encontrada em diversos modelos experimentais de cardiomiopatia associados à ablação de importantes enzimas e componentes mitocondriais (LI et al., 1995; GRAHAM et al., 1997), tais como o fator de transcrição mitocondrial A, responsável pela transcrição de genes mitocondriais advindos tanto da organela, quanto do núcleo celular (HANSSON et al., 2004). Nesse modelo, o aumento da massa cardíaca foi acompanhado por uma redução no DNA mitocondrial, interferindo diretamente no funcionamento da CTE e comprometendo o metabolismo energético (HANSSON et al., 2004). Por outro lado, a superexpressão do fator de transcrição mitocondrial PGC1-a (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma) resultou num aumento exacerbado do número e tamanho das mitocôndrias no miocárdio de camundongos associados à perda da estrutura sarcomérica, fatores que contribuíram para o desenvolvimento de uma cardiomiopatia dilatada (RUSSEL et al., 2004). Esses dados corroboram nossos resultados e indicam que prejuízos na função mitocondrial não podem ser compensados pelo aumento no número de mitocôndrias, e que um balanço apropriado na estrutura da organela se faz necessário para a manutenção da homeostase cardíaca.

A requisição energética cardíaca não está relacionada somente à morfologia mitocondrial, mas também à organização estrutural da organela, representada pela densidade, e sua localização. Em função da contínua demanda de ATP, cardiomiócitos adultos apresentam mitocôndrias extremamente densas quando comparados a outros tecidos, uma vez que além de participar efetivamente da síntese de ATP via fosforilação oxidativa, a organela está envolvida na sinalização do Ca²⁺, proliferação celular e apoptose (McBRIDE,

NEUSPIEL, WASIAK, 2006). Nesse sentido, a literatura relata que uma redução na densidade mitocondrial contribui para o prejuízo na função da organela em diferentes modelos de doenças cardiovasculares (BAANDRUP et al., 1981; SCHOLZ, DIENER, SCHAPER, 1994; SHAROV et al., 1998; ROSCA et al., 2008). De fato, Lukyanenko (2007) descreve que uma das alterações ultraestruturais que acompanha o tecido cardíaco na IC é uma redução na densidade mitocondrial (LUKYANENKO, 2007). E conforme descrito nos resultados, os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram uma menor densidade mitocondrial quando comparados ao grupo controle, inferindo que o aumento no número de mitocôndrias apresentado por esses animais não foi acompanhado de um conteúdo proteico apropriado capaz de preservar a função da organela.

Em conjunto, nossos dados demonstram uma contribuição da dinâmica mitocondrial na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Sendo assim, futuras estratégias terapêuticas que inibam a fissão mitocondrial ou ativem a fusão da organela poderão exercer grande impacto na redução dos efeitos deletérios mitocondriais na disfunção cardíaca.

6.3.2 Efeitos do treinamento físico aeróbico na dinâmica mitocondrial cardíaca em modelo animal de disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio

Depois de verificarmos que a disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio é acompanhada de alterações na dinâmica mitocondrial cardíaca, investigamos o efeito do TF nessa variável. É importante salientar que, como dito anteriormente, a participação efetiva dos processos de fusão e fissão mitocondriais no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, bem como após o TF, ainda não foi descrita na literatura devido à falta de métodos bioquímicos capazes de quantificar as frequências com que esses processos ocorrem *in vivo*. Conforme demonstramos nos resultados, constatamos que o TF foi capaz de normalizar a expressão proteica das GTPases Mfn1, Mfn2, OPA1 e Drp1 nos animais infartados, para valores próximos aos do grupo controle. Além disso, houve um aumento na atividade da Mfn1, acompanhada de uma redução na fissão da organela. Acreditamos que essas respostas estão diretamente relacionadas à restauração do fenótipo da organela, representada por uma redução no número de mitocôndrias com um aumento em sua área. De fato, sabemos que tanto a inibição da fissão mitocondrial, alcançada por meio da utilização de fármacos (ONG et al., 2010), quanto uma maior atividade da fusão da organela obtida com animais e/ou células

geneticamente modificadas (CHEN, LIU, DORN II, 2011), contribui para a restauração da rede mitocondrial e consequente melhora de sua função. Nesse sentido, o TF pode estar atuando de maneira semelhante a essas situações experimentais, cumprindo seu efeito cardioprotetor através da reorganização do número, tamanho e densidade mitocondrial.

Outro fator relacionado aos efeitos desencadeados pelo TF na morfologia e estrutura mitocondrial envolve o processo de biogênese. A biogênese mitocondrial, um processo complexo que abrange vários mecanismos responsáveis pela síntese e estruturação dos componentes da organela, controla o número de mitocôndrias e determina a produção celular de energia (LI et al., 2011). Já foi confirmado diversas vezes na literatura que o TF promove um aumento na biogênese mitocondrial na musculatura esquelética (WRIGHT et al., 2007; LI et al., 2011). Entretanto, devido à pouca atenção destinada ao músculo cardíaco, ainda não existe um consenso sobre os efeitos do TF na biogênese mitocondrial no coração. A discrepância nos dados da literatura pode ser atribuída aos variados protocolos de exercício físicos utilizados, bem como às diferentes metodologias empregadas. Eisele et al. (2008) não encontraram alterações na biogênese mitocondrial no coração de camundongos submetidos a quatro semanas de atividade física voluntária (EISELE et al., 2008), mesma resposta observada em camundongos após doze semanas de TF em esteira rolante (LI et al., 2011). Por outro lado, recentes trabalhos demonstraram que o TF exerce significante efeito na síntese mitocondrial cardíaca (QI et al., 2011; BUDIONO et al., 2012). De fato, Budiono et al. (2012) observaram que sete dias de corrida voluntária em camundongos foram suficientes para desencadear um aumento na biogênese mitocondrial. Os autores inferem que a promoção da síntese mitocondrial exerce papel fundamental na fisiologia cardíaca, uma vez que além de suportar incrementos na demanda metabólica, ainda protege o tecido cardíaco (BUDIONO et al., 2012). Considerando que a biogênese mitocondrial envolve a coordenação de diferentes eventos celulares, a simples avaliação da expressão gênica ou proteica de fatores de transcrição que codificam proteínas mitocondriais, como o PGC1-a, pode superestimar o processo como um todo. Nesse sentido, uma interpretação cautelosa dos resultados se faz necessária. Nossos resultados demonstram que oito semanas de TF foram capazes de restaurar a densidade mitocondrial nos animais com disfunção cardíaca e aumentar a área e número de mitocôndrias nos animais controles submetidos ao TF, contribuindo para a melhor capacidade aeróbica cardíaca.

Por fim, mas não menos importante, os animais controles submetidos ao TF apresentaram uma redução na atividade da fissão mitocondrial, associada a um aumento na densidade da organela e modificações em sua forma, representadas por um aumento, tanto no

número, quanto no tamanho das mitocôndrias SHAM-TF. Sabemos que a forma/estrutura mitocondrial precisa acompanhar a demanda metabólica do cardiomiócito na tentativa de cumprir a exigência energética celular para um bom funcionamento da bomba cardíaca. Nesse sentido, nossos resultados confirmam o papel benéfico do TF na fisiologia cardíaca e sugerem que a morfologia da organela exerce papel crucial nessas adaptações. Contudo, não está claro na literatura quando alterações fisiológicas cardíacas vêm acompanhadas de um aumento na biogênese ou simples reorganização mitocondrial.

Nossos achados mostram uma correlação positiva entre a prática regular de exercícios físicos e a restauração da morfologia mitocondrial, por meio de alterações em sua dinâmica na disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio. Entretanto, até o presente momento, não se havia demonstrado uma relação mais estreita entre o TF e os processos de fusão e fissão mitocondriais cardíaca, quadro que contribui para a função da organela e melhora da contratilidade cardíaca.

6.4 RELAÇÃO FUNÇÃO-DINÂMICA MITOCONDRIAL CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Em adição à primordial geração de ATP, a mitocôndria abriga vários processos metabólicos e participa de uma série de vias regulatórias no contexto celular (MITCHELL, MOYLE, 1967; COLOMBINI, 1987). Esse amplo papel mitocondrial é facilitado pela compartimentalização altamente regulada da organela no tecido cardíaco (ROSCA, HOPPEL, 2010). A literatura atual tem destinado merecida atenção à dinâmica mitocondrial em células e na fisiologia animal. Em função da constante fusão e fissão da organela, uma perda da homeostase entre esses dois processos altera consideravelmente a morfologia mitocondrial (BEREITER-HAHN, VOTH, 1994). De fato, foi demonstrado que regulação da forma e estrutura mitocondrial desempenha importante ação na função da organela, assim como na morte celular programada (CHEN, CHAN, 2005; WALLACE, 2005).

Trabalhos demonstram que as EROs podem iniciar diretamente a fragmentação mitocondrial em diferentes tipos celulares (JENDRACH et al., 2008; JOU, 2008; KNOTT et al., 2008). Sabe-se que em células endoteliais coronárias a produção exacerbada de O_2^- pode resultar em fragmentação mitocondrial liderada pelo aumento na fissão (OGATA et al., 2000; ALI, MUNGAI, SCHUMACKER, 2006), e que uma diminuição na concentração desse

radical livre pode restaurar as mudanças morfológicas mitocondriais, auxiliando na melhora de sua função e da viabilidade celular (MAKINO, SCOTT, DILLMANN, 2010). Dorn II et al. (2011) reportam que a cardiomiopatia causada pelo prejuízo na fusão mitocondrial em moscas geneticamente modificadas resulta, em parte, da exacerbada produção mitocondrial de EROs, mas que o estresse oxidativo não é a única causa da fragmentação mitocondrial (DORN II et al., 2011). Contudo, os mecanismos detalhados ainda não foram esclarecidos. O aumento na formação de H_2O_2 e O_2^- , aliado ao aumento no número de mitocôndrias com área e densidade reduzidas, encontrada no grupo disfunção cardíaca sugere que a concentração de EROs atua na regulação direta do fenótipo da organela, reforçando a cardiomiopatia presente nesses animais. Além disso, a restauração da morfologia mitocondrial associada à diminuição do estresse oxidativo após o TF mostra que, de modo inverso, a formação de EROs mitocondriais pode ser determinada pela dinâmica da organela. De fato, Yu, Robotham e Yoon (2006) observaram que a inibição da fissão mitocondrial revoga a produção de EROs e previne a permeabilização da membrana mitocondrial e a consequente liberação do citocromo c em células expostas à altas concentrações de glicose (YU et al., 2006). Em conjunto, esses dados sugerem que a regulação da morfologia mitocondrial representa um importante alvo terapêutico na prevenção do estresse oxidativo em condições patológicas.

O prejuízo na fusão mitocondrial em cardiomiócitos de camundongos, por meio da ablação das mitofusinas, foi acompanhado de uma redução na respiração mitocondrial estimulada por ADP (Estado 3) e no consumo máximo de O_2 sob desacoplamento da organela, revelando que a fusão mediada pela Mfn1 e Mfn2 é essencial para a manutenção da função respiratória e contratilidade cardíaca (CHEN, LIU, DORN II, 2011). O fato dos nossos animais infartados terem apresentado uma redução na atividade das GTPases de fusão mitocondrial, Mfn1 e Mfn2 no coração, pode estar associado aos prejuízos encontrados na fosforilação oxidativa da organela, contribuindo para o agravamento da disfunção cardíaca.

A partir do momento que a dinâmica mitocondrial permite a troca/dispersão de DNA e proteínas mitocondriais, sua manutenção pode interferir nas taxas de transporte e entrega desses componentes em diferentes áreas da célula (LIESA, PALACIN, ZORZANO, 2009). De fato, a literatura reporta que a oferta de ATP para regiões celulares com alta demanda energética também depende do rearranjo dinâmico mitocondrial, além do transporte da organela através do citoesqueleto celular (VARADI et al., 2004). Benard et al. (2007) sugerem que a relação entre a rede de organização e a bioenergética mitocondrial é bidirecional, uma vez que tanto a fissão mitocondrial levou à um déficit energético, como a redução na síntese do ATP, mediada pela inibição do Complexo I da CTE, promoveu

perturbações na dinâmica da organela em células (BENARD et al., 2007). Contudo o exato mecanismo desta relação ainda não foi esclarecido. Nesse contexto, nossos dados sugerem que o conteúdo energético celular interfere na dinâmica mitocondrial na disfunção cardíaca, e vice-versa.

A sinalização do Ca²⁺ é de vital importância para o funcionamento celular e desempenha um papel fundamental nas doenças cardiovasculares. A liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático é a base para a fisiologia da contração cardíaca, contudo, a regulação do transiente de Ca²⁺ intracelular também conta com a liberação do íon através do sarcolema e/ou seu consumo pela mitocôndria (EISNER et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que a conexão entre o retículo sarcoplasmático e a mitocôndria é mediada pela proteína de fusão mitocondrial Mfn2, e que o vínculo retículo sarcoplasmático-mitocôndria afeta a sinalização de Ca²⁺ e a amplificação dos sinais apoptóticos (DE BRITO, SCORRANO, 2008). De fato, a ausência da Mfn2 prejudica diretamente o consumo de Ca²⁺ mitocondrial fisiológico, ocasionado pela baixa liberação do íon pelo retículo para a organela, com consequente redução nos níveis energéticos da célula (DE BRITO, SCORRANO, 2008). Por outro lado, a superexpressão da Mfn2 induz apoptose em células do músculo liso vascular, provavelmente pela ligação excessiva entre as duas organelas resultando numa alta transferência de Ca²⁺ (GUO et al., 2007). Conforme demonstramos nos resultados, os animais infartados apresentaram um aumento no transiente de Ca²⁺ cardíaco associado a uma redução na atividade da Mfn2. Sabendo que a produção cardíaca de ATP e a sinalização de Ca²⁺ no cardiomiócito requerem uma relação coordenada entre a mitocôndria e o retículo sarcoplasmático, e que esta relação é mediada pela Mfn2, podemos sugerir que a dinâmica mitocondrial participa ativamente da função contrátil cardíaca, contribuindo para a fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Esses dados sugerem um papel da Mfn2 independente, ou em adição, à fusão mitocondrial. No entanto, esse quadro precisa ser melhor investigado no tecido cardíaco, uma vez que alguns trabalhos experimentais demonstram que a interação mitocôndria-retículo sarcoplasmático mediada pela Mfn2 não é essencial para o funcionamento normal do coração (CHEN, LIU, DORN II, 2011).

Dessa forma, nossos dados mostram uma relação entre a função e a dinâmica mitocondrial cardíaca no coração de animais com disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio, sugerindo que alterações nessas características possam estar envolvidas na progressão das doenças cardiovasculares. Sabendo que nossos resultados são associativos, demonstrar uma relação de causa-efeito entre a função/dinâmica mitocondrial nas doenças cardiovasculares passa a ser fundamental para a validação das respostas encontradas neste

estudo. Nesse sentido, a utilização de animais transgênicos, que apresentam deleção individual ou combinada dos genes das GTPases envolvidas na dinâmica mitocondrial, representa uma importante ferramenta de estudos e poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na interelação função/dinâmica mitocondrial na progressão da disfunção cardíaca, bem como na resposta ao TF.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o prejuízo no metabolismo energético oriundo da disfunção mitocondrial, acompanhado pela perda da homeostase redox, contribui sobremaneira para o agravamento da disfunção cardíaca associada ao infarto do miocárdio. Além disso, alterações nos processos de fusão e fissão mitocondrial, aliadas às modificações na forma e estrutura da organela, parecem afetar a bioenergética celular, comprometendo o bom funcionamento da bomba cardíaca. E com base nos resultados, podemos afirmar que o TF, utilizado atualmente como estratégia terapêutica não farmacológica na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, é capaz de reverter o fenótipo mitocondrial e aumentar a função cardíaca dos animais infartados. A reversão do fenótipo mitocondrial foi mediada pelas alterações positivas na função-dinâmica mitocondrial cardíaca. Dessa forma, concluímos que a mitocondriopatia cardíaca exerce importante papel na progressão da disfunção cardíaca de função contrátil do miocárdio. Sendo assim, encontrar a maneira mais efetiva de modular a função-dinâmica mitocondrial nas doenças cardiovasculares representa um importante passo para o futuro das pesquisas no tratamento da síndrome.

8. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHMED, A.; ARONOW, W. S.; FLEG, J.L. Higher New York Heart Association classes and increased mortality and hospitalization in patients with heart failure and preserved left ventricular function. **American Heart Journal**, St. Louis, v. 151, n. 2, p. 444-450, 2006.

AKAR, F. G. et al. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 115, n. 12, p. 3527-3535, 2005.

ALBERTO BOVERIS, A. N. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. Free Radical Biology and Medicine, New York, v. 44, p. 224-229, 2008.

ALEXANDER, C. et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. **Nature Genetics**, New York, v. 26, n. 2, p. 211-215, 2000.

ALI, M. H.; MUNGAI, P. T.; SCHUMACKER, P. T. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 291, n. 1, p. L38-45, 2006.

ANDERSON, E. J.; KATUNGA, L. A.; WILLIS, M. S. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. **Clinical and Experimental and Pharmacology and Physiology**, Melbourne, v. 39, n. 2, p. 179-193, 2012.

ANESTI, V.; SCORRANO, L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, n. 5-6, p. 692-699, 2006.

ANTONY, J. M. et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. **Nature Neurosciences**, New York, v. 7, n. 10, p. 1088-1095, 2004.

ANTUNES-CORREA, L. M. et al. Exercise training improves neurovascular control and functional capacity in heart failure patients regardless of age. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, London, 2011.

ASCENSAO, A.; FERREIRA, R.; MAGALHAES, J. Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. International Journal of Cardiology, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 16-30, 2007.

ASCENSAO, A. et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. American Journal of Physiology. Heart and Circulatoy Physiology, Bethesdal, v. 289, n. 2, p. H722-731, 2005.

ASHRAFIAN, H.; KFRENNEAUX, M. P. Metabolic modulation in heart failure: the coming of age. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, Norwell, v. 21, n. 1, p. 5-7, 2007.

ATALAY, M.; SEN, C. K. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 874, p. 169-177, 1999.

BAANDRUP, U. et al. Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy. A semiquantitative study in 48 patients. **Circulation**, Dallas, v. 63, n. 6, p. 1289-1298, 1981.

BACURAU, A. V. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 106, n. 5, p. 1631-1640, 2009.

BALCI, S. S. et al. Changes in lipid peroxidation and antioxidant capacity during walking and running of the same and different intensities. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Champaign, v. 2, n. 9, p. 2545-2550, 2010.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 31, n. 4, p. 347-366, 1999.

BATANDIER, C., E. et al. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. Journal of Cellular and Molecular Medicine, Bucharest, v. 6, n. 2, p. 175-187, 2002.

BEER, M., T. et al. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 40, n. 7, p. 1267-1274, 2002.

BELCH, J. J. et al. Oxygen free radicals and congestive heart failure. **British Heart Journal**, London, v. 65, n. 5, p. 245-248, 1991.

BENARD, G. et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **Journal** of Cell Science, Cambridge, v. 120, n. Pt 5, p. 838-848, 2007.

BENARD, G., N. et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. Journal of Cell Science, Cambridge, v. 120, n. 5, p. 838-848, 2007.

BENITO, B.; NATTEL, S. Exercise training as a treatment for heart failure: potential mechanisms and clinical implications. **The Journal of Physiology**, London, v. 587, n. Pt 21, p. 5011-5013, 2009.

BERTAGNOLLI, M., P. C. et al. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 11, p. 1188-1193, 2008.

BO, H. et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. Free Radical Biology and Medicine, New York, v. 44, n. 7, p. 1373-1381, 2008.

BROOKES, P. S. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. American Journal of Physiology. Cell Physiology, Bethesda, v. 287, n. 4, p. C817-833, 2004.

BEREITER-HAHN, J. Behavior of mitochondria in the living cell. **International Review of Cytology**, New York, v. 122, p. 1-63, 1990.

BEREITER-HAHN, J.; VOTH, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 27, n. 3, p. 198-219, 1994.

BRUM, P. C. et al. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 44, n. 9, p. 827-835, 2011.

BRUM, P. C. et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **Anais da Acaddemia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 485-503, 2006.

BUDIONO, B. P. et al. Voluntary running in mice beneficially modulates myocardial ischemic tolerance, signaling kinases, and gene expression patterns. American Journal of **Physiology. Regulatory Integrative Comparative Physiology**, Bethesda, v. 302, n. 9, p. R1091-1100, 2012.

CALDEIRA DA SILVA, C. C. et al. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 552-560, 2008.

CAMPOLO, J. et al. Blood glutathione as independent marker of lipid peroxidation in heart failure. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 45-50, 2007.

CANCHERINI, D. V.; QUELICONI, B. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K+ channel activity in isolated heart mitochondria. **Cardiovascular Research**, London, v. 73, n. 4, p. 720-728, 2007.

CARLUCCI, A.; LIGNITTO, L.; FELICIELLO, A. Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 18, n. 12, p. 604-613, 2008.

CEREGHETTI, G. M. et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 41, p. 15803-15808, 2008.

CERQUEIRA, F. M.; LAURINDO, F. R.; KOWALTOWSKI, A. J. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e18433, 2011.

CHARANSONNEY, O. L. Physical activity and aging: a life-long story. **Discovery Medicine**, Timonium, v. 12, n. 64, p. 177-185, 2011.

CHATTERJEE, K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. **American Journal of Cardiology**, Dallas, v. 95, n. 9A, p. 8B-13B, 2005.

CHEN, H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 160, n. 2, p. 189-200, 2003.

CHEN, H., M. et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 2, p. 280-289, 2010.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14 Special, n. 2, p. R283-289, 2005.

CHEN, L. et al. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. Cardiovascular Research, London, v. 84, n.1, p. 91-9, 2009.

CHEN, Y.; LIU, Y.; DORN II, G. W. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. **Circulation Research**, Baltimore, v. 109, n. 12, p. 1327-1331, 2011.

COLOMBINI, M. Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, New York, v. 19, n. 4, p. 309-320, 1987.

COLUCCI, W. S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. **Clinical Cardiolology**, New York, v. 21, n. 12 Suppl 1, p. I20-24, 1998.

CONN EH, W. R.; WILLIAMS, R. S.; WALLACE, A. G. Exercise responses before and after physical conditioning in patients with severely depressed left ventricular function. **American Journal of Cardiology**, Dallas, v. 49, p. 296-300, 1982.

CRIBBS, J. T.; STRACK, S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. **European Molecular Biology Organization Reports**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 939-944, 2007.

DA SILVA, M. M. et al. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H2O2 release, and enhances K+ transport. **American Journal of Physiology**. **Heart and Circulatoy Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 1, p. H154-162, 2003.

DAI, D. F. et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. **Circulation**, Dallas, v. 119, n. 21, p. 2789-2797, 2009.

DAVIES, V. J. et al. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1307-1318, 2007.

DE BRITO, O. M.; SCORRANO L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. **Nature**, London, v. 456, n. 7222, p. 605-610, 2008.

DESAI, K. H. et al. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. **272**, n. 2 Pt 2, p. H1053-1061, 1997.

DI LISA, F.; BERNARDI, P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 184, n. 1-2, p. 379-391, 1998.

DOENST, T. et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. **Cardiovascular Research**, London, v. 86, n. 3, p. 461-470, 2010.

DORN II, G. W. et al. MARF and Opa1 control mitochondrial and cardiac function in Drosophila. **Circulation Research**, Baltimore, v. 108, n. 1, p. 12-17, 2011.

DYER, A. R. et al. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 112, n. 6, p. 736-749, 1980.

EISELE, J. C. et al. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. **Basic Research in Cardiology**, Darmstadt, v. 103, n. 1, p. 12-21, 2008.

EISNER, D. A. et al. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. **Circulation Research**, Baltimore, v. 87, n. 12, p. 1087-1094, 2000.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, Newark, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERREIRA, J. C. B. et al. Protein Quality Control Disruption by PKCbetaII in Heart Failure; Rescue by the Selective PKCbetaII Inhibitor, betaIIV5-3. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33175, 2012.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FIGUEROA, M. S.; PETERS, J. I. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. Respiratory Care, Philadelphia, v. 51, n. 4, p. 403-412, 2006.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, Auckland, v. 36, n. 4, p. 327-358, 2006.

FORNAZARI, M. et al. Redox properties of the adenoside triphosphate-sensitive K+ channel in brain mitochondria. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 86, n. 7, p. 1548-1556, 2008.

FRAGA, R. et al. Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol. **European Journal of Heart Failure**, Amsterdam, v. 9, n. 6-7, p. 630-636, 2007.

FRANK, S. et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 1, n. 4, p. 515-525, 2001.

FREDERICK, R. L.; SHAW, J. M.. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. **Traffic**, Copenhagen, v. 8, n. 12, p. 1668-1675, 2007.

FRIGERIO, M.; ROUBINA, E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. American Journal of Cardiology, Dallas, v. 96, n. 12A, p. 10L-18L, 2005.

FRIGUET, B.; BULTEAU, A. L.; PETROPOULOS, I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. **Biotechnology Journal**, Weinheim, 3(6): 757-764, 2008.

FUJITA, M. et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatoy Physiology**, Bethesda, v. 292, n. 4, p. 04-2008, 2007.

GARNIER, A. et al. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. **Journal of Physiology**, Bethesda, v. 551, n. Pt 2, p. 491-501, 2003.

GHEORGHIADE, M.; BONOW, R. O. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. **Circulation**, Dallas, v. 97, n. 3, p. 282-289, 1998.

GILLMAN, M. W. et al. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. **American Heart Journal**, St. Louis, v. 125, n. 4, p. 1148-1154, 1993.

GOMEZ, L. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. **Cardiovascular Research**, London, v. 83, n. 2, p. 226-233, 2009.

GOTTLIEB, R. A.; GUSTAFSSON, A. B. Mitochondrial turnover in the heart. **Biochimica** et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1813, n. 7, p. 1295-1301, 2011.

GRAHAM, B. H. et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. **Nature Genetics**, New York, v. 16, n. 3, p. 226-234, 1997.

GROC, L. et al. Lipid peroxidation-mediated oxidative stress and dopamine neuronal apoptosis in the substantia nigra during development. **Neurochemistry Internationl**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 127-133, 2001.

GUATIMOSIM, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 5, p. C1327-1339, 2001.

GUILLERY, O. et al. Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 319-330, 2008.

GUO, X. et al. Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway. **Circulation Research**, Baltimore, v. 101, n. 11, p. 1113-1122, 2007.

HALES, K. G.; FULLER, M. T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. **Cell**, Cambridge, v. 90, n. 1, p. 121-129, 1997.

HAN, X. J. et al. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. Journal of Cell Biology, New York, v. 182, n. 3, p. 573-585, 2008.

HANSSON, A. et al. A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 9, p. 3136-3141, 2004.

HASENFUSS, G.; PIESKE, B. Calcium cycling in congestive heart failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Cincinati, v. 34, n. 8, p. 951-969, 2002.

HAUSENLOY, D. J.; RUIZ-MEANA, M. Not just the powerhouse of the cell: emerging roles for mitochondria in the heart. **Cardiovascular Research**, London, v. 88, n. 1, p. 5-6, 2010.

HOEKSTRA, J. G. et al. Mitochondrial therapeutics in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Alzheimer's Research Therapy, London, v. 3, n. 3, p. 21, 2011.

HOM, J.; SHEU, S. S. Morphological dynamics of mitochondria: a special emphasis on cardiac muscle cells. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Cincinati, v. 46, n. 6, p. 811-820, 2009.

HOM, J., T. Yu, et al. Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca^{2+} in rat ventricular myocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1797, n. 6-7, p. 913-921, 2010.

HUANG, H.; CHOI, S. Y.; FROHMAN, M. A. A quantitative assay for mitochondrial fusion using Renilla luciferase complementation. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 559-566, 2010.

JAMES, D. I. et al. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 38, p. 36373-36379, 2003.

JAVADOV, S. et al. Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemiareperfusion versus carcinogenesis. **Cell Physiology and Biochemistry**, New York, v. 27, n. 3-4, p. 179-190, 2011.

JENDRACH, M. et al. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 293-304, 2008.

JONES, M., V. J. et al. Ultrastructure of crista supraventricularis muscle in patients with congenital heart diseases associated with right ventricular outflow tract obstruction." **Circulation**, Dallas, v. 51, n. 1, p. 39-67, 1975.

JORGE, L. et al. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. **European Heart Journal**, London, v. 32, n. 7, p. 904-912, 2011.

JOU, M. J. Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 60, n. 13-14, p. 1512-1526, 2008.

JOUAVILLE, L. S. et al. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 24, p. 13807-13812, 1999.

JUDGE, S. J. et al. Exercise by lifelong voluntary Wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative Comparative Physiology**, Bethesda, v. 289, p. 1564–1572, 2005.

KADENBACH, B. et al. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 700-706, 2011.

KANNEL, W. B. et al. Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. **American Heart Journal**, St. Louis, v. 113, n. 6, p. 1489-1494, 1987.

KARNOVSKY, M. J. The Localization of Cholinesterase Activity in Rat Cardiac Muscle by Electron Microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 23, p. 217-232, 1964.

KAVAZIS, A. N. et al. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatoy Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 1, p. H144-152, 2009.

KEMI, O. J.; WISLOFF, U. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 2-11, 2010.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. W.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Britsh Journal of Cancer**, London, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KNOTT, A. B. et al. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 9, n. 7, p. 505-518, 2008.

KOOPMAN, W. J. et al. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 289, n. 4, p. C881-890, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Radical Biology** and Medicine, New York, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

KUJOTH, G. C. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. **Science**, London, v. 309, n. 5733, p. 481-484, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, et al. Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. **Basic Research in Cardiology**, Darmstadt, v. 106, n. 6, p. 1221-1234, 2011.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, New York, v. 11, n. 4, p. 376-381, 1995.

LI, Z. et al. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. **Cell**, Cambridge, v. 119, n. 6, p. 873-887, 2004.

LIESA, M.; PALACIN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 799-845, 2009.

LIM, K. L. et al. Mitochondrial Dynamics and Parkinson's disease - Focus on Parkin. Antioxidants & Redox Signaling, Larchmont, v. 16, n. 9, p. 935-49, 2011.

LUKYANENKO, V. Delivery of nano-objects to functional sub-domains of healthy and failing cardiac myocytes. **Nanomedicine**, London, v. 2, n. 6, p. 831-846, 2007.

LYON, A. R. et al. Optical imaging of mitochondrial function uncovers actively propagating waves of mitochondrial membrane potential collapse across intact heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Cincinati, v. 49, n. 4, p. 565-575, 2010.

MAKINO, A.; SCOTT, B. T.; DILLMANN, W. H. Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 53, n. 8, p. 1783-1794, 2010.

MALLAT, Z. et al. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 97, n. 16, p. 1536-1539, 1998.

McBRIDE, H.; SOUBANNIER, V. Mitochondrial function: OMA1 and OPA1, the grandmasters of mitochondrial health. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 6, p. R274-276, 2010.

McBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Current Biology**, London, v. 16, n. 14, p.R551-560, 2006.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MERIS, A. et al. Left atrial remodelling in patients with myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both: the VALIANT Echo study. **European Heart Journal**, London, v. 30, n. 1, p. 56-65, 2009.

MITCHELL, P.; MOYLE J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. **Nature**, London, v. 213, n. 5072, p. 137-139, 1967.

NAVARRO, A. et al. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 286, n. 3, p. R505-511, 2004.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. Free Radical Research, London, v. 44, n. 10, p. 1125-1171, 2010.

NIKI, E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. **Biofactors**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 171-180, 2008.

NISHI, I., S. Kawano, et al. Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats. **Heart and Vessels**, Tokyo, v. 21, n. 4, p. 251-255, 2006.

NOJIRI, H. et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 44, p. 33789-33801, 2006.

NYSTROM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **European Molecular Biology Organization Journal**, London, v. 24, n. 7, p. 1311-1317, 2005.

O'ROURKE, B. Mitochondrial ion channels. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 69, p. 19-49, 2007.

OGATA, N. et al. Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells. **Cardiovascular Research**, London, v. 45, n. 2, p. 513-521, 2000.

OLIVEIRA, R. S. et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. **The Journal of Physiology**, London, v. 587, n. Pt 15, p. 3899-3910, 2009.

OLIVETTI, G. et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Circulation Research**, Baltimore, v. 68, n. 3, p.856-869, 1991.

ONG, S. B. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, Dallas, v. 121, n. 18, p. 2012-2022, 2010.

ORENSTEIN, T. L. et al. Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 96, n. 2, p. 858-866, 1995.

PALANIYANDI, S. S. et al. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. **Drug Discovery Today. Disease Mechanisms**, Oxford, v. 7, n. 2, p. e95-e102, 2010.

PARRA, V. et al. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. **Cardiovascular Research**, London, v. 77, n. 2, p. 387-397, 2008.

PFEFFER, M. A. et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circulation Research**, Baltimore, v. 44, n. 4, p. 503-512, 1979.

PHANEUF, S.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise, Madison, v. 33, n. 3, p. 393-396, 2001.

PICH, S. et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 1405-1415, 2005.

PINA, I. L.; DAOUD, S. Exercise and heart failure. **Minerva Cardioangiologica**, Torino, v. 52, n. 6, p. 537-546, 2004.

QI, Z. et al. Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e21140, 2011.

REITHMANN, C.; WERDAN, K. Noradrenaline-induced desensitization in cultured heart cells as a model for the defects of the adenylate cyclase system in severe heart failure. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlim, v. 339, n. 1-2, p. 138-144, 1989.

REMO, E. F. Heart failure management. Prevention of pulmonary edema is essential. Advance for Nurse Practitioners, King of Prussia, v. 13, n. 12, p. 27-28, 2005.

ROLIM, N. P. et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca2+ handling protein expression in heart failure. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 29, n. 3, p. 246-252, 2007.

ROSCA, M. G. et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. **Cardiovascular Research**, London, v. 80, n. 1, p. 30-39, 2008.

ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 41, n. 2, p. 107-112, 2009.

_____. Mitochondria in heart failure. Cardiovascular Research, London, v. 88, n. 1, p. 40-50, 2010.

ROSSI, C. S.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of Respiratory Stimulation, Accumulation of Ca++ and Phosphate, and Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 239, p. 3971-3980, 1964.

ROVEDA, F. et al. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. Journal of the American College of Cardiology, New York, v. 42, n. 5, p. 854-860, 2003.

RUSSELL, L. K. et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. **Circulation Research**, Baltimore, v. 94, n. 4, p. 525-533, 2004.

RUBIM, V. S. et al. Prognostic value of the Six-Minute Walk Teste in heart failure. Arquivos Brasileiros de cardiologia, São Paulo, v. 86, n. 2, p. 120-5,2006.

SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, Dallas, v. 58, n. 6, p. 1072-1083, 1978.

SANTEL, A., S. et al. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 116, n. 13, p. 2763-2774, 2003.

SANTOS, R. A. et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, NewYork, v. 47, n. 5, p. 996-1002, 2006.

SCHOLZ, D.; DIENER, W.; SCHAPER, J. Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. **Cardioscience**, Venezia, v. 5, n. 2, p. 127-138, 1994.

SEBASTIANI, M. et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 50, n. 14, p. 1362-1369, 2007.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. Journal of Applied Physiology, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 675-686, 1995.

SHAROV, V. G. et al. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Cincinati, v. 30, n. 9, p. 1757-1762, 1998.

SHEN, X. et al. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, New York, v. 55, n. 3, p. 798-805, 2006.

SHIOMI, T. et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. **Circulation**, Dallas, v. 109, n. 4, p. 544-549, 2004.

SIU, P. M. et al. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 18, n. 10, p. 1150-1152, 2004.

SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1363, n. 2, p. 100-124, 1998.

_____. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 23-29, 2001.

STANLEY, P. E. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. **Methods in Enzymology**, New York, v. 133, p. 14-22, 1986.

STUEWE, S. R. et al. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Cincinati, v. 32, n. 6, p. 903-913, 2000.

SUN, B. et al. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart. Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 108-117, 2008.

SUN, C. K. et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. **International Heart Journal**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 533-546, 2007.

SUN, M. et al. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, Copenhagen, 2011.

SZABADKAI, G. et al. Mitochondrial dynamics and Ca2+ signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1763, n. 5-6, p. 442-449, 2006.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radical Biology and Medicine, New York, v. 46, n. 9, p. 1283-1297, 2009.

TARDIFF, J. C. et al. Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 104, n. 4, p. 469-481, 1999.

TONDERA, D. et al The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, n. 14, p. 3049-3059, 2005.

TOUSSAINT, O.; HOUBION, A.; REMACLE, J. Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. **Toxicology**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 89-101, 1993.

TOWBIN, H.; OZBEY, O.; ZINGEL, O. An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, n. 10, p. 1887-1893, 2001.

TSUTSUI, H. et al. Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radicalmediated injury. **Cardiovascular Research**, London, v. 49, n. 1, p. 103-109, 2001.

TWIG, G. et al. Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP. American Journal of Physiology. Cell Physiology, Bethesda, v. 291, n. 1, p. C176-184, 2006.

VANDEN HOEK, T. L. et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 29, p. 18092-18098, 1998.

VARADI, A. et al. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, n. Pt 19, p. 4389-4400, 2004.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial Ca2+ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Frontiers in Biosciences**, Tampa, v. 11, p. 2554-2564, 2006.

VERSTREKEN, P. et al. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions. **Neuron**, Cambridge, v. 47, n. 3, p. 365-378, 2005.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science, London, v. 283, n. 5407, p. 1482-1488, 1999.

WANG, M. et al. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. **Journal of Hypertension**, London, v. 23, n. (1), p. 183-191, 2005.

WANG, X. et al. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 173, n. 2, p. 470-482, 2008.

WATSON, P. A. et al. Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. American Journal of Physiology. Heart Circulatory Physiology, Bethesda, v. 293, n. 1, p. H246-259, 2007.

WEN, C. P. et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. **Lancet**, London, v. 378, n. 9798, p. 1244-1253, 2011.

WRIGHT, D. C. et al. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 1, p. 194-199, 2007.

XU, X. et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Cincinati, v. 44, n. 1, p. 114-122, 208.

XU, X. et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats. **Experimental Physiolology**, Cambridge, v. 95, n. 10, p. 1008-1015, 2010.

YARIAN, C. S.; REBRIN, I.; SOHAL, R. S. Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 330, n. 1, p. 151-6, 2005.

YU, T.; ROBOTHAM, J. L.; YOON, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 8, p. 2653-2658, 2006.

YU, T. et al. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. **Cardiovascular Research**, London, v. 79, n. 2, p. 341-351, 2008.

ZHANG, D. X.; GUTTERMAN, D.D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. American Journal of Physiology. Heart Circulatory Physiology, Bethesda, v. 292, n. 5, p. H2023-2031, 2007.

ZUCHNER, S. et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 5, p. 449-451, 2004.