Andréa Somolanji Vanzelli

Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento
farmacológico com β -bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por
hiperatividade simpática em camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

SÃO PAULO

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vanzelli, Andréa Somolanji

Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento farmacológico com β -bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos / Andréa Somolanji Vanzelli. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Patricia Chakur Brum.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Beta-antagonistas adrenérgicos
3. Exercício 4.Proteínas sensoras de cálcio intracelular

USP/FM/SBD-450/09

Andréa Somolanji Vanzelli

Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento
farmacológico com β -bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por
hiperatividade simpática em camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

SÃO PAULO

2009

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."*

Albert Schweitzer

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu filho Daniel, o amor e paz da minha vida e aos meus pais Nilson e Cristina, que acreditaram e confiaram em mim durante esta longa jornada.

Agradecimentos

Aos meus pais, Nilson Izildo Vanzelli e Maria Cristina Somolanji Vanzelli, pela educação que deram, pelo ensino dos valores, formação de caráter, apoio, confiança e compreensão. Mãe e Pai, obrigada por compensar, pequenas ausências ao meu filho, com amor, obrigada por terem sido os alicerces da minha construção. Se não fosse por vocês, com certeza, hoje não teria alcançado esse sonho.

A meus irmãos, Diego Somolanji Vanzelli e Amanda Somolanji Vanzelli pelo companheirismo, apoio e amizade.

Ao meu filho Daniel Vanzelli Suarez e meu sobrinho, Lucas Jackubauskas Vanzelli, por sua presença constante, seu amor, seu carinho e sua inocência.

Agradeço a Stéphanos Freitas Soares de Melo, pela sua sensibilidade, carinho e sua doçura. Obrigada pela sua compreensão, seu respeito, sua cumplicidade e apoio. Sem você tudo seria mais difícil.

A Francisco Navarro, que jamais poderia ser esquecido nesta etapa da minha vida. Obrigada pelo apoio e incentivo na iniciação da minha vida científica e pessoal e pela confiança na minha vida acadêmica.

Às minhas amigas de hoje e sempre, Aline Villa Nova Bacurau e Elenice Alves da Silva Pereira de Oliveira, por sua amizade sincera, sua dedicação, seus créditos pessoais e profissionais e seus abraços apertados.

Aos companheiros, ex-companheiros e amigos de laboratório, Jan Barbosa Bartholomeu, Alessandra Medeiros, Aline Villa Nova Bacurau, Carlos Roberto Bueno Júnior (Carmão), Marcelo Pereira, Rodrigo Oliveira, Julio Cesar Batista Ferreira, Luiz Gustavo de Oliveira (Guga), Everton Crivoi, Luiz Bechara, Marco Amadeu, Telma Fátima da Cunha, Vanessa Voltarelli, Natale Rolim, Nathalie Paixão, Tiago Fernandez, Úrsula Soci, Valério Baraúna, Nara Hashimoto, as técnicas katt Coelho Mattos, Marcele Coelho, Glória e Luciano Lopes e aos professores Paulo Ramirez e Edilamar Menezes pelo entusiasmo, colaboração e espírito de equipe.

Agradeço também a Professora Tais Tinucci pela colaboração sempre disposta e bem-humorada a este trabalho e a minha vida acadêmica.

Ao Professor Antonio Carlos Pereira Barretto por sua colaboração inicial ao estudo e incorporação das idéias num contexto clínico.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

E finalmente, nunca poderia deixar agradecer a Patricia Chakur Brum, que jamais poderia ser considerada apenas minha orientadora. Muito obrigada, do fundo do coração pelas inúmeras vezes que me apoiou nos momentos difíceis da minha vida pessoal, oferecendo seu carinho e sua amizade, foi compreensiva, humana, mas ao mesmo tempo firme o que me fez enxergar e aprender muitas coisas de ordem pessoal e profissional. Sou muito grata e fico muito orgulhosa por ter sido sua aluna e ter recebido sua atenção e carinho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Grupo de Vancouver (Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, International committee of medical journal editors)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Sumário

Dedicatória	
Agradecimentos	
Normalização Adotada	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	1
1.1. A Insuficiência cardíaca	1
1.2. Os β -bloqueadores	3
1.3. O Treinamento Físico	5
1.4. Alterações nas proteínas reguladoras do cálcio intracelular na Insuficiência cardíaca: Efeito do treinamento físico e β -bloqueadores	7
1.5. Modelo Genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática	11
1.6. Justificativa	12
2. Objetivos	13
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	14
3. Material e Métodos	14
3.1. Amostra	14
3.2. Identificação dos animais	16
3.3. Ciclo claro-escuro (12 horas)	16
3.4. Pesagem corporal	17
3.5. Tolerância à realização de esforço	17
3.5.1. Capacidade máxima de realização de exercício físico	17
3.6. Tratamento Farmacológico	18
3.7. Protocolo de treinamento físico aeróbico	18
3.8. Medidas Cardiovasculares	20
3.8.1. Registro indireto da pressão arterial e frequência cardíaca	20
3.8.2. Avaliação da função ventricular através de Ecocardiograma	21
3.9. Sacrifício e coleta de tecidos	22
3.10. Análises morfológicas e morfométricas cardíacas	23
3.11. Western blotting	24
3.12. Transiente de cálcio	28
3.13. Análise estatística	29
4. Resultados	30
4.1. Efeitos isolados do treinamento físico e do tratamento com β -bloqueadores	30
4.1.1. Tolerância ao esforço máximo	30
4.1.2. Frequência cardíaca e pressão arterial	32
4.1.3. Fração de Encurtamento	34

4.1.4.	Massa dos órgãos.....	35
4.1.4.1.	Massa das câmaras cardíacas corrigidas pelo comprimento da tíbia...	35
4.1.4.2.	Massa dos rins e dos pulmões corrigidos pelo comprimento da tíbia.....	36
4.1.5.	Estrutura cardíaca.....	38
4.1.5.1.	Diâmetro dos cardiomiócitos.....	38
4.1.5.2.	Fração de colágeno cardíaco.....	39
4.1.6.	Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na regulação de cálcio intracelular.....	40
4.1.7.	Transiente de cálcio.....	43
4.2.	Efeitos da associação do treinamento físico ao tratamento com β -bloqueadores.....	44
4.2.1.	Tolerância ao esforço máximo.....	44
4.2.2.	Frequência cardíaca e pressão arterial.....	45
4.2.3.	Fração de Encurtamento.....	47
4.2.4.	Massa dos órgãos.....	48
4.2.4.1.	Massa das câmaras cardíacas corrigidas pelo comprimento da tíbia.....	48
4.2.4.2.	Massa dos rins e dos pulmões corrigidos pelo comprimento da tíbia.....	48
4.2.5.	Estrutura cardíaca.....	49
4.2.5.1.	Diâmetro dos cardiomiócitos.....	49
4.2.5.2.	Fração de colágeno cardíaco.....	50
4.2.6.	Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na regulação de cálcio intracelular.....	51
4.2.7.	Transiente de cálcio.....	54
5.	Discussão	55
6.	Conclusão	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Lista de Figuras

- Figura 1** - Sobrevida de camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática..... 15
- Figura 2** - Tempo total do teste progressivo até a exaustão em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinado (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade)..... 31
- Figura 3** - Frequência cardíaca medida antes, durante e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).....33
- Figura 4.** Fração de encurtamento antes e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), submetidos ao treinamento físico (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M), carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).34
- Figura 5.** Massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo comprimento tibial em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....36
- Figura 6.** Massa dos rins (Painel A) e dos pulmões (Painel B) corrigido pelo comprimento da tíbia de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....37
- Figura 7.** Diâmetro dos cardiomiócitos avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....39
- Figura 8.** Fração de volume de colágeno cardíaco avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....40
- Figura 9.** Expressão das proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio intracelular em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), submetidos ao treinamento físico (T) ou ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....42

Figura 10. Transiente de cálcio avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	43
Figura 11. Tempo total do teste progressivo até a exaustão em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento físico no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).....	45
Figura 12. Frequência cardíaca medida antes, durante e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).	46
Figura 13. Fração de encurtamento antes e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT), carvedilol (CT) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).....	47
Figura 14. Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento tibial em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico aos tratamentos farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	48
Figura 15. Pesos dos rins (Painel A) e dos pulmões (Painel B) corrigido pelo comprimento da tibia de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	49
Figura 16. Diâmetro dos cardiomiócitos avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	50
Figura 17. Fração de volume de colágeno cardíaco avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	51
Figura 18. Expressão das proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio intracelular em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) ou submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....	53

Figura 19. Transiente de cálcio avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade).....54

Lista de Tabelas

Tabela 1- Subdivisão dos grupos de camundongos que foram estudados neste projeto.....	15
Tabela 2 - Esquema demonstrativo do protocolo de treinamento físico em esteira.....	19
Tabela 3 - Pressão arterial pré-tratamento e na última semana de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).....	33
Tabela 4 - Pressão arterial pré-tratamento e na última semana de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).....	46

Resumo

Vanzelli, A. S. “Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento farmacológico com β -bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos”, 2009.

Adicionalmente às alterações estruturais e funcionais observadas na insuficiência cardíaca (IC), as alterações na dinâmica do Ca^{2+} intracelular apresentam uma relação negativa com a contratilidade e função cardíaca. Para evitar a progressão da IC, o tratamento desta síndrome, conta atualmente com intervenções multifatoriais, incluindo a terapia farmacológica, com destaque aos β -bloqueadores, e a terapia não medicamentosa incluindo o treinamento físico aeróbico, que quando realizado em intensidade adequada melhora a tolerância ao esforço e a qualidade de vida do portador de insuficiência cardíaca. É bem conhecido que os β -bloqueadores melhoram a função cardíaca e dinâmica do Ca^{2+} intracelular na IC, além de minimizar a remodelação cardíaca, no entanto, ainda existem controvérsias sobre qual o melhor β -bloqueador a ser utilizado e seus efeitos específicos na regulação de Ca^{2+} intracelular. Quanto aos efeitos do treinamento físico aeróbico na IC, seu efeito é reconhecido na melhora da tolerância aos esforços e qualidade de vida do paciente, o que é atribuído principalmente, a ganhos vasculares e músculos-esqueléticos. Em relação à função cardíaca, em trabalho anterior do nosso laboratório, o treinamento físico aeróbico melhorou a função cardíaca associado à melhora

nos transientes de cálcio do miócito cardíaco. Como tanto o treinamento físico como os β -bloqueadores apresentaram seus respectivos efeitos positivos, mas diferenciados, na presente tese estudou-se o efeito associado do treinamento físico ao tratamento com β -bloqueadores sobre a função cardíaca e o fluxo de cálcio no cardiomiócito. Além disso, comparou-se qual β -bloqueador (metoprolol ou carvedilol) seria mais efetivo na associação com o treinamento físico. Dividimos nossa amostra em 6 grupos, todos com IC. Dentre eles, 3 foram mantidos sedentários; salina (S), metoprolol (M) e carvedilol (C) e 3 foram treinados; treinados (T), treinados e tratados com metoprolol (MT) e treinados e tratados com carvedilol (CT). Verificamos que apenas os camundongos com IC treinados melhoraram a tolerância ao esforço, medida por teste máximo em esteira rolante, o que não foi observado no tratamento farmacológico isoladamente. Quanto à função cardíaca, observamos uma melhora da função nos grupos que realizaram treinamento físico ou foram tratados com metoprolol ou carvedilol isoladamente. Nos grupos que associaram as terapias farmacológicas e não-farmacológica, observamos uma melhora da função apenas no grupo treinado carvedilol associada a um aumento da expressão da SERCA 2, proteína esta, envolvida na recaptação do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, e, portanto, relacionada ao relaxamento da bomba cardíaca, apesar de não se observar aumento no pico do transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados. Em conjunto, os resultados sugerem uma associação preferencial entre o treinamento físico e o carvedilol o que pode trazer implicações clínicas futuras importantes para o tratamento da IC.

Descritores: Insuficiência cardíaca, beta-antagonistas adrenérgicos, exercício, proteínas sensoras de cálcio intracelular

Summary

Vanzelli, A. S. “Effects of the association between exercise training and β -blockers in a genetic model of sympathetic hyperactivity induced heart failure in mice”, 2009.

In heart failure (HF), structural and functional alterations in myocardium are often paralleled by defects in intracellular Ca^{2+} transients.. Within therapeutical strategies for heart failure, it is worth mentioning β -blockers and aerobic exercise training. It is known that β -blockers improve cardiac function and Ca^{2+} handling in heart failure. Indeed, β -blockers present cardiac anti-remodeling effects, but there are many controversies concerning which β -blocker is more efficient in HF treatment and which would be its specific effects in Ca^{2+} regulation. In relation to aerobic exercise training effects in HF, it is important to highlight its positive effects in exercise tolerance and life quality improvement associated with vascular and skeletal muscle gains. We also observed previously that exercise training improves cardiac function associated with improved calcium transients in cardiac myocytes. Taking into consideration the positive impact of both exercise training and β -blockers, presently we studied the associative effect of exercise training and β -blockers

on cardiac function and Ca^{2+} handling in cardiomyocytes in sympathetic hyperactivity induced HF in mice. We further compared which β -blocker (metoprolol or carvedilol) would be more effective to be associated with exercise training. HF mice were assigned into 6 different groups, being 3 of them sedentary: saline (S), metoprolol (M) and carvedilol (C) and 3 exercise-trained: trained (T), trained and treated with metoprolol (MT), and trained and treated with carvedilol (CT). We observed that only HF mice exercise-trained improved exercise tolerance evaluated by maximum exercise test on a treadmill, which was not observed in β -blocker treatment alone. Both exercise training and β -blockers improved cardiac function evaluated by echocardiography, respectively. When exercise training was associated with β -blockers, only HF mice exercise-trained and carvedilol-treated improved cardiac function associated with increased expression of SERCA 2 protein levels, which is involved in sarcoplasmic Ca^{2+} reuptake and cardiac relaxation. This response was not paralleled by changes in peak Ca^{2+} transients in isolated cardiac myocytes. Our results provide evidence for a superior effect of exercise training associated with carvedilol for improving cardiac function in HF mice.

Descriptors: Heart failure, adrenergic beta-antagonists, exercise, intracellular calcium-sensing proteins

1. Introdução

1.1. A Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca é a via final comum para diversas doenças cardiovasculares, constituindo-se em uma síndrome caracterizada por sinais e sintomas relacionados à perfusão tecidual inadequada (1), devido ao baixo débito cardíaco e remodelação cardíaca associada à perda de cardiomiócitos e ao aumento da fração de colágeno (2, 3). Essa síndrome era descrita primariamente como um distúrbio hemodinâmico. De acordo com essa visão, a síndrome estaria associada a um baixo débito cardíaco, com conseqüente baixo fluxo renal, levando à retenção de sódio e água e ao surgimento de edemas periférico e pulmonar (4). Esse pensamento foi à base para o uso de digitálicos e diuréticos no tratamento da síndrome. No entanto, a despeito do controle tanto da retenção hídrica e do uso de agentes inotrópicos positivos, a insuficiência cardíaca progredia, levando o paciente inexoravelmente ao óbito (5, 6).

Atualmente, a insuficiência cardíaca é definida como uma doença da circulação e não apenas do coração (7, 8). Quando o débito cardíaco cai após a agressão miocárdica, mecanismos neuro-hormonais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória. Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena de neuro-hormônios vasoconstritores parece exercer papel deletério no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, pelo aumento da

sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída. Isso leva à progressão da insuficiência cardíaca já existente. Esses neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas, ocasionando, por exemplo, o aparecimento de arritmias cardíacas (9). Por esses mecanismos, a ativação neuro-hormonal contribui de maneira significativa para os sintomas relacionados à insuficiência cardíaca, assim como para a alta mortalidade dos portadores dessa doença.

Portanto, a partir da década de 90 a visão da insuficiência cardíaca como uma síndrome de natureza neuro-hormonal propiciou consideráveis avanços em sua terapêutica. O tratamento atual não visa apenas aliviar os sintomas e melhorar a capacidade funcional e a qualidade de vida; seus objetivos incluem também a prevenção do desenvolvimento e progressão da síndrome, a atenuação da remodelação ventricular e a redução da mortalidade. Enfoque especial tem sido dado às alterações neuro-hormonais associadas à disfunção ventricular esquerda sistólica, tais como a hiperatividade do sistema nervoso simpático que contribui para a deterioração progressiva da função cardíaca nos estágios mais avançados da síndrome (10). Portanto, passou-se a prescrever β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores de angiotensina I, da angiotensina II e da síntese de aldosterona além da incorporação do treinamento físico no tratamento desta síndrome.

1.2. Os β -bloqueadores

O uso dos β -bloqueadores constitui-se, atualmente, em um dos principais tratamentos da síndrome da insuficiência cardíaca. Os benefícios do seu uso incluem melhoras hemodinâmicas, como aumento na fração de ejeção (11), neuro-humorais como diminuição da hiperatividade simpática (12) e ultraestruturais como preservação ou reversão da remodelação cardíaca (13), sendo capazes, portanto, de diminuir a taxa de apoptose dos cardiomiócitos e a fração de colágeno no tecido cardíaco, minimizando assim os danos ao coração.

A ação deste tipo de medicamento se dá por meio do bloqueio dos receptores β -adrenérgicos e conseqüentemente dos efeitos deletérios da hiperestimulação simpática, o que evidencia o conceito de que o bloqueio desse sistema poderia melhorar o prognóstico da insuficiência cardíaca, prevenindo sua evolução, por meio de vários mecanismos (14) tais como: 1) redução dos níveis de noradrenalina plasmática e tecidual por redução da atividade simpática, aumento do *clearance* de noradrenalina e bloqueio dos efeitos tóxicos das catecolaminas sobre os cardiomiócitos com redução de apoptose e necrose celular, 2) restabelecimento da densidade dos receptores β_1 -adrenérgicos diminuída em conseqüência da ativação adrenérgica crônica, permitindo ao miocárdio responder à estimulação das catecolaminas endógenas, resultando em melhora sintomática e maior tolerância ao esforço, 3) aumento considerável dos níveis de proteína $G_{\alpha s}$, com maior atividade da adenilil ciclase, maior produção de energia e maior

eficácia das unidades contráteis, 4) redução dos níveis de secreção de renina pelo bloqueio simpático, mimetizando a ação dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina e prevenindo o escape da supressão de angiotensina II pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, 5) melhora da função barorreflexa, redução da impedância aórtica (pós-carga) e melhora da eficiência circulatória, 6) redução da falência cardíaca, com menor consumo de oxigênio pelo miocárdio, melhora da função diastólica, aumento de fluxo coronariano, e redução de isquemia, arritmias ventriculares e morte súbita (14).

Atualmente, existem três gerações de β -bloqueadores em uso na clínica na médica, sendo estes, os bloqueadores de primeira geração, por exemplo, o propranolol, que não são seletivos, ou seja, bloqueiam todos os subtipos de receptores β -adrenérgicos, os de segunda geração, que são seletivos para o subtipo β_1 adrenérgico e os de 3ª geração que embora efetuem bloqueio inespecífico dos subtipos β_1 e β_2 adrenérgicos, possuem ações vasodilatadora e antioxidante associadas, o que melhora a tolerância a essa classe de β -bloqueadores e também minimizam os efeitos deletérios da auto-oxidação das catecolaminas cardíacas (15-17)

Atualmente, os β -bloqueadores mais utilizados na clínica são os de 2ª e 3ª geração, pois ambos estão associados à redução na taxa de mortalidade (11).

Em nosso projeto de mestrado verificamos que o metoprolol e o carvedilol, respectivamente de 2ª e 3ª geração apresentaram os maiores benefícios no tratamento da cardiomiopatia induzida por hiperatividade

simpática. Ambos, além de melhorar a fração de encurtamento dos camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática tratados, preveniram o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e o aumento da fração de colágeno, enquanto que o propranolol, reduziu o diâmetro dos cardiomiócitos, mas não modificou a fração de colágeno. Além disso, os camundongos tratados com propranolol, β -bloqueador de 1ª geração, apresentaram grande intolerância ao uso desse medicamento, apresentando 46% de mortalidade ao longo dos 2 meses de tratamento.

Em um outro trabalho do nosso grupo publicado recentemente (18), mostramos também que ambos os β -bloqueadores, metoprolol e carvedilol foram eficazes em melhorar a sobrevida e a função cardíaca dos camundongos com insuficiência cardíaca, porém, isto se realizou por mecanismos distintos. Enquanto o metoprolol melhorou o transiente de cálcio na célula cardíaca, o carvedilol teve grande efeito na redução do estresse oxidativo para o tecido cardíaco.

Com base nesses estudos anteriores, mostrando resultados positivos do metoprolol e do carvedilol, adotamos no presente estudo, estes dois β -bloqueadores.

1.3. Treinamento Físico

O treinamento físico pode provocar alterações autonômicas importantes. Em pacientes com insuficiência cardíaca, o treinamento físico aeróbico reduz significativamente a atividade nervosa simpática para o

coração (verificada por meio do "spillover" de noradrenalina), e aumenta significativamente o tônus vagal (19). Esses resultados têm implicações clínicas importantes, uma vez que um melhor balanço simpático-vagal pode diminuir a incidência de arritmias e, conseqüentemente, de morte súbita no paciente com insuficiência cardíaca crônica. Além da atenuação da atividade simpática cardíaca, o treinamento físico provoca diminuição na atividade nervosa simpática renal (20) e muscular (21) em animais de experimentação e em indivíduos normais, respectivamente. Em nosso laboratório, o treinamento físico em pacientes com insuficiência cardíaca atenuou a atividade nervosa simpática muscular medida por microneurografia (22) .

Outra adaptação importante ao treinamento físico (TF) é a melhora da tolerância ao esforço que encontra-se inalterada ou prejudicada com o tratamento com β -bloqueadores e a melhora na qualidade de vida do portador de insuficiência cardíaca, provavelmente atuando no aumento da massa muscular e na melhora metabólica do músculo esquelético (23-25). Resultados do nosso laboratório, em camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, observaram-se que o treinamento físico foi capaz de prevenir o desenvolvimento de intolerância ao esforço e a diminuição da fração de encurtamento em camundongos com essa cardiomiopatia, além de diminuir o tônus simpático cardíaco. Porém diferentemente dos animais tratados com os β -bloqueadores metoprolol e carvedilol, o treinamento físico, quando realizado numa faixa etária em que a insuficiência cardíaca, nesses camundongos, ainda é leve (3 a 5 meses de idade) não reduziu a fração do volume de colágeno cardíaco que

encontrava-se aumentada nos camundongos ARKO (26). Quando o treinamento físico foi realizado numa faixa etária onde a insuficiência cardíaca era grave (5 a 7 meses), esta intervenção foi capaz de reduzir a fração do volume de colágeno cardíaco (27).

1.4. Alterações nas proteínas reguladoras do cálcio intracelular na Insuficiência cardíaca: Efeito do treinamento físico e β -bloqueadores

Associadas às anormalidades funcionais apresentadas na insuficiência cardíaca estão alterações bioquímicas e moleculares na regulação do cálcio intracelular. A homeostase do cálcio dentro da célula é extremamente importante para a função do miocárdio. A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), os receptores rianodina (RyR2) e o canal de Ca^{2+} tipo L são os principais responsáveis pela homeostase do cálcio intracelular no processo de acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos.

De maneira simplificada, depois da ativação dos canais do tipo L, na membrana da célula, há entrada de cálcio o que induz a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelos canais RyR2 para o citoplasma (28, 29), cujo efeito final é a contração do miócito. É importante ressaltar que a atividade dos RYR2 é regulada por proteínas quinases (PKA e CAMKII) e fosfatases (PP1 e PP2A) (30).

Proteínas envolvidas na recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (SERCA) e na extrusão para o meio extracelular (NCX) reduzem a concentração de Ca^{2+} citoplasmático, relaxando a maquinaria sarcomérica em preparação para o próximo ciclo do acoplamento excitação-contracção. Portanto, a força contrátil dos cardiomiócitos depende dessas proteínas reguladoras do cálcio intracelular modulando a eficiência desse processo (31).

Muitos autores têm mostrado a associação da insuficiência cardíaca com alterações na dinâmica do cálcio, o que pode ser a causa da diminuição da função da bomba cardíaca, resultando em diminuição do débito cardíaco. Essa disfunção miocárdica é compensada pela liberação de catecolaminas, que estimulam os receptores adrenérgicos, estando eles acoplados a proteína Gs, que por sua vez ativam a adenilil ciclase, aumentando a produção de AMPc. O acúmulo de AMPc aumenta a atividade da proteína kinase A, causando mudanças na fosforilação e alterações funcionais e conformacionais de inúmeras proteínas que influenciam na regulação de cálcio e na contratilidade. Uma dessas modificações, observada na insuficiência cardíaca, é a redução da atividade e expressão da SERCA2a o que resulta em uma menor recaptação de Ca^{2+} citosólico para o retículo sarcoplasmático (32-34). A SERCA2a é uma proteína de 110 kDa e encontra-se sob controle direto do fosfolambam (PLN), que por sua vez, é uma proteína de 25 kDa (na forma de pentâmero) que encontra-se sob controle direto da PKA (no resíduo Ser 16) e da proteína quinase dependente de Ca^{2+} -calmodulina (CAMKII, no resíduo Tre 17). Portanto,

outro mecanismo que poderia estar envolvido na menor recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático no miocárdio de indivíduos com insuficiência cardíaca é o aumento na expressão do PLB ou na diminuição da fosforilação do PLN, que quando defosforilado inibe a atividade da SERCA2a diminuindo sua afinidade por Ca^{2+} . Além dessas alterações há aumento na expressão do NCX em portadores de insuficiência cardíaca, o que reduziria ainda mais a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e contribuiria para a disfunção contrátil (35, 36)

Como já citado anteriormente, a terapia com β -bloqueadores atualmente, é considerada fundamental no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca, mostrando efeitos benéficos na melhora da função ventricular e da qualidade de vida desses pacientes. Um dos possíveis mecanismos para que isso ocorra é que o bloqueio adrenérgico indiretamente normaliza as proteínas reguladoras do cálcio, resultando em melhora da dinâmica intracelular, revertendo assim, a disfunção cardíaca (37, 38). De fato, tem sido mostrado atualmente que associadas às melhoras na remodelação cardíaca e, conseqüentemente, da função contrátil, estão a normalização da função dos canais RyR2 (30), a da SERCA, além dos transientes de cálcio (37). Apesar de alguns estudos mostrarem resultados positivos na normalização de algumas proteínas envolvidas na regulação do cálcio intracelular, os mecanismos pelos quais os β -bloqueadores revertem essas alterações ainda são muito discutidos (18).

Assim como a terapia com β -bloqueadores, o treinamento físico também tem se mostrado eficaz como coadjuvante ao tratamento não-farmacológico da insuficiência cardíaca (39, 40). Além dos benefícios hemodinâmicos do treinamento físico, tem sido mostrado atualmente melhora da dinâmica do cálcio também por meio deste tipo de intervenção, como uma menor redução na expressão da SERCA e do NCX (35). Porém estes estudos ainda são escassos e precisam ser mais bem explorados. Resultados preliminares do nosso laboratório, obtidos em camundongos com insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática, mostram efeitos diferenciados entre o tratamento com β -bloqueadores e o treinamento físico na expressão de proteínas reguladoras do cálcio intracelular. Observamos que o treinamento físico melhora a recaptação de Ca^{2+} pelo RS principalmente por meio da fosforilação dos resíduos Ser¹⁶ e Tre¹⁷ do PLB (27). Por outro lado, o β -bloqueador melhora a recaptação às custas de melhora na expressão da SERCA e NCX (18). Porém, esses mecanismos de melhora possivelmente são diferentes entre os β -bloqueadores metoprolol e carvedilol (18). Em um estudo recente do nosso grupo, mostramos que, enquanto o carvedilol melhorou intensamente o balanço redox no tecido cardíaco, o metoprolol praticamente não teve efeito nesta variável, mas, aumentou eficientemente, o transiente de cálcio na célula, mostrando mecanismos diferenciados entre esses medicamentos, que podem ser importantes quando seus efeitos são associados aos efeitos de uma outra intervenção, como a do treinamento físico.

Considerando os efeitos benéficos do treinamento físico e sua utilização na clínica, assim como, o da terapia farmacológica com β -bloqueadores, qual o β -bloqueador mais eficaz para a associação com o tratamento não-farmacológico. Oferecendo especial atenção aos efeitos específicos dos β -bloqueadores e do treinamento físico, essa interação pode oferecer efeitos benéficos no tratamento da insuficiência cardíaca, tanto na estrutura como na função cardíaca.

Por isso, no presente estudo, avaliamos o possível efeito terapêutico da associação entre o tratamento farmacológico com β -bloqueadores e o treinamento físico sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação do cálcio intracelular.

1.5. Modelo Genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática

Em estudo prévio realizado em nosso laboratório descreveu-se que a inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos em camundongos (α_{2A}/α_{2C} ARKO) provocava uma cardiomiopatia, induzida por hiperatividade do sistema nervoso simpático (41) que ocorria devido a importância desses receptores sobre a inibição pré-sináptica da liberação de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos. Estes camundongos desenvolviam uma cardiomiopatia grave que progredia à insuficiência cardíaca aos 7 meses de idade associada a 50% de mortalidade. As consequências deletérias desta

hiperatividade simpática eram a intolerância ao exercício físico com diminuição significativa na capacidade máxima de realização do exercício, diminuição da contratilidade cardíaca e remodelação cardíaca com perda de cardiomiócitos e aumento na fração de colágeno.

1.6. Justificativa

Atualmente, o tratamento utilizado para a síndrome da insuficiência cardíaca não conta apenas com um tipo de intervenção. O mesmo inclui diversos tipos de medicamentos, além do treinamento físico de intensidade moderada, que pode proporcionar um efeito adjuvante à terapia medicamentosa.

Nota-se, contudo, que o uso de β -bloqueadores é essencial no tratamento da insuficiência cardíaca, pois estes, diminuem a ação tóxica das catecolaminas sobre o tecido cardíaco. Além disso, diminuem o trabalho cardíaco, aumentam a fração de ejeção, e podem, inclusive, promover a remodelação reversa (42, 43), resultados estes, observados também em meu projeto de mestrado como citado anteriormente (44).

Ainda no que se diz respeito ao tratamento da síndrome da insuficiência cardíaca sobre a visão de síndrome de natureza neuro-hormonal, o treinamento físico aeróbico, está cada vez mais utilizado como coadjuvante não-farmacológico para a terapia da síndrome. Os exercícios físicos aeróbicos quando realizados cronicamente, melhoram o desempenho

cardíaco e metabólico (45), diminuindo a atividade simpática tanto cardíaca (46) quanto renal (20).

Ressaltando, portanto, a importância do tratamento com β -bloqueadores na insuficiência cardíaca, além dos benefícios do treinamento físico aeróbico, enfatizados atualmente, a intenção do presente estudo foi verificar a eficácia do tratamento com β -bloqueadores de 2ª e 3ª geração (mais utilizados no tratamento da síndrome) associados a um programa de treinamento físico aeróbico no tratamento da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos na faixa etária de 5 a 7 meses, onde a cardiomiopatia é considerada grave e associada à insuficiência cardíaca. Além disso, estudamos o perfil molecular de expressão de proteínas envolvidas na regulação do cálcio intracelular no coração desses animais e verificamos a relação destas com a melhora na função ventricular.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estudar o efeito da associação entre o treinamento físico e os β -bloqueadores, metoprolol e carvedilol sobre a função cardíaca em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO que apresentam cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

2.2. Específicos

Estudar em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO na faixa etária de 5 a 7 meses de idade o efeito da associação dos β -bloqueadores e treinamento físico sobre:

- A tolerância ao esforço físico antes e depois do período de intervenção.
- O comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca no repouso antes, durante e após o período de intervenção.
- A estrutura cardíaca através de microscopia óptica (diâmetro transverso de miócitos e fração de colágeno cardíacos);
- A expressão de proteínas importantes para a sinalização do cálcio intracelular, tais como, Serca2, fosfolambam, fosfolambam fosforilado na serina 16 e treonina 17, canal de rianodina, fosfatase 1 e NCX após o período de intervenção.
- Os transientes de cálcio cardíacos

3. Material e Métodos

3.1. Amostra

Para a realização da presente tese foram utilizados camundongos machos α_{2A}/α_{2C} ARKO linhagem C57BL6 provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da USP. Os camundongos foram estudados na

faixa etária compreendida entre 5 a 7 meses de idade onde a cardiomiopatia é grave e associada a edema pulmonar e 50% de mortalidade aos 7 meses de idade (Figura 1).

Figura 1. Sobrevida de camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Estes animais foram divididos em 6 grupos: 3 grupos α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentários, tratados com salina (S); metoprolol (M) ou carvedilol (C) e 3 grupos que realizaram treinamento físico: treinados (T), treinados e tratados com metoprolol (MT) e treinados e tratados com carvedilol (CT) (Tabela1).

Tabela 1- Subdivisão dos grupos de camundongos que foram estudados neste projeto.

Salina	Metoprolol	Carvedilol
α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário (n=8)	α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário (n=12)	α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário (n=12)
α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (n=8)	α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (n=14)	α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (n=14)

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da faculdade de Medicina da USP Protocolo: 897/06.

3.2. Identificação dos animais

Os animais foram identificados com um dispositivo introduzido subcutâneamente no dorso, após anestesia com halotano. Cada dispositivo continha um código com letras e números, o qual foi identificado através de leitor automático (marca).

3.3. Ciclo claro-escuro (12 horas)

Os camundongos utilizados neste estudo foram mantidos em estantes, com temperatura controlada entre 22 e 25°C e ciclo claro-escuro (12 horas) invertido.

A inversão do ciclo claro-escuro foi realizada por meio de um *timer* instalado diretamente na luz da estante. Este procedimento é fundamental para animais submetidos ao treinamento físico, haja vista a maior atividade metabólica de roedores ocorrer durante o período noturno, o que justifica a necessidade de realizar os procedimentos experimentais do estudo durante este período.

3.4. Pesagem corporal

A evolução do peso corporal de todos os animais foi acompanhada semanalmente, em balança semi-analítica Gehaka (Brasil), antes e durante o período tratamento farmacológico, treinamento físico ou ambos até o sacrifício.

3.5. Tolerância à realização de esforço

3.5.1. Capacidade máxima de realização de exercício físico

A intolerância a realização de esforços foi estimada nos grupos estudados através da capacidade máxima de realização do exercício físico que consiste em um teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante (47), onde foram observadas as variáveis tempo de teste e distância percorrida. A velocidade inicial da esteira foi de 6 m/min sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofria um acréscimo de 3 m/min até atingir a exaustão do animal. O teste era interrompido quando o camundongo entrava em fadiga, ou seja, não conseguia manter o padrão da corrida.

3.6. Tratamento Farmacológico

O tratamento farmacológico foi realizado durante 8 semanas. A dose utilizada foi de 165mg/kg para metoprolol e 38mg/kg para carvedilol. Essas doses foram tituladas, sendo que a dose final era atingida ao final da primeira semana de tratamento.

3.7. Protocolo de treinamento físico aeróbico

Os grupos de animais treinados foram submetidos a um programa de treinamento físico aeróbico em esteira rolante. O treinamento físico foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido anteriormente em nosso laboratório para camundongos, onde foram cuidadosamente avaliadas as concentrações de lactato sanguíneo durante testes de cargas progressivas e protocolos de cargas independentes na esteira rolante com o intuito de encontrar a máxima fase estável do lactato (MFEL), que corresponde a maior carga, onde se permaneça no metabolismo aeróbico e as concentrações de lactato não variem mais que 1mmol (47). Sabe-se que as maiores adaptações aeróbias e hipertrofias cardíacas fisiológicas são encontradas na intensidade de exercício físico onde ocorre a MFEL (48). Os animais iniciavam o treinamento com 20 minutos de duração, aumentando diariamente 10 minutos até atingir, na primeira semana de treinamento, 50 minutos e partir da segunda 60 minutos de duração uma vez ao dia, cinco

dias por semana, durante oito semanas (Tabela 2) na intensidade da MFEL (correspondente a 60% da velocidade máxima atingida no teste máximo). As sessões de treinamento foram iniciadas com 10 minutos de aquecimento com velocidades progressivas até a velocidade da MFEL, pré-estabelecida durante os testes de cargas independentes e reajustadas a cada quatro semanas de treino, seguido de 30 minutos na intensidade da MFEL, e por fim, redução na velocidade de treino nos 10 minutos finais do treinamento.

Esclarecemos que os camundongos mantidos sedentários também foram submetidos a exercícios na esteira rolante em velocidade baixa 3-5 m/min durante 3-5 minutos, uma vez por semana para adaptarem-se ao protocolo experimental.

Tabela 2 - Esquema demonstrativo do protocolo de treinamento físico em esteira.

	Semanas	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Avaliação da carga	1 ^a	20 min*	30 min*	40 min*	50 min*	50 min*
	2 ^a	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*
	3 ^a	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*
Reavaliação da carga	4 ^a	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*
	5 ^a – 8 ^a	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*	60 min*

*A Intensidade correspondeu a MFEL ou 60% da velocidade máxima alcançada no teste máximo.

3.8. Medidas Cardiovasculares

3.8.1. Registro indireto da pressão arterial e frequência cardíaca

Foi realizada a medida indireta da pressão arterial pelo método de pletismografia de cauda (Kent Scientific, EUA). O camundongo foi colocado numa caixa restritora aquecida o suficiente para vasodilatar a arterial caudal, em seguida, um esfigmomanômetro (adaptado para camundongos) foi colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal, em seguida, a pressão do aparelho foi diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial. O sinal de pressão arterial é captado por um transdutor eletromagnético (Statham, P23Dd/ EUA) localizado na cauda do animal, que por sua vez é conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc/ EUA.). O sinal então, é repassado para um conversor de sinal analógico/digital (Stemtech, Inc/ EUA) e registrado em tempo real em microcomputador, sendo analisado através do programa AT/CODAS com uma frequência de amostragem de 1000Hz por canal.

Foram realizadas 10 medidas de pressão arterial para cada animal e considerada a média de 6 valores para a obtenção dos valores mais precisos de pressão arterial.

3.8.2. Avaliação da função ventricular através de Ecocardiograma

A avaliação da função ventricular foi realizada através de avaliação ecocardiográfica. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia (49). É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar o tamanho e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmada em uma série de estudos (50).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado antes e após o período de intervenção em todos os grupos estudados. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados através do anestésico halotano com fluxo contínuo de O₂ misturado ao anestésico. Este animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, EUA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de cerca de 14 MHz, para a otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, EUA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD), em discos

ópticos (Sony 128Mb) e em papel fotográfico geradas através da impressão colorida (Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas do diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo, das quais foram calculadas a fração de encurtamento (FS). A fórmula utilizada foi: $FS = (DDVE - DSVE) / DDVE$.

3.9. Sacrifício e coleta de tecidos

Vinte e quatro horas após o último experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA¹).

No sacrifício por deslocamento cervical realizou-se a excisão do coração para ulterior pesagem e em seguida foram coletados pulmões e rins. O peso total das câmaras cardíacas e dos demais órgãos foi corrigido pelo comprimento da tibia e comparados entre os grupos.

Os corações foram submetidos à separação das câmaras em átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), sendo que o septo ventricular em sua totalidade fez parte do ventrículo esquerdo. Em seguida, as câmaras foram pesadas separadamente, entretanto, apenas os átrios foram pesados conjuntamente. Logo em seguida, os ventrículos esquerdos foram imediatamente guardados em freezer -80°C.

¹COBEA - www.cobea.org.br

No sacrifício por perfusão tecidual, após anestesia dos animais com pentobarbital heparinizado (10% de heparina), implantou-se uma agulha de pequena espessura no ápice do ventrículo esquerdo e realizado uma pequena excisão no átrio direito para a saída do sangue. Por esta agulha foi perfundido cloreto de potássio (KCl) para que o ciclo cardíaco seja interrompido em diástole. Após a saída de todo o sangue foi perfundido então, formalina tamponada (4%) para manutenção da integridade dos tecidos. A seguir, retirou-se o coração e imerso em formalina tamponada (4%) por 48 horas, para posterior processamento histológico.

3.10. Análises morfológicas e morfométricas cardíacas

Para estudar as alterações na ultraestrutura cardíaca, após 24 horas de fixação em formalina tamponada (4%), o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual, com cortes de 2 micra e coloração por hematoxilina-eosina. A análise morfométrica cardíaca foi realizada por meio da medida do diâmetro dos cardiomiócitos e da avaliação do grau de fibrose do miocárdio. A medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500/ EUA), com aumento de 400x. Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O critério de escolha foi à integridade do cardiomiócito e a localização central do núcleo. O diâmetro dos cardiomiócitos foi considerado

a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal, para determinação do grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Além da coloração com hematoxilina-eosina para verificação do diâmetro dos cardiomiócitos, os ventrículos esquerdos armazenados em formalina foram também destinados à análise quantitativa de colágenos. Após o processo de fixação, inclusão em parafina e montagem das lâminas, as lâminas foram coradas com picrossirius. A fibrose miocárdica foi analisada sob aumento microscópico de 400x.

A fração de volume do colágeno foi calculada pela razão percentual da área do tecido miocárdico corado positivamente para as fibras colágenas (quantidade absoluta de colágeno) e a área total do tecido miocárdio em cada região ventricular examinada (quantidade absoluta de colágeno e miócitos), campo a campo. Um número de 15 a 20 campos foi examinado na amostra de cada um dos animais.

3.11. Western blotting

A quantificação da expressão das proteínas cardíacas foi o método utilizado para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com a disfunção ventricular observada nos camundongos com insuficiência cardíaca (41). Para tal, avaliamos a quantificação da expressão de algumas das proteínas do tecido cardíaco da via de regulação intracelular de cálcio. São apresentados, neste estudo, os resultados da quantificação da expressão das proteínas envolvidas na recaptação de cálcio pelo RS

(SERCA2, PLB, PLB fosforilado na Ser¹⁶, PLB fosforilado na Tre¹⁷ e PP1, esta última envolvida com a desfosforilação de proteínas como o PLB (PP1) e resultados da quantificação da expressão das proteínas envolvidas com a liberação de cálcio pelo RS (RyR) e com a extrusão do cálcio citosólico (NCX).

O *Western Blotting* consiste na identificação de uma determinada proteína numa mistura contendo várias outras proteínas, baseada no reconhecimento de antígenos específicos da mesma por anticorpos monoclonais (derivado de um clone de células de hibridoma que reconhece somente um sítio antígeno) ou policlonais (originado de múltiplas linhagens de produtores de anticorpos, sendo menos homogêneos e específicos, mas que reconhecem uma gama de antígenos maior do que os anticorpos monoclonais). Para tal, utiliza-se a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polycrylamide Gel Electrophoresis*) que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico. Posteriormente, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences; Piscataway, EUA) do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. A razão para a transferência das bandas de proteínas para uma membrana de nitrocelulose é permitir a chegada dos anticorpos às bandas com maior facilidade e eficácia, uma vez que o gel de poliacrilamida não permite a difusão de grandes moléculas. As membranas são coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas protéicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, uma das principais causas de coloração de fundo, sem especificidade, a membrana é incubada em solução contendo caseína, proteína inerte que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

A membrana de nitrocelulose é, então, incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de enxaguar a membrana para remover o anticorpo primário não ligado, ela é exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário. A enzima peroxidase funciona como um sinalizador molecular que permite a visualização do local da proteína detectada. No entanto, para que a enzima seja visualizada é necessário que seja usada em conjunção com um agente quimioluminescente, produzindo bioluminescência proporcionalmente à quantidade de proteína.

Como anticorpos primários foram ou serão utilizados os seguintes anticorpos:

- *SERCA2 ATPase, camundongo IgG1* (ABR Incorporation, EUA): bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, dependente de ATP. Esta bomba é em parte responsável pela manutenção de baixas concentrações de cálcio livre no citoplasma. A expressão do gene *Serca2* é tecido-dependente e responsável pela geração de *Serca 2a* e *Serca 2b*. A *Serca 2a* é músculo-específica e expressa em fibras do tipo I da musculatura

esquelética, cardíaca e de vasos. A Serca 2b é expressa em todos os tipos celulares. A titulação usada foi de 1:2500.

- *Fosfolambam (PLB), camundongo IgG2a* (ABR Incorporation, EUA): é uma fosfoproteína de 52 aminoácidos que regula a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Serca 2). Sob estimulação adrenérgica, o PLB é fosforilado na serina 16 e treonina 17 e estimula o transporte de cálcio através da membrana do retículo sarcoplasmático e relaxamento das fibras cardíacas. A concentração usada foi de 2 µg/ml.
- *Fosfo-PLB (Ser 16), coelho IgG* (RDI Incorporation, EUA): PLB fosforilado na serina 16. Esta fosforilação ocorre quando o sistema nervoso simpático é ativado. A concentração usada foi de 2 µg/ml.
- *Fosfo-PLB (Tre 17), coelho IgG* (RDI Incorporation, NJ-EUA): PLB fosforilado na treonina 17. A concentração usada foi de 2 µg/ml.
- *Canais de rianodina (RyR), camundongo IgG1* (ABR Incorporation, EUA): é um canal responsável pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. As isoformas da RyR em mamíferos são provenientes de diferentes genes. O RyR2 é expresso predominantemente no músculo cardíaco e também encontra-se no estômago e células endoteliais. A titulação usada foi de 1:5000.
- *Proteína fosfatase 1, coelho IgG* (Upstate, Lake Placid-EUA): proteína responsável pela defosforilação de diferentes proteínas. A titulação usada foi de 1:1000.
- *NCX, camundongo IgM* (ABR Incorporation, EUA): o trocador sódio-cálcio é o principal mecanismo de extrusão de cálcio da célula. Traz 3

moléculas de sódio para dentro da célula para cada molécula de Ca^{2+} que é extruída. A titulação usada foi de 1:2000.

Como anticorpo secundário, foram utilizados anticorpos conjugados a peroxidase (IgG anti-camundongo ou anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, EUA) anti os anticorpos primários utilizados na titulação de 1:10000.

Esclarecemos que todos os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas metodológicas.

As amostras foram divididas em gel de poliacrilamida de forma randomizada, e foi feita a média do gel, sendo o valor normalizador para cada amostra. Para que não haja dúvidas de que as amostras foram pipetadas de forma homogênea, foi realizado a quantificação de uma proteína que não apresente alteração com o genótipo ou mesmo com a interferência do treinamento físico ou do tratamento farmacológico. Para tal, utilizamos o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Santa Cruz, EUA), enzima catalítica expressa de maneira constitutiva e abundante nas células de mamíferos. A titulação usada foi de 1:500.

3.12. Transiente de cálcio

A fim de verificar se a alteração observada nas proteínas de cálcio pela IC ou pelos tratamentos repercutiriam em modificações no transiente de cálcio dos cardiomiócitos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal

de pentobarbital sódico (100mg/kg) e após atingir o nível completo da anestesia o coração foi rapidamente removido. Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados e adquiridas as imagens para $[Ca^{2+}]_i$ como já descrito anteriormente (51). A concentração de Ca^{2+} foi medida por de microscopia confocal indicado como F/F_0 , onde F_0 é fluorescência de Ca^{2+} no repouso. As imagens foram obtidas usando o microscópio confocal ZEISS Meta da CEMEL (Instituto de Ciências biológicas, UFMG). Esse experimento foi realizado em colaboração com a Prof^a Dr^a Silvia Guatimosim do ICB- UFMG.

3.13. Análise estatística

Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

As variáveis estudadas estão comparadas entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) ou um caminho com medidas repetidas, com *post-hoc* de Duncan. Para todas as análises, adotou-se como nível de significância $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Efeitos isolados do treinamento físico e do tratamento com β -bloqueadores

Apresentamos nesta primeira parte dos resultados, os efeitos isolados do treinamento físico e das terapias farmacológicas com os β -bloqueadores, metoprolol e carvedilol. As diferenças entre camundongos controle (wild type) e camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO já foram mostradas em estudos anteriores de nosso laboratório (18, 27) e portanto representaremos os camundongos controle (wild type) como parâmetro de comparação nos gráficos, com linhas tracejadas. Portanto, todos os grupos de camundongos deste trabalho apresentam insuficiência cardíaca por hiperatividade simpática. A seguir, então, serão mostrados os resultados para o grupo S, que se mantiveram sem nenhuma intervenção e receberam apenas soro fisiológico, grupo T, que foram submetidos ao treinamento físico, grupo M, tratados com o β -bloqueador metoprolol e grupo C, que foram tratados com carvedilol (C).

4.1.1. Tolerância ao esforço máximo

Nesta etapa, o teste de esforço foi realizado com o intuito de verificar os efeitos isolados do treinamento físico e do tratamento com β -bloqueadores na tolerância a realização de exercício físico. Na Figura 2,

observa-se a tolerância ao esforço avaliado em teste progressivo até a exaustão em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle, submetidos ao treinamento físico ou tratamento farmacológico. O tratamento com metoprolol e carvedilol não afetou ou modificou a tolerância ao esforço nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO. No entanto, como esperado, o treinamento físico aumentou significativamente a capacidade de realização de exercício dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO.

Figura 2. Tempo total do teste progressivo até a exaustão em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinado (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença significativa vs. período pré-intervenção ($p \leq 0,05$).

diferença significativa vs. grupo S

4.1.2. Frequência cardíaca e pressão arterial

Como já demonstrado anteriormente, no modelo genético de insuficiência cardíaca por hiperatividade simpática utilizado nesse projeto os camundongos apresentam uma taquicardia basal (26, 27) associada às altas concentrações de noradrenalina plasmática (52). Tanto o treinamento físico quanto o tratamento farmacológico com metoprolol ou carvedilol reduziram a frequência cardíaca dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO a partir da 4ª semana de intervenção (Figura 3), com exceção do grupo M onde a diferença se deu a partir da 5ª semana. A pressão arterial também foi avaliada, mas não apresentou diferenças entre os grupos durante as 8 semanas do período de intervenção. Na tabela 3 pode-se verificar os valores da pressão arterial ao final do período de intervenção.

Figura 3. Frequência cardíaca medida antes, durante e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).

*diferença significativa vs demais grupos ($p \leq 0,05$)

Tabela 3. Pressão arterial pré-tratamento e na última semana de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).

S		T		M		C	
pré	8ª sem	pré	8ª sem	pré	8ª sem	pré	8ª sem
111± 5,5	103 ±4,3	113± 12,0	111 ±1,8	114 ± 1	111 ± 2,6	118 ± 1	114± 5,3

4.1.3. Fração de Encurtamento

Realizamos as medidas de fração de encurtamento dos camundongos deste estudo pela avaliação ecocardiográfica. Notamos, conforme mostrado na figura 4, que após o período de 8 semanas de intervenção, tanto os tratamentos farmacológicos com metoprolol e carvedilol, quanto o treinamento físico melhoraram a fração de encurtamento quando comparados ao grupo S.

Figura 4. Fração de encurtamento antes e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), submetidos ao treinamento físico (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M), carvedilol (C) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença significativa vs grupo S ($p \leq 0,05$)

diferença significativa vs período pré-intervenção ($p \leq 0,05$)

4.1.4. Massa dos órgãos

4.1.4.1. Massa das câmaras cardíacas corrigidas pelo comprimento da tíbia

É observado na literatura que a hiperatividade simpática pode contribuir, de maneira compensatória, para a hipertrofia cardíaca (53). Pacientes com insuficiência cardíaca no estágio compensado apresentam hipertrofia cardíaca (54). Neste estudo, avaliamos a massa das câmaras cardíacas a fim de verificar se haveria hipertrofia cardíaca nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO e se as terapias reverteriam essa hipertrofia. Os resultados apresentados constituem-se em massa das câmaras normalizada pelo comprimento da tíbia de cada animal. Não houve diferenças na massa dos ventrículos direito e átrios dos grupos analisados. Contudo, na Figura 5 podemos observar que os camundongos do grupo S apresentaram uma maior massa do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo WT (linha tracejada) e que todas as terapias isoladamente reduziram a massa do ventrículo esquerdo dos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO após o período de intervenção.

Figura 5. Massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento tibial em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

*diferença para o grupo S

4.1.4.2. Massa dos rins e dos pulmões corrigidos pelo comprimento da tibia

A fim de detectar alguma anormalidade no peso desses órgãos, foi realizada a pesagem dos rins e dos pulmões. Porém, nestes grupos, não observamos nenhuma alteração no peso dos rins (Figura 6A) e dos pulmões (Figura 6B), o que sugere que os animais não apresentam edema pulmonar no estágio da doença que se encontram.

Figura 6. Massa dos rins (Painel A) e dos pulmões (Painel B) corrigido pelo comprimento da tíbia de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

4.1.5. Estrutura cardíaca

4.1.5.1. Diâmetro dos cardiomiócitos

Através de análise histológica, realizamos a medida do diâmetro dos cardiomiócitos, que complementa os dados de peso das câmaras cardíacas. Observa-se na Figura 7, comparando-se o grupo S com a linha tracejada que indica os camundongos WT, que estes animais apresentam uma grande hipertrofia. Os resultados encontrados indicam que o treinamento físico isoladamente não normalizou o diâmetro do cardiomiócitos. Porém, tanto o tratamento com metoprolol quanto com carvedilol foram eficazes em reverter à hipertrofia encontrada.

Figura 7. Diâmetro dos cardiomiócitos avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

4.1.5.2. Fração de colágeno cardíaco

Uma outra medida importante como indicativo de remodelação cardíaca é a da fração de volume de colágeno cardíaco. Observa-se na figura 8, mais uma vez, que os camundongos com insuficiência cardíaca (S) apresentam um aumento significativo da fração de colágeno cardíaco quando comparados com a linha tracejada dos camundongos WT. O treinamento físico e os tratamentos com metoprolol (M) e carvedilol (C) normalizaram os valores da fração de colágeno.

Figura 8. Fração de volume de colágeno cardíaco avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

4.1.6. Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na regulação de cálcio intracelular

Como mostrado na figura 9 não observamos diferenças entre os grupos na expressão do RyR, responsável pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático no momento da contração muscular cardíaca e do NCX, proteína envolvida da diástole ventricular, uma vez que troca três moléculas de Na^+ para o meio intracelular, por uma de Ca^{2+} para o meio extracelular. Porém, a expressão da proteína SERCA 2, diminuída nos camundongos com IC, teve sua expressão restaurada pelo treinamento físico (T) e pelo tratamento com os β -bloqueadores, metoprolol (M) e carvedilol (C).

Também não observamos diferenças na expressão do PLB total, mas, quando avaliamos a expressão do PLB fosforilado no resíduo da serina 16 (PPLB ser¹⁶/ PLB) observamos que o grupo submetido ao treinamento físico apresentou um aumento significativo na sua expressão em relação ao grupo S e aos grupos tratados com os β -bloqueadores M e C.

No PLB fosforilado no resíduo da treonina 17, nota-se que o grupo de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento (S) apresenta um aumento na expressão dessa proteína. Apenas os tratamentos farmacológicos com metoprolol (M) e carvedilol (C) normalizaram sua expressão.

A razão SERCA/ PLB foi analisada, mostrando-se um indicativo da função de recaptção de cálcio no relaxamento ventricular. Observa-se que todas as terapias foram eficazes em aumentar esta razão.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos na expressão da proteína PP1.

Figura 9. Expressão das proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio nos grupos submetidos ao treinamento físico (T) ou ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

*diferença significativa para o grupo S

#diferença significativa para o grupo T

a diferença significativa para os demais grupos

Obs: Os blots representativos estão na figura 19

4.1.7. Transiente de cálcio

Observa-se na figura 10, que o treinamento físico isoladamente, assim como o tratamento farmacológico com o β -bloqueador metoprolol, aumentaram o pico do transiente de cálcio nos cardiomiócitos dos camundongos com insuficiência cardíaca. O tratamento farmacológico com carvedilol diminuiu o pico do transiente de cálcio nesses cardiomiócitos.

Figura 10. Transiente de cálcio avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S), treinados (T) e submetidos ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

4.2. Efeitos da associação do treinamento físico ao tratamento com β -bloqueadores

4.2.1. Tolerância ao esforço máximo

Nesta segunda etapa, a questão levantada era se o treinamento físico quando associado ao tratamento com metoprolol (M) ou carvedilol (C), poderia normalizar a tolerância ao esforço, já que, como mostrado anteriormente, a terapia farmacológica com os β -bloqueadores, isoladamente, não exerceu nenhum efeito nesta sobre a tolerância aos esforços.

A associação do treinamento físico à terapia com β -bloqueadores, portanto, não apenas normalizou a tolerância ao esforço, como também a melhorou, visto que após o período de intervenção a distância percorrida pelos grupos treinados foi maior que a dos camundongos WT (Figura 11).

Figura 11. Tempo total do teste progressivo até a exaustão em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento físico no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)
* diferença significativa vs. período pré-intervenção ($p \leq 0,05$).
diferença significativa vs. grupo S

4.2.2. Frequência cardíaca e pressão arterial

Como já mostrado anteriormente, os camundongos deste modelo genético apresentam taquicardia basal. A associação do treinamento físico às terapias com β -bloqueadores, assim como observado nas terapias isoladas, reduziram a frequência cardíaca dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO a partir da 4ª semana de intervenção (Figura 12). Não houve efeito potencializador da associação do treinamento físico uma vez que a frequência cardíaca atingiu os valores do grupo WT.

A associação das terapias também não exerceu nenhum efeito sobre a pressão arterial (tabela 4).

Figura 12. Freqüência cardíaca medida antes, durante e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).

*diferença significativa vs demais grupos ($p \leq 0,05$)

Tabela 4. Pressão arterial pré-tratamento e na última semana de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) com o treinamento no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade).

S		MT		CT	
pré	8ª sem	pré	8ª sem	pré	8ª sem
110,7 ± 5,5	103,1 ± 4,3	111,2 ± 1,8	116,6 ± 0,6	114,8 ± 1,2	113,3 ± 2,2

4.2.3. Fração de Encurtamento

Conforme mostrado na figura 13, após o período de 8 semanas de intervenção, apenas o grupo CT melhorou significativamente os valores de fração de encurtamento quando comparados ao grupo S, apesar de notarmos no grupo MT uma tendência à melhora desse índice de função sistólica.

Figura 13. Fração de encurtamento antes e após o período de intervenção em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT), carvedilol (CT) no período pré (5 meses de idade) e pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença significativa vs grupo S ($p \leq 0,05$)

diferença significativa vs período pré-intervenção ($p \leq 0,05$)

4.2.4. Massa dos órgãos

4.2.4.1. Massa das câmaras cardíacas corrigidas pelo comprimento da tíbia

Na Figura 14 podemos observar que ambas as terapias de associação do treinamento físico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) reduziram o peso do ventrículo esquerdo dos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO após o período de intervenção, assim como observado pelo efeito isolado dos tratamentos mostrado anteriormente.

Figura 14. Massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento tibial em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico aos tratamentos farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

*diferença para o grupo S

4.2.4.2. Massa dos rins e dos pulmões corrigidas pelo comprimento da tibia

Como mostrado na figura 15 não foram observadas diferenças na massa dos rins e dos pulmões após período de intervenção.

Figura 15. Massa dos rins (Painel A) e dos pulmões (Painel B) corrigido pelo comprimento da tibia de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (M) ou carvedilol (C) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

4.2.5. Estrutura cardíaca

4.2.5.1. Diâmetro dos cardiomiócitos

Observa-se na Figura 16, que ambas as terapias de associação do treinamento físico aos β -bloqueadores, normalizaram o diâmetro do cardiomiócitos. Verificamos, como mostrado anteriormente, que o treinamento físico isoladamente não exerceu efeito sobre essa variável, concluindo-se, portanto, que esta normalização é um efeito prioritário do tratamento com β -bloqueadores.

Figura 16. Diâmetro dos cardiomiócitos avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

4.2.5.2. Fração de colágeno cardíaco

Observa-se na figura 17, que, assim como, na medida do diâmetro dos cardiomiócitos, ambas as terapias de associação do treinamento físico aos β -bloqueadores, normalizaram a fração de colágeno cardíaco, sendo

este mais um indicativo de remodelação reversa associada a efeitos do treinamento físico e da terapia farmacológica.

Figura 17. Fração de volume de colágeno cardíaco avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

4.2.6. Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na regulação de cálcio intracelular

Assim como visto com os efeitos isolados das terapias (figura 10), não observamos diferenças entre os grupos na expressão do RyR e do NCX. Contudo, a expressão da proteína SERCA2, diminuída nos camundongos com IC, foi normalizada pela associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT). É importante notar que o treinamento físico não representou nenhum efeito aditivo no aumento da expressão da SERCA 2 quando associado ao metoprolol, contudo, no

grupo carvedilol (C) proporcionou uma otimização adicional de 15% na expressão da proteína em relação à terapia isolada com este β -bloqueador.

Em relação à expressão do PLB fosforilado no resíduo da serina 16 (PPLB ser¹⁶/ PLB) observamos que o grupo CT apresentou um aumento significativo na sua expressão em relação ao grupo S e ao grupo MT. Vimos anteriormente, que o treinamento físico, isoladamente, também aumentou significativamente a expressão dessa proteína. Contudo, a associação do treinamento físico à terapia com carvedilol representou um aumento de 26% nos valores encontrados no grupo que foram submetidos apenas ao tratamento com carvedilol.

Quanto à expressão do PLB fosforilado no resíduo da treonina 17 (PPLB tre¹⁷/ PLB), nota-se que houve uma redução da expressão dessa proteína somente grupo que associou treinamento físico e metoprolol (MT). Interessante notar que o treinamento físico quando associado à terapia com carvedilol proporcionou um aumento de 28% quando comparados os grupos C e CT.

O treinamento físico associado à terapia com carvedilol (CT) exerceu também grande impacto sobre a razão SERCA/ PLB, proporcionando um aumento de 160% nesses valores em relação ao grupo S. Havíamos observado que o treinamento físico e o tratamento com carvedilol, isoladamente, proporcionaram grande aumento deste índice. Com isso, parece que a associação das duas terapias potencializou ainda mais os efeitos nessa razão, indicando um possível aumento na função de recaptação do cálcio intracelular.

Figura 18. Expressão das proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio intracelular em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) ou submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

*diferença significativa para o grupo S

#diferença significativa para o grupo T

a diferença significativa para os demais grupos

4.2.7. Transiente de cálcio

Observa-se na figura 19, que, similarmente aos resultados encontrados com os efeitos isolados dos tratamentos, a associação do treinamento físico ao β -bloqueador carvedilol (CT) diminui o pico do transiente de cálcio nos cardiomiócitos dos camundongos com insuficiência cardíaca, contudo, a associação do treinamento físico ao β -bloqueador metoprolol (MT) não alterou o transiente.

Figura 19. Transiente de cálcio avaliado em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO controle (S) e submetidos à associação do treinamento físico ao tratamento farmacológico com metoprolol (MT) ou carvedilol (CT) no período pós-intervenção (7 meses de idade). A linha tracejada representa os camundongos sem IC (WT)

* diferença para o grupo S

5. Discussão

Os principais resultados deste estudo foram que em camundongos com IC induzida por hiperatividade simpática:

1) o treinamento físico isoladamente ou associado as terapias farmacológicas melhorou a tolerância ao esforço, enquanto os β -bloqueadores isoladamente não o fizeram;

2) metoprolol e carvedilol isoladamente ou em associação com o treinamento físico preveniram de maneira similar à remodelação cardíaca;

3) treinamento físico, metoprolol e carvedilol aumentaram a expressão de SERCA2 isoladamente ou associados.

4) quando em associação, carvedilol e treinamento físico potencializaram ainda mais o aumento na expressão da SERCA2.

Mostramos em trabalhos anteriores do nosso laboratório que o treinamento físico melhora a fração de encurtamento na insuficiência cardíaca por melhora no transiente de cálcio e do perfil de expressão das proteínas que regulam o fluxo de Ca^{2+} intracelular (26, 27). Além disso, mostramos também que o carvedilol é mais eficaz em reduzir o estresse oxidativo do que em melhorar o transiente de Ca^{2+} cardíaco (18). Portanto, essa combinação pode potencializar os efeitos benéficos de ambas as terapias sobre a função cardíaca. De fato, mostramos efeito otimizador do treinamento físico quando associado apenas ao carvedilol no aumento da expressão da proteína Serca2, envolvida na recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático na fase de relaxamento.

Embora o treinamento físico tenha tido efeito diferenciado quando associado ao carvedilol na expressão da Serca, exerceu o mesmo efeito na melhora da tolerância aos esforços seja isoladamente ou em associação com qualquer β -bloqueador.

A medida da tolerância a realização de 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 dos sinais clínicos de cardiomiopatia estarem presentes (55).

A intolerância à realização de esforço físico constitui um dos sintomas clássicos da insuficiência cardíaca mesmo para atividades diárias, como é visto em casos mais graves. O aumento da tolerância à realização de esforço físico não depende exclusivamente da melhora da função cardíaca, mas da associação de um melhor desempenho cardíaco com adaptações benéficas em alvos não-cardíacos. Isso pode incluir a resposta vasodilatadora no endotélio vascular, na musculatura esquelética, na distribuição do débito cardíaco e na resposta ventilatória (56), assim como, modificações na musculatura esquelética. Análises da estrutura muscular esquelética realizadas no mesmo modelo genético utilizado neste estudo, os camundongos $\alpha_{2A/2C}$ -ARKO, aos 7 meses de idade, por meio da técnica de histoquímica para ATPase miosínica, mostraram perda de massa muscular, transição das fibras do tipo I para fibras do tipo II e rarefação capilar. As alterações descritas parecem ainda estar acompanhadas pela mudança do perfil metabólico com redução da atividade de enzimas oxidativas (57).

Em relação aos efeitos dos β -bloqueadores na tolerância ao esforço, vários estudos na literatura examinaram seu uso em portadores de diversas cardiopatias (58, 59). Os ensaios clínicos que perduraram por mais de um mês observaram melhoras significativas na função ventricular, mas muito sutis na tolerância ao esforço (58, 59). Estas informações corroboram os nossos resultados e enfatizam a importância da associação da terapia farmacológica e não-farmacológica.

De modo parecido ao resultado da tolerância à realização de esforço, observamos comportamentos semelhantes na redução da frequência cardíaca nos grupos metoprolol e carvedilol associados ao treinamento físico. Ambos tiveram efeito equipotente sobre a FC, reduzindo-a para o nível dos camundongos WT (linha tracejada) e, portanto, mostrando a eficácia do tratamento com os dois β -bloqueadores na diminuição da taquicardia apresentada neste modelo de cardiomiopatia, que está relacionada a um aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Estes efeitos bradicárdicos portanto, podem sugerir uma melhora no balanço autonômico nesses camundongos, que está relacionada a uma melhora do prognóstico e sobrevida na insuficiência cardíaca (23, 60). Além disso, os valores elevados da frequência cardíaca também emergem como um preditor independente de mortalidade na população em geral (61, 62) e em grupos especiais como hipertensos (63).

Aliada às alterações na função cardíaca, nossos resultados também sugerem que o coração dos camundongos com insuficiência cardíaca estão sob efeito de remodelação. No presente trabalho, observamos diminuição da

fração de encurtamento, acompanhado de hipertrofia dos cardiomiócitos e aumento de colágeno cardíaco no grupo de camundongos com insuficiência cardíaca.

Como efeito dos tratamentos utilizados, observamos que os tratamentos com os β -bloqueadores metoprolol ou carvedilol, sejam eles associados ou não ao treinamento físico, preveniram a remodelação cardíaca, uma vez que impediram o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e da fração de colágeno cardíaco. O treinamento físico isoladamente não exerceu efeito sobre a hipertrofia dos cardiomiócitos, mas, porém, normalizou a fração de colágeno cardíaco para valores próximos ao dos camundongos controle (WT).

De fato, o treinamento físico tem efeito no remodelamento reverso associado a redução na via de sinalização da calcineurina, que esta relacionada à hipertrofia patológica (64) ou ativação da via da AKT associada a hipertrofia fisiológica (65). Isto se faz importante, uma vez que o remodelamento está altamente relacionado a óbito em pacientes com IC (66-68).

Outros efeitos positivos do treinamento físico durante o processo de falência do miocárdio, tem sido recentemente mostrados e podem estar associados, dentre outros fatores, a redução de proteínas associadas à fibrose e a remodelação deletéria. Isto é observado em diferentes etiologias, como a isquêmica (69) ou na insuficiência cardíaca de origem hipertensiva (70).

Essa redução na fibrose cardíaca pelo treinamento físico pode ser explicada pelo controle do balanço de proteínas envolvidas na degradação da matrix extracelular, resultando em redução das metaloproteinases de matrix (MMPs), que estão aumentadas no processo de remodelação, e em aumento dos inibidores tecido-endógenos das metaloproteinases (TIMPs), que está diminuído no coração em falência. O desbalanço na expressão dessas proteínas podem estar relacionadas com o aumento da angiotensina II e de citocinas pró-inflamatórias (69).

No modelo de insuficiência cardíaca utilizado no presente trabalho, verificou-se anteriormente, num estudo do nosso laboratório, um aumento da concentração de angiotensina II (71). Neste mesmo estudo, foi verificado que o treinamento físico reduziu as concentrações de angiotensina II e a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA).

Não menos importante, alguns outros trabalhos têm se proposto a verificar a ação preventiva do treinamento físico na remodelação cardíaca (72, 73). Um desses trabalhos mostra que animais que realizaram treinamento físico antes de passarem por cirurgia de indução do infarto do miocárdio apresentaram menor expressão de genes associados à apoptose (72).

Todas essas informações substanciam os efeitos benéficos do treinamento físico no processo de remodelação cardíaca.

Associado à disfunção cardíaca e a remodelação deletéria, presentes na insuficiência cardíaca e observados no modelo de camundongos com IC utilizados neste trabalho, estão as alterações na dinâmica do cálcio

intracelular que estão intimamente envolvidas nesse processo de falência do miocárdio (18, 74).

Como já visto, na via tradicional da sinalização β -adrenérgica, a $G_{\alpha s}$ /adenilil ciclase, a proteína quinase A (PKA) atua na fosforilação de diversas proteínas, incluindo: a) o canal de cálcio L-Type, b) fosfolambam que é uma proteína moduladora da SERCA, e c) proteínas do aparato contrátil como a troponina T. Alterações na fosforilação e/ou na expressão dessas proteínas podem resultar em alterações na dinâmica do cálcio intracelular e conseqüentemente na contração e relaxamento cardíaco, o que pode culminar na progressão da doença (75-77).

Observamos no presente trabalho, que os camundongos com insuficiência cardíaca (grupo S) apresentaram alterações na regulação do cálcio cardíaco, representadas principalmente por uma redução na expressão da proteína SERCA 2, bomba Ca^{2+} ATPase envolvida na recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, que pode resultar em um aumento na concentração do Ca^{2+} do citoplasma, prejudicando o relaxamento muscular cardíaco.

O treinamento físico, o tratamento farmacológico com metoprolol ou carvedilol ou a associação do treinamento físico ao tratamento com ambos os β -bloqueadores, aumentaram a expressão dessa proteína, com especial destaque para o grupo CT, que apresentou aumento de 52% em relação ao grupo S. Este resultado parece indicar um efeito potencializador do treinamento físico quando associado à terapia com carvedilol na expressão da proteína SERCA 2.

Um dos mecanismos que podem explicar essa resposta é a diminuição do estresse oxidativo, onde o β -bloqueador carvedilol, devido à sua propriedade química anti-oxidante, parece exercer mais efeitos, como já visto em estudo anterior do nosso grupo (18).

O aumento do estresse oxidativo, presente na insuficiência cardíaca, pode proporcionar um aumento da tensão diastólica, proteólise de miofilamentos e diminuição da contratilidade (78). Estes efeitos estão associados à sobrecarga de cálcio que é resultado, dentre outros fatores, de danos ao retículo sarcoplasmático.

Vários estudos tem mostrado uma redução da expressão da proteína SERCA 2 em consequência do aumento das concentrações de OH (79), além de uma diminuição da relação força-frequência do miocárdio depois da exposição a esse radical (78, 80). Estes estudos indicam que isso pode acontecer devido á prejuízos diretos ao retículo sarcoplasmático como resultado do aumento do estresse oxidativo.

Portanto, no presente trabalho, um provável mecanismo para esse aumento significativo na expressão da proteína SERCA 2 é um efeito mais efetivo da associação do treinamento físico ao β -bloqueador carvedilol na redução do estresse oxidativo.

Em relação à regulação da atividade da proteína SERCA 2a destacamos a participação da fosfoproteína fosfolambam (PLB). Esta é uma proteína de 52-aminoácidos sobre a membrana do retículo sarcoplasmático, que pode ser fosforilada nos aminoácidos Ser¹⁰, Ser¹⁶ e Tre¹⁷. Em seu

estado desfosforilado, o PLB inibe a SERCA 2. Com o aumento da estimulação adrenérgica e da atividade da PKA, esta inibição é liberada.

Estudos recentes mostram que a função da SERCA 2 é predominantemente regulada através da fosforilação do PLB no resíduo Ser¹⁶ (Chu, 2000) no PLB. Interessante observar, no presente trabalho, que o treinamento físico isoladamente proporcionou um aumento da fosforilação do PLB no resíduo Ser¹⁶. Quando verificamos os efeitos das terapias associadas, observamos o mesmo efeito de aumento da fosforilação nesse resíduo apenas no grupo que se submeteu à associação do treinamento físico com o β -bloqueador carvedilol.

Com isso, o aumento da expressão da proteína SERCA 2 associada ao aumento da fosforilação do PLB no resíduo da Ser¹⁶ parece indicar melhora nos mecanismos de recaptção de cálcio intracelular quando se integra o treinamento físico a terapia com carvedilol.

No resíduo Tre¹⁷ do PLB, a fosforilação ocorre predominantemente pela CaMKII. O aumento da atividade da CaMKII na IC, fosforilando o fosfolambam na treonina 17, tem sido relacionada á prejuízos na fração de ejeção e vazamento de cálcio pelo RS (81). Especula-se que o aumento na expressão dessa proteína possa ser um mecanismo compensatório para prevenir a completa falência contrátil (82). No presente estudo, de fato, observamos um aumento da fosforilação do PLB no resíduo Tre¹⁷ nos camundongos do grupo S (sem intervenção). Esta variável em conjunto com a remodelação cardíaca, diminuição de função sistólica e diminuição da

expressão da proteína SERCA 2, observada nesse grupo, pode indicar ativação de vias deletérias associadas à patologia.

Contudo, verificamos que o treinamento físico, do mesmo modo, aumentou a expressão do PLB fosforilado na Tre¹⁷, o aumento da atividade dessa proteína nesse resíduo se deu acompanhado de melhora da função sistólica, diminuição de colágeno cardíaco e aumento da expressão da proteína SERCA 2, ou seja, associado a efeitos benéficos.

Com isso, faz-se importante ressaltar que nem sempre a via da CAMKII está associada somente a efeitos deletérios. Sugere-se que a CaMK II, por exemplo, possa aumentar a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático pela fosforilação do PLB proporcionando uma aceleração do relaxamento frequência-dependente (83). Nessa mesma linha, Hagemann e colaboradores (84) mostraram um aumento frequência dependente da fosforilação do PLB na Tre¹⁷ em miócitos de ratos, independente da fosforilação da Ser¹⁶.

Alguns estudos têm mostrado, o aumento da fosforilação do PLB na Tre¹⁷ com o treinamento físico, tanto no músculo cardíaco (85), quanto no músculo esquelético (86) sugerindo uma via específica do treinamento físico associada à melhora na recaptação de cálcio. Isto também pode ser observado em estudo anterior do nosso laboratório (27), que utilizando o mesmo modelo de camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2a}/α_{2c} , verificou-se um aumento na fosforilação do PLB no resíduo da Tre¹⁷ após o treinamento físico, tanto em camundongos com IC quanto no grupo WT.

Por fim, a razão SERCA/ PLB, indicativo de recaptção de cálcio pelo RS, apresentou-se expressivamente aumentada no grupo CT, que, portanto, se relaciona ao aumento da expressão da SERCA e ao aumento da fosforilação do PLB observado neste grupo.

6. Conclusão

Em conjunto, nossos dados parecem sugerir que o treinamento físico potencializou os efeitos benéficos do tratamento com os β -bloqueadores, sendo os maiores benefícios observados quando o treinamento físico é associado ao carvedilol.

Referências Bibliográficas

1. Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. New aspects for the role of physical training in the management of patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2003 Jul;90(1):1-14.
2. Grimm D, Huber M, Jabusch HC, Shakibaei M, Fredersdorf S, Paul M, et al. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Mar;33(3):487-501.
3. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* 2000 Jan 7-21;86(1):51-8.
4. Katz AM. Evolving concepts of heart failure: cooling furnace, malfunctioning pump, enlarging muscle--Part I. *J Card Fail.* 1997 Dec;3(4):319-34.
5. Katz AM. Potential deleterious effects of inotropic agents in the therapy of chronic heart failure. *Circulation.* 1986 Mar;73(3 Pt 2):III184-90.
6. Packer M. Prolonging life in patients with congestive heart failure: the next frontier. Introduction. *Circulation.* 1987 May;75(5 Pt 2):IV1-3.

7. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1984;311(13):819-23.
8. Packer M. Effects of beta-adrenergic blockade on survival of patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 1997 Dec 4;80(11A):46L-54L.
9. Veldkamp MW, Verkerk AO, van Ginneken AC, Baartscheer A, Schumacher C, de Jonge N, et al. Norepinephrine induces action potential prolongation and early afterdepolarizations in ventricular myocytes isolated from human end-stage failing hearts. *Eur Heart J*. 2001 Jun;22(11):955-63.
10. Burger AJ, Aronson D. Activity of the neurohormonal system and its relationship to autonomic abnormalities in decompensated heart failure. *J Card Fail*. 2001 Jun;7(2):122-8.
11. Packer M, Antonopoulos GV, Berlin JA, Chittams J, Konstam MA, Udelson JE. Comparative effects of carvedilol and metoprolol on left ventricular ejection fraction in heart failure: results of a meta-analysis. *Am Heart J*. 2001 Jun;141(6):899-907.
12. Baran D, Horn EM, Hryniewicz K, Katz SD. Effects of beta-blockers on neurohormonal activation in patients with congestive heart failure. *Drugs*. 2000 Nov;60(5):997-1016.
13. Khattar RS. Effects of ACE-inhibitors and beta-blockers on left ventricular remodeling in chronic heart failure. *Minerva Cardioangiol*. 2003 Apr;51(2):143-54.

14. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*. 1986;59(3):297-309.
15. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998 May;31(6):1352-6.
16. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*. 1998 Dec;40(3):426-32.
17. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*. 1998 Feb;19 Suppl B:B2-11.
18. Bartholomeu JB, Vanzelli AS, Rolim NP, Ferreira JC, Bechara LR, Tanaka LY, et al. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Aug;45(2):240-9.
19. Adamopoulos S, Ponikowski P, Cerquetani E, Piepoli M, Rosano G, Sleight P, et al. Circadian pattern of heart rate variability in chronic heart failure patients. Effects of physical training. *Eur Heart J*. 1995 Oct;16(10):1380-6.

20. Negrao CE, Irigoyen MC, Moreira ED, Brum PC, Freire PM, Krieger EM. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 2):R365-70.
21. Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Mancia G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension.* 1994;23(3):294-301.
22. Roveda F, Middlekauff HR, Rondon MU, Reis SF, Souza M, Nastari L, et al. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Sep 3;42(5):854-60.
23. Fraga R, Franco FG, Roveda F, de Matos LN, Braga AM, Rondon MU, et al. Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol. *Eur J Heart Fail.* 2007 Jun-Jul;9(6-7):630-6.
24. Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L, et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Apr;29(5):1067-73.
25. Janssen TW, Dallmeijer AJ, van der Woude LH. Physical capacity and race performance of handcyclers. *J Rehabil Res Dev.* 2001 Jan-Feb;38(1):33-40.
26. Medeiros A, Rolim NP, Oliveira RS, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, et al. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium

handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol*. 2008 Jan;104(1):103-9.

27. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007 May 11;29(3):246-52.

28. Berridge MJ. The AM and FM of calcium signalling. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):759-60.

29. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1115-22.

30. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, et al. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):444-53.

31. Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998 Feb;37(2):290-9.

32. Meyer P, Lang MG, Flammer J, Luscher TF. Effects of calcium channel blockers on the response to endothelin-1, bradykinin and sodium nitroprusside in porcine ciliary arteries. *Exp Eye Res*. 1995 May;60(5):505-10.

33. Schwinger RH, Hoischen S, Reuter H, Hullin R. Regional expression and functional characterization of the L-type Ca^{2+} -channel in myocardium from patients with end-stage heart failure and in non-failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan;31(1):283-96.
34. Hajjar RJ, Muller FU, Schmitz W, Schnabel P, Bohm M. Molecular aspects of adrenergic signal transduction in cardiac failure. *J Mol Med.* 1998 Oct;76(11):747-55.
35. Lu L, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, et al. Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. *J Appl Physiol.* 2002 Apr;92(4):1524-30.
36. Mace LC, Palmer BM, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, et al. Influence of age and run training on cardiac $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *J Appl Physiol.* 2003 Nov;95(5):1994-2003.
37. Kubo H, Margulies KB, Piacentino V, 3rd, Gaughan JP, Houser SR. Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation.* 2001 Aug 28;104(9):1012-8.
38. Plank DM, Yatani A, Ritsu H, Witt S, Glascock B, Lalli MJ, et al. Calcium dynamics in the failing heart: restoration by beta-adrenergic receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jul;285(1):H305-15.

39. Todaka K, Wang J, Yi GH, Knecht M, Stennett R, Packer M, et al. Impact of exercise training on ventricular properties in a canine model of congestive heart failure. *Am J Physiol*. 1997 Mar;272(3 Pt 2):H1382-90.
40. Wang J, Yi GH, Knecht M, Cai BL, Poposkis S, Packer M, et al. Physical training alters the pathogenesis of pacing-induced heart failure through endothelium-mediated mechanisms in awake dogs. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2683-92.
41. Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Nov;283(5):H1838-45.
42. Packer M. Current perspectives on the design of phase II trials of new drugs for the treatment of heart failure. *Am Heart J*. 2000 Apr;139(4):S202-6.
43. Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, et al. Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):412-7.
44. Medeiro A, Vanzelli AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Brum PC. Effect of exercise training and carvedilol treatment on cardiac function and structure in mice with sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Sep;41(9):812-7.

45. Claessens AL, Lefevre J, Beunen G, Malina RM. The contribution of anthropometric characteristics to performance scores in elite female gymnasts. *J Sports Med Phys Fitness*. 1999 Dec;39(4):355-60.
46. Gava NS, Veras-Silva AS, Negrao CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995 Dec;26(6 Pt 2):1129-33.
47. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Aug;34(8):760-5.
48. Billat LV. Use of blood lactate measurements for prediction of exercise performance and for control of training. Recommendations for long-distance running. *Sports Med*. 1996 Sep;22(3):157-75.
49. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978 Dec;58(6):1072-83.
50. Li H, Wang J, Wilhelmsson H, Hansson A, Thoren P, Duffy J, et al. Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3467-72.

51. Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos Cruz J, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca^{2+} current. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 May;280(5):C1327-39.
52. Ferreira JC, Bacurau AV, Evangelista FS, Coelho MA, Oliveira EM, Casarini DE, et al. The role of local and systemic renin angiotensin system activation in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jan;294(1):R26-32.
53. Leenen FH. Cardiovascular consequences of sympathetic hyperactivity. *Can J Cardiol*. 1999 Mar;15 Suppl A:2A-7A.
54. Maron MS, Zenovich AG, Casey SA, Link MS, Udelson JE, Aeppli DM, et al. Significance and relation between magnitude of left ventricular hypertrophy and heart failure symptoms in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2005 Jun 1;95(11):1329-33.
55. Desai KH, Sato R, Schauble E, Barsh GS, Kobilka BK, Bernstein D. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol*. 1997;272(2 Pt 2):H1053-61.
56. Pina IL, Daoud S. Exercise and heart failure. *Minerva Cardioangiol*. 2004 Dec;52(6):537-46.
57. Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Albaloureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal

muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol.* 2009 May;106(5):1631-40.

58. Al-Nasser F, Yousufuddin M, Al-Nozha F, Anker SD, Coats AJ, Piepoli MF, et al. Effect of carvedilol on exercise tolerance in patients with chronic heart failure and a restrictive left ventricular filling pattern. *Am J Cardiol.* 2003 May 15;91(10):1281-3.

59. Gullestad L, Dolva LO, Soyland E, Kjekshus J. Difference between beta-1-selective and non-selective beta-blockade during continuous and intermittent exercise. *Clin Physiol.* 1988 Oct;8(5):487-99.

60. Barretto AC, Santos AC, Munhoz R, Rondon MU, Franco FG, Trombetta IC, et al. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients. *Int J Cardiol.* 2009 Jul 10;135(3):302-7.

61. Dyer AR, Persky V, Stamler J, Paul O, Shekelle RB, Berkson DM, et al. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol.* 1980 Dec;112(6):736-49.

62. Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS, Jr., Cupples LA. Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am Heart J.* 1987 Jun;113(6):1489-94.

63. Gillman MW, Kannel WB, Belanger A, D'Agostino RB. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am Heart J.* 1993 Apr;125(4):1148-54.

64. Oliveira RS, Ferreira JC, Gomes ER, Paixao NA, Rolim NP, Medeiros A, et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol*. 2009 Aug 1;587(Pt 15):3899-910.
65. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):316-21.
66. Meris A, Amigoni M, Uno H, Thune JJ, Verma A, Kober L, et al. Left atrial remodelling in patients with myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both: the VALIANT Echo study. *Eur Heart J*. 2009 Jan;30(1):56-65.
67. Udelson JE, Konstam MA. Relation between left ventricular remodeling and clinical outcomes in heart failure patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Card Fail*. 2002 Dec;8(6 Suppl):S465-71.
68. Yu CM, Bleeker GB, Fung JW, Schalij MJ, Zhang Q, van der Wall EE, et al. Left ventricular reverse remodeling but not clinical improvement predicts long-term survival after cardiac resynchronization therapy. *Circulation*. 2005 Sep 13;112(11):1580-6.
69. Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Jan;44(1):114-22.

70. Garcarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2009 Apr;53(4):708-14.
71. Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR, Jr., Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Apr;105(6):843-50.
72. Freimann S, Kessler-Icekson G, Shahar I, Radom-Aizik S, Yitzhaky A, Eldar M, et al. Exercise training alters the molecular response to myocardial infarction. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Apr;41(4):757-65.
73. Zheng H, Luo M, Shen Y, Ma Y, Kang W. Effects of 6 months exercise training on ventricular remodelling and autonomic tone in patients with acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J Rehabil Med*. 2008 Oct;40(9):776-9.
74. Mork HK, Sjaastad I, Sejersted OM, Louch WE. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr;296(4):H1069-79.
75. Leszek P, Szperl M, Klisiewicz A, Janas J, Biederman A, Rywik T, et al. Alteration of myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Na⁺-

Ca²⁺ exchanger expression in human left ventricular volume overload. *Eur J Heart Fail*. 2007 Jun-Jul;9(6-7):579-86.

76. Smith G. Matters of the heart: the physiology of cardiac function and failure. *Exp Physiol*. 2007 Nov;92(6):973-86.

77. Yasumura Y, Takemura K, Sakamoto A, Kitakaze M, Miyatake K. Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2003 Dec;9(6):469-74.

78. Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kogler H, Moller K, et al. Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circ Res*. 2002 May 17;90(9):988-95.

79. Flesch M, Maack C, Cremers B, Baumer AT, Sudkamp M, Bohm M. Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation*. 1999 Jul 27;100(4):346-53.

80. Janssen PM, Zeitz O, Hasenfuss G. Transient and sustained impacts of hydroxyl radicals on sarcoplasmic reticulum function: protective effects of nebivolol. *Eur J Pharmacol*. 1999 Feb 5;366(2-3):223-32.

81. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res*. 2005 Dec 9;97(12):1314-22.

82. Hook SS, Means AR. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:471-505.
83. Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 2):H703-12.
84. Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22532-6.
85. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Sep;43(3):354-61.
86. Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 2006 Aug 1;574(Pt 3):889-903.