RODRIGO DA SILVA FERMINO DE OLIVEIRA

**Efeito do treinamento físico nas adaptações
estruturais cardíacas em um modelo genético de
cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do grau
de mestre em ciências.

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

SÃO PAULO

2009

RODRIGO DA SILVA FERMINO DE OLIVEIRA

**Efeito do treinamento físico nas adaptações
estruturais cardíacas em um modelo genético de
cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do grau
de mestre em ciências.

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

SÃO PAULO

2009

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patricia Chakur Brum, por ter me aceito como seu aluno e ter acreditado no meu trabalho, pelos ensinamentos, pela dedicação, cautela e carinho na orientação desse trabalho. Em especial, além do profissionalismo, o companheirismo e preocupação pessoal com seus alunos.

À Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira e Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires por fazerem parte do mesmo laboratório e colaborarem com nosso grupo nas ricas reuniões e colaborações científicas.

À Profa. Dra. Deborah Schechtman e Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot pelo auxílio e discussões metodológicas referentes a este projeto.

Ao colegas de laboratório, Valerio Garrone Barauna, Júlio Cesar Batista Ferreira, Natale Lage Pinheiro Rolim, Jan Bartholomeu Barbosa, Alessandra Medeiros, Aline Villa Nova Bacurau, Andréa Somolanji Vanzelli, Carlos Roberto Bueno Júnior (Cláudio), Nathalie Alves da Paixão, Telma Fátima da Cunha, Luiz Roberto Grassman Bechara, Camila Paixão Jordão, Leonardo Tanaka, Luís Gustavo Oliveira de Souza (Guga), Ellena Paulino, Marcelo Gomes Pereira, Jose Bianco Nascimento Moreira, Vanessa Azevedo Voltarelli, Flávio de Castro Magalhães (Parça), Stéphano Freitas Soares Melo, Diego Lopes Mendes Barreti, Everton Crivoi do Carmo, Cléber Rene, Tiago Fernandes, Úrsula Soci, Fernanda Roque Redondo, Eduardo Oliveira de Souza, pelos ensinamentos, discussões, auxílio e companhia durante este período.

À Professora Dra. Silvia Guatimosim, aos colegas Enéas Ricardo Moraes Gomes e Pedro William Machado de Almeida, pela recepção na Universidade Federal de Minas Gerais e a realização a realização de uma prazerosa e satisfatória colaboração científica.

As técnicas do laboratório, Katt de Coelho Mattos, Marcele Coelho de Almeida, Glória de Fátima Alves da Mota, Luciano Lopes, pelo auxílio técnico quando necessário e pelos ensinamentos.

Aos companheiros da Reps pelos momentos que passamos juntos.

A minha companheira Fernanda Pinheiro Bruno, pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários da Escola de Educação Física e Esporte e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela convivência durante esse processo.

A todas outras pessoas que contribuíram indiretamente para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa científica.

SUMÁRIO

Página

	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
	LISTA DE ANEXOS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Insuficiência cardíaca.....	3
2.2	Hipertrofia cardíaca.....	4
2.3	Sinalização intracelular pela via da calcineurina no remodelamento cardíaco em doenças cardíacas.....	6
2.4	Estratégias terapêuticas.....	8
2.5	Inativação gênica dos receptores α_{2a}/α_{2c} -adrenérgicos como modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.....	10
3.	OBJETIVOS.....	13
3.1	Geral.....	13
3.2	Específicos.....	13
4.	MÉTODOS.....	15
4.1	Amostra.....	15

4.2	Genotipagem.....	15
4.3	Teste de tolerância ao esforço e protocolo de treinamento físico.....	16
4.4	Tratamento com ciclosporina.....	17
4.5	Ecocardiograma.....	17
4.6	Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos.....	18
4.6.1	Deslocamento cervical.....	19
4.6.1.1	Expressão gênica.....	20
4.6.1.1.1	Extração de RNA.....	20
4.6.1.1.2	RT-PCR.....	21
4.6.1.2	Expressão de proteínas.....	22
4.6.1.2.1	Homogêinizado de proteínas.....	22
4.6.1.2.2	Separação de extratos citoplasmáticos e nucleares.....	22
4.6.1.2.3	<i>Western Blot</i>	24
4.6.1.3	Imunolocalização de proteínas por fluorescência.....	25
4.6.1.3.1	Isolamento e preparação dos corações dos camundongos para imunofluorescência.....	25
4.6.1.3.2	Isolamento dos cardiomiócitos.....	26
4.6.1.3.3	Imunofluorescência por microscopia confocal.....	26
4.6.2	Sacrifício pela técnica de perfusão tecidual.....	27
4.6.2.1	Preparação dos tecidos para análise histológica.....	27
4.6.2.2	Diâmetro transversal de cardiomiócitos.....	29
4.7	Análise estatística.....	29
5.	RESULTADOS.....	30

5.1.	TREINAMENTO FÍSICO.....	30
5.1.1	Efeito do treinamento físico sobre a tolerância ao esforço e função cardíaca.....	30
5.1.2	Efeito do treinamento físico sobre a estrutura cardíaca.....	33
5.1.3	Efeito do treinamento físico sobre a via de sinalização intracelular da calcineurina nas adaptações estruturais cardíacas.....	38
5.2	TRATAMENTO COM CICLOSPORINA.....	43
5.2.1	Efeito do tratamento com ciclosporina sobre a tolerância ao esforço e função cardíaca.....	43
5.2.2	Efeito do tratamento com ciclosporina sobre a estrutura cardíaca.....	46
5.2.3	Efeito do tratamento com ciclosporina sobre a via de sinalização intracelular da calcineurina nas adaptações estruturais cardíacas.....	47
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÃO.....	60
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Diâmetro diastólico final (DDVE) e diâmetro sistólico final (DSVE) do ventrículo esquerdo dos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Ilustração esquemática do papel da calcineurina na hipertrofia cardíaca.....	7
FIGURA 2 - Controles positivos para verificação da eficiência do protocolo de fracionamento sub-celular para extratos citoplasmáticos (troponina I) e nucleares (Laminina B).....	23
FIGURA 3 - Distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo, razão peso úmido/peso seco dos pulmões e fração de encurtamento nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	32
FIGURA 4 - Massa dos átrios, ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tibia, diâmetro transverso dos cardiomiócitos nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	36
FIGURA 5 - Expressão gênica da β -MHC nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	37
FIGURA 6 - Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização da calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	40
FIGURA 7 - Distribuição subcelular de NFATc3 por imunofluorescência em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	41
FIGURA 8 - Distribuição subcelular de GATA-4 por imunofluorescência em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	42

FIGURA 9 -	Distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo, razão peso úmido/peso seco dos pulmões e fração de encurtamento nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	45
FIGURA 10 -	Massa dos átrios, ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tibia nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT), α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	47
FIGURA 11 -	Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização da calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	49

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO I - Tabela com dados da distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	69
ANEXO II - Tabela com dados da razão peso úmido/peso seco dos pulmões nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	70
ANEXO III - Tabela com dados da fração de encurtamento nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	71
ANEXO IV - Tabela com dados do diâmetro diastólico final (DDVE) do ventrículo esquerdo nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	72
ANEXO V - Tabela com dados do diâmetro sistólico final (DSVE) do ventrículo esquerdo nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	73
ANEXO VI - Tabela com dados da massa dos átrios normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	74
ANEXO VII - Tabela com dados da massa do ventrículo direito (VD) normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	75
ANEXO VIII - Tabela com dados da massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	76
ANEXO IX - Tabela com dados do diâmetro transversal dos cardiomiócitos nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	77

ANEXO X -	Tabela com dados da expressão gênica da β -MHC nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	78
ANEXO XI -	Tabela com dados da expressão da proteína calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	79
ANEXO XII -	Tabela com dados da expressão da proteína NFATc3 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	80
ANEXO XIII -	Tabela com dados da expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	81
ANEXO XIV -	Tabela com dados da distribuição subcelular da proteína NFATc3 por imunofluorescência em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	82
ANEXO XV -	Tabela com dados da distribuição subcelular da proteína GATA-4 por imunofluorescência em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).....	83
ANEXO XVI -	Tabela com dados da distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	84
ANEXO XVII -	Tabela com dados da razão peso úmido/peso seco dos pulmões nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	85

ANEXO XVIII -	Tabela com dados da fração de encurtamento nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	86
ANEXO XIX -	Tabela com dados do diâmetro diastólico final (DDVE) do ventrículo esquerdo pós o período experimental nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	87
ANEXO XX -	Tabela com dados do diâmetro sistólico final (DSVE) do ventrículo esquerdo pós o período experimental nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	88
ANEXO XXI -	Tabela com dados da massa dos átrios normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT), α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	89
ANEXO XXII -	Tabela com dados da massa do ventrículo direito (VD) normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT), α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	90
ANEXO XXIII -	Tabela com dados da massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tíbia nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT), α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	91
ANEXO XXIV -	Tabela com dados da expressão da proteína calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	92

ANEXO XXV	Tabela com dados da expressão da proteína NFATc3 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	93
ANEXO XXVI -	Tabela com dados da expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP	Peptídeo natriurético atrial
ANOVA	Análise de variância
AT1A	Isoforma I do receptor para angiotensina II
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cnb	Proteína calcineurina
Cobea	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Csa	Ciclosporina
DATASUS	Banco de dados do sistema único de saúde
DKO	Camundongos com dupla inativação gênica
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DKOT	Camundongos com dupla inativação gênica treinados
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DKO Csa	Camundongos com dupla inativação gênica tratados com ciclosporina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DTT	1,4-Dithiothreitol
EUA	Estados Unidos da America
FC	Frequência cardíaca
FS	Fração de encurtamento
IC	Insuficiência cardíaca
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Modo M	Modo monodimensional
H-Cl	Ácido clorídrico
H ₂ O DEPC	Água livre de RNases e DNAases
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta hidratado
Na ⁺	Íon sódio
NCX	Trocador sódio cálcio
NaCl	Cloreto de sódio
NFAT	<i>Nuclear factor activated of T cells</i>
NFATc2	<i>Nuclear factor activated of T cells isoforma c2</i>
NFATc3	<i>Nuclear factor activated of T Cells isoforma c3</i>
PCR	Cadeia de polymerase em cadeia
PP2B	Proteína-fosfatase calcineurina
PKA	Proteína cinase A
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERCA	ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático
SERCA2	Isoforma cardíaca da ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático
Ser ¹⁶	Resíduo serina 16
Ser ¹⁷	Resíduo serina 17
SNS	Sistema nervosa simpático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TpnI	Troponina I
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
β-MHC	Isoforma β de miosina de cadeia pesada
WT	<i>Wild type</i>
α _{2A} /α _{2C} ARKO	Camundongo com inativação gênica dos receptores α _{2A} /α _{2C} -adrenérgicos

UNIDADES

μm	Micrômetro (10^{-6})
mm	Milímetro (10^{-3})
m	Metro
h	hora
μg	Micrograma (10^{-6})
mg	Miligrama (10^{-3})
g	Grama
kg	Kilograma
μM	Micromolar (10^{-6})
mM	Milimolar (10^{-3})
M	Molar
μl	Microlitro (10^{-6})
ml	Militro (10^{-3})
rpm	Rotações por minuto
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
x g	Força G
%	Por cento
u.a.	Unidades arbitrárias
mHZ	Megahertz
mm hg	Milímetros de mercúrio
bpm	Batimentos por minuto
FC	Frequência cardíaca

Resumo

Oliveira RSF. Efeito do treinamento físico nas adaptações estruturais cardíacas em um modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 94p.

Introdução: A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica caracterizada por anormalidades da função do ventrículo esquerdo e regulação neuro-hormonal, associadas a hipertrofia cardíaca (HC). Dentre as vias intracelulares envolvidas na HC, a via dependente de cálcio calcineurina tem se demonstrado importante. O treinamento físico tem sido utilizado como tratamento coadjuvante de pacientes com IC, mas seu papel sobre a atividade da via da calcineurina relacionado a HC na IC ainda não foi estabelecido. Portanto, neste estudo avaliamos o efeito do treinamento físico sobre a via da calcineurina e sobre a HC em um modelo genético de IC induzida por hiperatividade simpática.

Métodos: Estudamos camundongos controle (WT) e com inativação gênica para os receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} ARKO) dos 5 aos 7 meses, que foram divididos nos grupos WT (n=19), α_{2A}/α_{2C} ARKO (n=26) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinados (n=31). O treinamento físico aeróbico em esteira foi realizado durante 8 semanas, 5 vezes por semana por 1 hora. Foi avaliada a tolerância ao esforço pela distância total percorrida em um teste máximo até a exaustão em esteira, a função cardíaca pela fração de encurtamento por meio do ecocardiograma, a estrutura cardíaca pela massa cardíaca das câmaras cardíacas, diâmetro transverso dos cardiomiócitos por microscopia óptica, expressão gênica da β -MHC por RT-PCR, a expressão das proteínas calcineurina, NFATc3 e GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares por meio do *Western blot*, e a localização sub-celular das proteínas NFATc3 e GATA-4 por microscopia confocal. **Resultados:** Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram intolerância ao esforço, prejuízo na função cardíaca e alterações estruturais cardíacas observadas pelo aumento na massa do ventrículo esquerdo, do diâmetro transverso dos cardiomiócitos e da expressão gênica da β -MHC. Além disso, os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO não apresentaram diferenças na expressão da proteína calcineurina, mas apresentaram aumento na expressão das proteínas NFATc3 e GATA-4 nos extratos nucleares, como também um aumento na localização nuclear das proteínas NFATc3 e GATA-4 quando comparados ao grupo WT. Após o treinamento físico, os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram aumento na tolerância ao esforço e na função cardíaca, reversão parcial das alterações cardíacas observadas que foram acompanhadas por uma redução na expressão das proteínas NFATc3 e GATA-4 nos extratos nucleares, como também uma redução na localização das proteínas NFATc3 e GATA-4 no núcleo por microscopia confocal. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o treinamento físico é capaz de promover remodelamento cardíaco reverso com redução na participação da via intracelular da calcineurina e um menor agravamento da IC neste modelo genético de IC.

Descritores: hiperatividade simpática, exercício, cardiomegalia, insuficiência cardíaca.

Summary

Oliveira RSF. Effect of exercise training on structural cardiac adaptations in a genetic model of cardiomyopathy induced by sympathetic hyperactivity [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 94p.

Introduction: Heart failure (HF) is a clinical syndrome characterized by cardiac dysfunction associated with neuro-hormonal hyperactivity, which culminates in cardiac hypertrophy (CH). Among the intracellular pathways involved in CH associated with HF, the calcium-dependent calcineurin pathway has been demonstrated to take an important role. Exercise training has been used as adjuvant treatment of patients with IC, but its role on cardiac remodeling related with calcineurin pathway in CH of HF has not yet been studied yet. Therefore, in the present study we evaluated the effect of exercise training on the calcineurin pathway and on CH in a genetic model of sympathetic hyperactivity induced HF. **Methods:** A cohort of male congenic α_{2A}/α_{2C} -ARKO mice in a C57BL6/J genetic background and their wild-type controls (WT) were studied from 5 to 7 months of age, and were randomly assigned into WT (n=19), α_{2A}/α_{2C} -ARKO (n=26) and α_{2A}/α_{2C} -ARKO trained (n=31) groups. Treadmill aerobic exercise training was performed over 8 wk, 5 times per wk for 1 hour. Exercise tolerance was evaluated by total distance covered in treadmill maximal test until exhaustion, fractional shortening by echocardiogram, cardiac structure by mass of cardiac mass, and cardiomyocyte cross-sectional diameter by optical microscopy. β -MHC mRNA levels were evaluated by RT-PCR, and expression of calcineurin, NFATc3 and GATA-4 in cytoplasmatic and nuclear extracts were evaluated by Western blot. Indeed sub-cellular localization of NFATc3 and GATA-4 proteins were studied by confocal microscopy. **Results:** α_{2A}/α_{2C} -ARKO mice displayed exercise intolerance, cardiac dysfunction and structural cardiac alterations, which included increased left ventricle mass, myocyte cross-sectional diameter and increased β -MHC expression when compared to WT group. In addition, we observed alteration in calcineurin pathway associated with CH of α_{2A}/α_{2C} -ARKO mice, named increased NFATc3 and GATA-4 expression in nuclear extracts paralleled by increased nuclear localization of NFATc3 and GATA-4 by confocal microscopy when compared to WT group. Exercise training in α_{2A}/α_{2C} -ARKO mice improved exercise tolerance and cardiac function with a partial reversion of CH associated with reduced nuclear expression and localization of NFATc3 and GATA-4 when compared with WT mice. **Conclusions:** These data provide evidences for the anti-cardiac remodeling effect of exercise training in HF associated with reduced activation of calcineurin intracellular pathway.

Descriptors: sympathetic hyperactivity, exercise, cardiomegaly, heart failure.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é definida como uma deficiência na capacidade do coração em bombear sangue adequadamente em resposta às demandas sistêmicas, resultando em fadiga prematura, dispnéia, e/ou edema. Esse quadro é tipicamente induzido por uma série de estímulos, incluindo: hipertensão sustentada; infarto do miocárdio ou isquemia associada com doença arterial coronariana; insuficiência e estenose valvular; miocardite devido a agentes infecciosos; más formações congênitas; cardiomiopatias hipertrófica e dilatada; e cardiomiopatia diabética (Klein et al., 2003; Lips et al., 2003). Apesar dos grandes avanços no entendimento e no tratamento da insuficiência cardíaca nos últimos anos, esta síndrome continua sendo uma das maiores causas de morte na sociedade moderna. Estimativas baseadas na última década sugerem uma prevalência de cerca de 1-2% na população em geral e de 10% na população idosa (Tendera, 2005). Na Europa são 6,5 milhões de pacientes com insuficiência cardíaca e cinco milhões nos EUA (Tendera, 2005), onde se acredita num impacto econômico de mais de 100 bilhões de dólares por ano. No Brasil, segundo o DATASUS, do Ministério da Saúde, existem cerca de 6,4 milhões de pacientes com insuficiência cardíaca perfazendo um total de 90.000 óbitos por doenças do aparelho circulatório somente no ano de 2005.

Dentre as características da insuficiência cardíaca, destacam-se a redução na capacidade contrátil associada à hiperatividade de sistemas neurohormonais endógenos e a hipertrofia cardíaca, estando os últimos

relacionados a um mau prognóstico do paciente e mortalidade aumentada (Negrao et al., 2001; Katz, 2003) tornando-se alvos terapêuticos importantes na clínica da insuficiência cardíaca.

A seguir, discorreremos em maior detalhe sobre a fisiopatologia da IC, com enfoque no envolvimento da hiperatividade dos sistemas neurohormonais no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica caracterizada por anormalidades da função do ventrículo esquerdo e regulação neuro-hormonal que são acompanhadas por intolerância aos esforços, retenção de fluido e redução da longevidade (Packer, 1997). A insuficiência cardíaca resulta de anormalidades intrínsecas e extrínsecas no coração, acompanhadas por uma hiperatividade do sistema nervoso simpático clássica, resultando em uma deterioração progressiva da função cardíaca. O desenvolvimento da insuficiência cardíaca freqüentemente envolve uma lesão inicial no miocárdio, o que reduz o débito cardíaco e conduz a um aumento compensatório da atividade do sistema nervoso simpático. Uma exposição em curto prazo do coração ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático parece ser favorável, pois promove um aumento da freqüência cardíaca e da resposta contrátil do coração. Estas adaptações em curto prazo atuam como fator compensatório da disfunção nas fases iniciais do desenvolvimento da doença. No entanto, exposições crônicas às catecolaminas levam a uma elevação contínua da atividade simpática que contribui progressivamente para o dano no tecido miocárdico e deterioração da função cardíaca, desta maneira desenvolvendo um ciclo vicioso no desenvolvimento da IC. Os efeitos deletérios da hiperatividade simpática associam-se também a alterações na via de sinalização β -adrenérgica (Xiao et al., 2004) que além de estarem diretamente envolvidas no prejuízo funcional, desempenham também um papel importante nas alterações

estruturais cardíacas observadas na transição da hipertrofia cardíaca ainda em uma fase compensada, para uma hipertrofia cardíaca descompensada levando ao estágio final de insuficiência cardíaca (Lowes et al., 2002).

2.2 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia do miocárdio às sobrecargas hemodinâmicas é um processo adaptativo que tem como substrato histológico o aumento das dimensões dos miócitos cardíacos por uma ativação da síntese protéica (Dorn et al., 2003), que ulteriormente culminará em alterações na estrutura das câmaras cardíacas com ganho de massa. Esse ganho de massa cardíaca pode estar acompanhado ou não de repercussão hemodinâmica. Por isso, a hipertrofia cardíaca é comumente classificada em compensada ou descompensada, ou seja, com função cardíaca preservada ou disfunção cardíaca, respectivamente. No entanto, este ganho de massa é desencadeado no propósito de adequar a geometria do coração à tensão das paredes ventriculares durante a fase diastólica do ciclo cardíaco de acordo com a Lei de Laplace¹. Portanto, quando em fase descompensada, a hipertrofia cardíaca contribui para o agravamento e progressão da disfunção cardíaca uma vez que culminará em dilatação das câmaras cardíacas e progressão da insuficiência cardíaca (Sabbah, 2004).

¹ Lei de Laplace: Elaborada pelo filósofo e físico francês Pierre Simon Laplace (1749-1827) que estabelece a relação entre a pressão e a tensão em um corpo esférico. Assim, $T = PR/2e$, onde T=tensão, P=pressão, R=raio, e=espessura da parede. A equação estabelece que quanto maior o raio, maior a tensão na parede requerida para resistir a uma dada pressão interna do fluido.

Os principais estímulos desencadeantes da hipertrofia cardíaca são o mecânico e neuro-hormonal (Sadoshima & Izumo, 1997). Dentre os fatores neuro-hormonais envolvidos na hipertrofia cardíaca na insuficiência cardíaca, destacam-se a hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS), sistema renina angiotensina- aldosterona (SRAA) e aumento na endotelina-1 circulante que, em conjunto, estimulam várias vias intracelulares envolvidas nos efeitos tróficos sobre o miocárdio. Desta maneira, a exacerbação destes sistemas neuro-humorais pode alterar a função e estrutura cardíacas, por influenciar as concentrações intracelulares de cálcio e alterações nas concentrações desse íon levam a ativação de vias intracelulares associadas à disfunção e hipertrofia cardíacas. Alguns estudos têm demonstrado a presença de alterações no transiente de cálcio no remodelamento cardíaco associado à insuficiência cardíaca (Balke & Shorofsky, 1998; Shorofsky et al., 1999) tais como um prolongamento no decaimento de cálcio que leva a um aumento na disponibilidade de cálcio durante a diástole em portadores de insuficiência cardíaca (Gwathmey et al., 1987), o que de certo modo tem-se acreditado em potencializar a ativação de vias intracelulares cálcio-dependente associadas ao remodelamento cardíaco e IC. Dentre a grande variedade de vias envolvidas nesse processo, a via de sinalização da proteína-fosfatase calcineurina (PP2B) tem se destacado e, portanto discutiremos sobre essa via em maior detalhe a seguir.

2.3 Sinalização intracelular pela via da calcineurina no remodelamento cardíaco em doenças cardíacas

A via da calcineurina está apresentada na Figura 1. Esta via tem se demonstrado envolvida no remodelamento cardíaco da insuficiência cardíaca (Molkentin et al., 1998; Frey & Olson, 2003). A calcineurina é considerada uma enzima-chave envolvida no processo de hipertrofia cardíaca em doenças cardiovasculares (Olson & Williams, 2000), é uma serina/treonina fosfatase ativada pela cálcio-calmodulina, que defosforila o fator de transcrição NFAT do inglês *nuclear factor activated T cells* presente no citoplasma. A defosforilação do NFAT promove sua translocação para o núcleo celular onde ele: a) se liga diretamente ao DNA aumentando a transcrição gênica (Rao et al., 1997) e b) interage com GATA-4 (fator de transcrição composto por dois domínios dedos de zinco adjacentes que preferencialmente se ligam aos elementos da seqüência de nucleotídeos 5' (A/T)GATA(A/G) 3'), um regulador chave de genes cardíacos relacionados ao remodelamento cardíaco associado à insuficiência cardíaca (Molkentin et al., 1998; Vega et al., 2003) Sugere-se que essa ligação seja responsável por regular a re-expressão de genes fetais como β -miosina de cadeia pesada (MHC), receptor de angiotensina tipo 1A (AT1A), peptídeo natriurético atrial (ANP) e cerebral (BNP) (Molkentin & Olson, 1997) que são amplamente expressos em corações hipertrofiados sendo utilizados como marcadores da transição da hipertrofia compensada para a descompensada.

Portanto, o resultado da ativação da via da calcineurina é uma defosforilação do fator de transcrição NFAT e sua translocação ao núcleo

celular onde ocorre sua interação com o GATA-4 e DNA e aumento da expressão de genes da reprogramação fetal e hipertrofia cardíaca.

Figura 1 – Ilustração esquemática do papel da calcineurina na hipertrofia cardíaca. Sustentados aumentos de cálcio citosólico contribuem para ativação da calcineurina. A calcineurina quando ativada defosforila o fator de transcrição NFAT. O NFAT defosforilado se transloca para o núcleo onde interage com o fator de transcrição GATA-4 e causa transcrição gênica de genes fetais levando a hipertrofia cardíaca. $[Ca^{2+}]$ concentração de cálcio citosólico; Calmodulina, proteína calmodulina; Calcineurina, proteína calcineurina; NFAT, fator de transcrição NFAT; GATA-4, fator de transcrição GATA-4; β -MHC, isoforma β de miosina de cadeia pesada; ANP, peptídeo natriurético atrial; BNP, peptídeo natriurético cerebral; Ciclosporina, inibidor da proteína fosfatase calcineurina. Adaptado de (Zhang, 2002).

A importância da via da calcineurina na hipertrofia cardíaca foi demonstrada por estudos utilizando camundongos dominante-negativo para o gene da calcineurina e ruptura do gene do NFAT que apresentaram regressão na hipertrofia cardíaca em resposta a estenose aórtica (Bueno et al., 2002; Wilkins et al., 2002). Portanto, esses dados confirmam o papel deletério da via da calcineurina na hipertrofia cardíaca observada em doenças cardiovasculares.

Além do envolvimento da via da calcineurina na hipertrofia cardíaca em modelos experimentais de doenças cardiovasculares, essa via está ativada em pacientes com insuficiência cardíaca, tanto em estágios iniciais (Diedrichs et al., 2007) como avançados da doença (Lim & Molkentin, 1999; Diedrichs et al., 2004; Diedrichs et al., 2007) o que demonstra a relevância clínica do estudo desta via no remodelamento cardíaco na síndrome da insuficiência cardíaca antes e após o uso de estratégias terapêuticas com o intuito de promover remodelamento cardíaco reverso e melhora na função contrátil.

2.4 Estratégias terapêuticas

Dentre as potenciais estratégias terapêuticas para a reversão do remodelamento cardíaco associado a esta via de sinalização hipertrófica o uso de agentes farmacológicos como a ciclosporina teve um grande destaque, a qual reconhecidamente se demonstrou eficaz em reverter a hipertrofia cardíaca em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (Sussman et al., 1998; Meguro et al., 1999; Lim et al., 2000). Este agente farmacológico impede a mudança conformacional da calcineurina, quando

ativada pela cálcio-calmodulina, para liberar o seu domínio catalítico, inibindo, portanto, sua atividade. Enquanto por um lado a ciclosporina seja eficaz em reverter a hipertrofia cardíaca, por outro promove efeitos colaterais adversos o que torna limitante o seu uso na clínica, uma vez que a calcineurina é constitutivamente expressa em diversos tecidos e sua inibição pode levar a diversas alterações fisiológicas, como o aumento da neurotoxicidade em neurônios hipocámpais e nefro-toxicidade na região glomerular do néfron.

Com base nessas limitações torna-se necessária a busca de novas medidas terapêuticas. Portanto, algumas intervenções não-farmacológicas, como o treinamento físico, têm sido recomendadas como adjuvantes ao tratamento farmacológico convencional de pacientes com insuficiência cardíaca. De fato, o treinamento físico aeróbico tem se demonstrado eficaz na redução da hiperatividade nervosa simpática (Roveda et al., 2003) assim como no aumento da atividade vagal cardíaca (Adamopoulos *et al.*, 1995; Roveda et al., 2003), em pacientes com insuficiência cardíaca o que minimizaria a hiperatividade dos sistemas neurohumorais na síndrome e regressão da hipertrofia cardíaca mesmo que parcial.

O efeito do treinamento físico sobre a via da calcineurina foi muito pouco investigado até o presente momento. Bourajjaj e colaboradores em 2008 promoveram a inativação gênica de NFATc2 em camundongos e observaram que houve regressão somente da hipertrofia associada à estenose aórtica e não em resposta ao treinamento físico aeróbico (corrida voluntária). No entanto, cabe ressaltar que embora o NFATc2 seja expresso

no tecido cardíaco essa isoforma tem uma contribuição menor na via da calcineurina sendo a isoforma NFATc3 a mais importante delas. Já em outro estudo, Wilkins e colaboradores em 2004 demonstraram que a ativação da via da calcineurina por gene repórter da luciferase conjugada ao NFAT ocorria somente na hipertrofia cardíaca promovida por estenose aórtica e não após o treinamento físico em camundongos.

Pelo exposto acima, a via da calcineurina parece estar envolvida na hipertrofia associada a situações patológicas, mas não após o treinamento físico em camundongos controle. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo investigou o potencial papel terapêutico do treinamento físico sobre a via da calcineurina em doenças do sistema cardiovascular.

2.5 Inativação gênica dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos como modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática

Com o advento de técnicas de DNA recombinante, modelos de animais geneticamente modificados foram produzidos com o intuito de mimetizar diversas condições patológicas e contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na origem e progressão de patologias.

Na presente dissertação utilizou-se camundongos com inativação genética dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos em *background* genético C57BL6.

Os receptores α_{2A} -adrenérgicos regulam a atividade simpática por meio de diferentes mecanismos. No bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores α_{2A} -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático. Quando ativados, estes receptores desencadeiam bradicardia e hipotensão (Altman et al., 1999). Em neurônios simpáticos periféricos ambos os receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos estão localizados no terminal pré-sináptico e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a noradrenalina (Hein et al., 1999) Quando ativados, eles inibem a liberação de noradrenalina pelo terminal nervoso simpático em que se encontram e por isso são denominados “autorreceptores”. Portanto, estes animais apresentam concentrações elevadas de noradrenalina plasmática (Hein et al., 1999) o que sugere uma hiperatividade do sistema nervoso simpático. Além disso, estes animais apresentam cardiomiopatia grave aos sete meses de idade associada a uma mortalidade aumentada (Brum et al., 2002) intolerância ao exercício físico com diminuição significativa na capacidade máxima de realização do exercício, exacerbação do sistema-renina-angiotensina-aldosterona cardíaco (Ferreira et al., 2008) edema pulmonar, redução na fração de encurtamento associada a alterações nos transientes de cálcio citosólico e na expressão de proteínas sarcolemas e do retículo sarcoplasmático que regulam o fluxo intracelular de cálcio (Rolim et al., 2007; Medeiros et al., 2008) e hipertrofia ventricular.

Portanto, os camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos constituem um ótimo modelo de insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática que propiciou o estudo da participação

relativa da via intracelular da calcineurina na regulação do trofismo cardíaco associada ao excesso de catecolaminas.

A hipótese testada no presente estudo foi a de que o treinamento físico aeróbio promoveria redução nas dimensões cardíacas por uma redução na ativação da via da calcineurina no tecido cardíaco dos camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos, constituindo-se, assim, em uma estratégia não-farmacológica coadjuvante na reversão da hipertrofia cardíaca associada à IC.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito do treinamento físico e do tratamento com ciclosporina nas adaptações estruturais cardíacas sobre a via de sinalização intracelular ativada por cálcio (via da calcineurina) em modelo genético de insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática.

3.2 Específicos

Estudar o efeito do treinamento físico em camundongos controle (WT) e com inativação gênica dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} ARKO) na faixa etária de cinco (início do treinamento físico) a sete (término do treinamento físico) meses de idade sobre:

- a tolerância à realização de esforço,
- a função ventricular,
- o remodelamento cardíaco,
- a expressão gênica de marcadores de remodelamento cardíaco,
- a expressão protéica, em fração citosólica e nuclear, de proteínas integrantes da via de sinalização da calcineurina, calcineurina B, NFATc3 e GATA-4,
- a localização subcelular das proteínas NFATc3 e GATA-4 em cardiomiócitos isolados.

Estudar o efeito do tratamento com ciclosporina em camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A}/α_{2C} -adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} ARKO) na faixa etária de sete (término do tratamento) meses de idade sobre:

- a tolerância à realização de esforço,
- a função ventricular,
- o remodelamento cardíaco,
- a expressão gênica de marcadores de remodelamento cardíaco,
- a expressão protéica, em fração citosólica e nuclear, de proteínas integrantes da via de sinalização da calcineurina, calcineurina B, NFATc3 e GATA-4.

4. MÉTODOS

4.1 Amostra

Para a realização do presente estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57/BL6 controle (WT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO de 20 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos em biotério com temperatura controlada entre 22 e 25°C e ciclo claro-escuro (12 horas) invertido, respeitando o ciclo biológico natural dos roedores. Água e comida (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR Brazil) foram administradas *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos: WT (n=19), α_{2A}/α_{2C} ARKO (n=26), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinados (n=31) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (n=17). A partir do quinto mês de idade, fase em que a cardiomiopatia encontra-se instalada foi dado início ao estudo experimental com duração total de dois meses, com exceção do grupo tratado com ciclosporina que teve seu tratamento com início aos seis meses de idade e duração de um mês. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo de número 174/06.

4.2 Genotipagem

Para a genotipagem dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO foi extraído o DNA genômico por meio da biopsia realizada na orelha esquerda dos animais, no mesmo instante em que foram anestesiados para a introdução do dispositivo eletrônico de identificação. O procedimento padrão para

extração do DNA genômico consistiu na digestão do tecido com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol. A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de um termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *sense* e *antisense* do sítio de inserção do gene que confere resistência à neomicina (neo). A amplificação do fragmento gênico de DNA permitiu a identificação dos genes intactos e com inativação gênica dos receptores $\alpha 2A$ e $\alpha 2C$ adrenérgicos.

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores $\alpha 2A$ -adrenérgicos:

WTA sense: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG3'

WTA antisense: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT3'

Neo/sense: 5' CGA GAT CCA CTA GTT CTA GCC TCG3'

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores $\alpha 2C$ -adrenérgicos:

WTC sense: 5' CAT CTT GTC CTC CTG CAT AGG CTC3'

WTC antisense: 5' TCT CAT CCG GCT CCA CTT CAG TG3'

Neo/sense: 5' GGG AGG ACA ATA GCA GGC ATG CTG3'

4.3 Teste de tolerância ao esforço e protocolo de treinamento físico

A capacidade a tolerância ao esforço foi estimada pela distância total percorrida, que foi avaliada em teste de exercício progressivo com protocolo escalonado. O teste foi iniciado com 6m/min e teve aumentos de 3m/min a cada 3 minutos até a exaustão. A capacidade física foi estimada antes do início do programa de treinamento físico, quatro semanas após o início do treinamento com o intuito de reajustar a intensidade de treino e ao término do treinamento físico. O treinamento físico foi realizado em esteira rolante motorizada por 8 semanas, 5 vezes por semana. A velocidade de corrida e a

duração do exercício físico foram aumentadas progressivamente para alcançar 60% da velocidade máxima obtida no teste de tolerância ao esforço e 60 minutos de duração (Ferreira et al., 2007).

4.4 Tratamento com ciclosporina

A administração da ciclosporina (*Sandimmun*, Novartis, 25mg/kg, 1vez/dia) foi feita via intra-peritoneal em um lote de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO em dose estabelecida no estudo-piloto. O tratamento teve duração de quatro semanas, tendo início aos seis meses e término aos sete meses de idade.

4.5 Ecocardiograma

A avaliação da função ventricular foi realizada por avaliação ecocardiográfica. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al., 1978). 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 confirmadas em uma série de estudos (Litwin et al., 1994). O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado antes e após o período de treinamento físico ou sedentarismo nos grupos estudados. Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente, as médias dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com halotano 1% com fluxo 100 ml/min (Litwin et al., 1994). O 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, CA, 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 ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL. Reedsville, EUA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal), ao nível dos músculos papilares, foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo, a espessura do septo interventricular na diástole (SIV Di), a espessura do septo interventricular na sístole (SIV Sis) e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PP Sis) e diástole (PP Di). Além dessas medidas, o equipamento utiliza fórmulas para cálculos de algumas variáveis, das quais utilizamos a fração de encurtamento (FS), calculada através da seguinte fórmula: $FS (\%) = [(DDVE - DSVE) / DDVE \times 100]$.

4.6 Sacrifício dos animais e coleta de tecidos

Após a finalização do período experimental, os animais foram sacrificados para a coleta de tecidos e posterior análise das variáveis de interesse. Dois métodos de sacrifício foram adotados, descritos nos itens 4.6.1 e 4.6.2.

4.6.1 Deslocamento Cervical

Vinte e quatro horas após o a última sessão de treino, uma parte dos animais foi sacrificada por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org). Em seguida, foi realizada a excisão dos corações. 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 VE. Logo em seguida, os VEs foram lavados em soro fisiológico, armazenados e tubos de 1,5ml e imediatamente mantidos em freezer -80°C para posterior processamento e utilização em experimentos para análise expressão protéica e expressão gênica.

Os pulmões também foram retirados e dissecados. Para isso, os pulmões foram lavados em soro fisiológico, secados em papel filtro, pesados em placas de Petri e logo após armazenados por 48h dentro de uma estufa à 37°C. Após este período, os pulmões foram pesados novamente, o que permitiu calcular a razão peso úmido/peso seco dos pulmões o que nos fornece uma estimativa do teor de água dos pulmões e possível presença de edema pulmonar nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade.

Os valores absolutos da massa (em gramas) dos átrios, do ventrículo direito, do ventrículo esquerdo, da massa total do coração e dos pulmões foram normalizados pelo comprimento da tíbia (em centímetros) para que fosse calculado o índice de hipertrofia cardíaca e edema pulmonar.

4.6.1.1 – Expressão gênica

4.6.1.1.1 – Extração do RNA

Para extração do RNA total, cerca de 50mg de tecido foi homogeneizado com o reagente TRIZOL (Gibco®) no polytron. O homogeneizado foi transferido para tubos de 1,5 ml e centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo 1,5 ml, onde foi adicionado 200ul de clorofórmio. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, recolocados na centrífuga e centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante ficou subdividido em três fases, sendo RNA, DNA e proteína respectivamente. O RNA foi retirado e transferido para novos tubos. Em temperatura ambiente, foi acrescentado 1 ml de álcool isopropílico. Novamente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 12000 rpm e 4°C. Foi observada a formação de um precipitado, o sobrenadante foi retirado e foi acrescentado 1 ml de etanol 75% para que o precipitado perdesse a aderência com o tudo. Os tubos foram centrifugados novamente por 5 minutos à 12000 rpm e 4°C. O etanol foi retirado dos tubos e quando seco, o precipitado foi ressuspenso em H₂O DEPC e os tubos foram deixados em agitação para dissolvê-lo.

Para confirmação da qualidade do processo de extração foi utilizada uma relação RNA/DNA, determinada no espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo somente utilizadas amostras que atingiram o intervalo de onde entre 1,6 a 2,0. A partir disto, foi verificada

a integridade do RNA em gel de agarose 1% não denaturante que foi corado com brometo de etídeo.

4.6.1.1.2 RT-PCR

O método de RT-PCR (Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction) foi adotado para a quantificação da expressão gênica inferida pelo RNAm da isoforma β da miosina de cadeia pesada (β -MHC), os experimentos foram normalizados pelo expressão gênica da β – actina.

Uma pequena alíquota (5 μ l) do RNA total foi submetida à técnica RT-PCR. Para isto, foi empregada a enzima transcriptase reversa SuperScriptTM Rnase H⁻ (Gibco BRL Products) em 20 μ l de reação contendo: 4 μ l do tampão fornecido pelo fabricante, 0,8 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 0,02 μ g/ μ l oligo-desoxitimidina *primer* (iniciador), 4 mM DTT. A reação foi realizada em termociclador (Perkin Elmer GeneAMP PCR System 2400, Norwalk CT). Para amplificação do cDNA das proteínas de interesse foram utilizados iniciadores (*primers*) já descritos na literatura e previamente padronizados em nosso laboratório, os quais estão descritos a seguir. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose à 1,0% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotografado pelo sistema de aquisição de imagem Kodak Digital ScienceTM Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120 e posteriormente, a densitometria das bandas foi quantificada no Kodak Digital ScienceTM 1D Image Analyses Software.

Primers utilizados:

β-MHC

Senso – 5' TGG CAA GAC GGT GAC TGT G 3'

Anti-senso – 5' CTC AAG GAG CGC TAC GCT T 3'

β-actina

Senso – 5' TCC CTG GAG AAG AGC TAT GA 3'

Anti-senso – 5' CCT TCC TTC TTG GGT ATG GA 3'

4.6.1.2 Expressão de proteínas

4.6.1.2.1 Homogeneizado de proteínas

A quantificação da expressão de proteínas CalcineurinaB, NFATc3, GATA-4 dos ventrículos esquerdos dos camundongos foi realizada pela técnica de *Western blot*. É importante ressaltar que, como as proteínas da via da calcineurina desempenham suas ações de acordo com sua localização em determinados sub-compartimentos da célula, foi necessária a padronização de um protocolo de fracionamento celular para levar em conta a expressão dessas proteínas nos compartimentos citosólico e nuclear.

4.6.1.2.2 Separação de extratos citoplasmáticos e nucleares

Para padronização do fracionamento celular, testamos sete protocolos diferentes, e dentre eles, somente um foi eficaz para separação dos extratos citoplasmáticos e nucleares como se pode observar na Figura 2. A eficácia do método de fracionamento foi testada pela técnica de Western blot após eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas do extrato nuclear e citosólico de tecido cardíaco de camundongos controle. Para isso, utilizaram-se anticorpos específicos para a proteína

citoplasmática, troponina I, e nuclear, laminina B, que foram utilizadas como controle positivo (Figura 2).

Figura 2 – Expressão protéica de troponina I (Tpn I) e laminina B em fração citosólica (cit) e nuclear (núc) de tecido cardíaco de camundongo.

Descrevendo em maior detalhe o protocolo de fracionamento padronizado e utilizado nesse estudo, cerca de 50mg dos ventrículos isolados foram homogeneizados com um pestilo em tubo de 1,5ml no gelo com tampão RIPA contendo: 50mM Tris-HCl (pH=7,4), 150mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 , coquetel de inibidores de proteases Sigma (1:300). O homogeneizado foi centrifugado em 100 xg por 5 min a 4°C. O sobrenadante, considerado como a fração celular livre de debris, foi transferido para novos tubos e centrifugado em 600 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado e utilizado como fração citosólica e deu-se continuidade no protocolo com o precipitado. O precipitado foi lavado com tampão RIPA para que os o extrato citosólico remanescente fosse retirado. O precipitado foi ressuspenso em 50µL de tampão RIPA com 0,3%SDS e DNase (1µg/ml) e permaneceu no gelo por 1 hora para digestão do DNA

remanescente na amostra. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi então reservado como fração nuclear livre de DNA. A concentração de proteína foi então determinada pelo ensaio colorimétrico do Bradford com leitura em uma absorbância de 405nm.

4.6.1.2.3 Western blot

As amostras de extratos citoplasmáticos e nucleares foram carregadas igualmente com 20µg de proteína em géis de poliacrilamida (10%). Após a eletroforese as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (BIORAD). As membranas foram então bloqueadas (5% de leite em pó desnatado, 10mM Tris-HCl (pH=7,6), 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) por três horas em temperatura ambiente. Em um próximo passo, foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-Laminina B (H300 – Sc5583, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA – 1:1000), e troponina I (C19 – Sc8118, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA, 1:1000) para os experimentos de controle positivo para os extratos nucleares e citoplasmáticos, respectivamente. Anticorpos anti-Calcineurina B (07-069, Upstate – NY, EUA) (1:1000), NFATc3 (M75 – Sc8321, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA-1:500), GATA-4 (G4 – Sc25310, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA - 1:500) foram para estudo da via da calcineurina e o anticorpo anti-GAPDH (V-18 - Sc-20357, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA – 1:1000) foi utilizado como normalizador interno dos experimentos, todos os anticorpos foram incubados por 12h a 4°C. As ligações dos anticorpos primários foram detectadas pela incubação com anticorpos

secundários conjugados com a enzima peroxidase, (camundongo 1:40000 para GATA-4, camundongo 1:5000 para troponina I e coelho 1:5000 para as demais proteínas) por 1h e 30 min em temperatura ambiente. As ligações dos anticorpos secundários foram detectadas por um ensaio de quimioluminescência (Amersham Biosciences) e expostas a filmes de raio-X (Amersham Biosciences). A expressão das proteínas foi analisada por densitometria das bandas de acordo com a intensidade do sinal quimioluminescente utilizando o programa computadorizado Image J (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/about.html>).

4.6.1.3 Imunolocalização de proteínas por fluorescência

4.6.1.3.1 Isolamento e preparação dos corações dos camundongos para imunofluorescência

Para demonstrar a presença do NFATc3 e GATA-4 nos corações dos camundongos com cardiomiócitos isolados, foram utilizados ensaios de imunofluorescência por microscopia confocal. Os animais foram decapitados, o tórax de cada um foi aberto e os corações foram rapidamente retirados e imediatamente foram refrigerados em um tampão preparado e mantido em baixa temperatura. Os corações foram perfundidos com a utilização de uma cânula no seio aórtico com solução de Krebs contendo: 118,4mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,2mM KH_2PO_4 , 1,2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 11,7mM glucose, e 26,5mM NaHCO_3 . A alta concentração de glicose foi administrada para garantir que a disponibilidade de nutrientes fosse mantida ao tecido cardíaco. O fluxo de perfusão (2.3–2.6mL/min) foi mantido de maneira constante em todos os experimentos à 37 ± 1 °C e a uma

constante oxigenação à (5% CO₂ e 95% O₂) (Castro *et al.*, 2005). Esses experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Silvia Guatimosim do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.6.1.3.2 Isolamento dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos ventriculares de camundongos foram enzimaticamente isolados como previamente descrito por Gomez e colaboradores em 1997, os corações já canulados foram colocados em um sistema Langendorff, onde foram perfundidos por 5 min com uma solução livre de cálcio contendo: 130mM NaCl, 5,4mM KCl, 0,5mM MgCl₂, 0,33mM NaH₂PO₄, 1mM lactato, 3mM piruvato, 22mM glicose e 25mM HEPES (pH = 7,4). Logo após, os corações foram perfundidos por 10-15 min com uma solução contendo 1mg/ml de collagenase tipo II (Worthington, EUA) e 0,17 mg/ml de protease tipo type IX (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, EUA). O coração digerido foi removido da cânula e os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços. Os cardiomiócitos foram isolados mecanicamente e armazenados em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro de albumina bovina e foram utilizados 2-3 horas após o isolamento.

4.6.1.3.3 Imunofluorescência por microscopia confocal

Os cardiomiócitos foram fixados em um tampão de paraformaldeído 2% (pH=7,2), contendo 150mM NaCl (PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foram incubados com solução bloqueadora permeabilizante contendo o tampão PBS com saponina 5mg/ml e 5% de BSA por 1h e incubados com anticorpo primário policlonal NFATc3 (M75 – Sc8321, Santa

Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA - 1:50), GATA-4 (G4 – Sc25310, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA - 1:50) por 24h à 4 °C. Após lavar por 4 vezes com PBS 5% BSA, os cardiomiócitos foram incubados com anticorpo secundário (ALEXA-488 — Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 1h em temperatura ambiente. Finalmente, os cardiomiócitos foram lavados por 4 vezes com PBS contendo 5% de BSA, e as lâminas foram confeccionadas com Anti-fade (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) que é um agente que protege a célula marcada com fluorescência de descorar. As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal Zeiss 510Meta com aumento de 630 vezes utilizando lente objetiva com imersão em óleo. O controle negativo foi realizado incubando os cardiomiócitos somente com o anticorpo secundário.

4.6.2 Sacrifício pela técnica de perfusão tecidual

4.6.2.1 Preparo dos Tecidos para Análise Histológica

Os animais foram anestesiados com pentobarbitol sódico (40 mg/Kg) através de injeção intraperitoneal. Posteriormente o tórax de cada animal foi aberto e o coração foi retirado. Para infusão da solução de perfusão, foi introduzida uma agulha hipodérmica descartável (30x7) no ventrículo esquerdo, sendo que o extravasamento do volume perfundido foi realizado por meio de uma incisão feita no átrio direito. Em seguida, os animais foram submetidos a 5 minutos de perfusão tecidual (pressão e fluxo constante, 80 a 90 mm Hg) com solução fisiológica e 14mM de KCl. Após a parada do coração em diástole, o mesmo foi perfundido com solução fisiológica durante 10 minutos para retirada adequada do sangue contido nos vasos e, logo

após, foi realizada a perfusão com solução 4% de formol tamponado durante 10 minutos para fixação completa dos tecidos.

4.6.2.2 Diâmetro transverso dos cardiomiócitos

Para verificar o índice de hipertrofia cardíaca, foram realizadas análises morfológicas e morfométricas dos cardiomiócitos. Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico, com cortes de 4 μ m e coloração por hematoxilina-eosina. A análise morfométrica cardíaca será realizada por meio da medida do diâmetro tranverso dos cardiomiócitos que foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500), com aumento de 400 vezes. Os miócitos 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 e utilizado para determinação do grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

A tolerância ao esforço e medidas ecocardiográficas dos grupos (efeito grupo) foi comparada pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas (pré e pós o período experimental de oito semanas-efeito tempo). A tolerância ao esforço e medidas ecocardiográficas do grupo tratado com ciclosporina, o peso das câmaras cardíacas, razão

peso úmido/peso seco dos pulmões, diâmetro dos cardiomiócitos, expressão gênica dos marcadores de hipertrofia, expressão protéica e a localização das proteínas cardíacas de todos os grupos foram comparadas pela análise de variância de um caminho com *post-hoc* de Duncan. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância um $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 TREINAMENTO FÍSICO

5.1.1 Efeitos do treinamento físico sobre a tolerância ao esforço e função cardíaca

Antes e após o período experimental de oito semanas foram realizados testes de tolerância ao esforço em esteira rolante, com o intuito de avaliar a distância total percorrida e verificar a capacidade de tolerância ao esforço dos camundongos WT, α_{2A}/α_{2C} ARKO e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinados. A distância percorrida durante teste nos diferentes grupos estudados pré e pós período experimental pode ser observada na Figura 3A. Foi observado efeito no grupo ($p<0,000$), no tempo ($p<0,000$) e interação entre os efeitos grupo e tempo ($p<0,000$). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram intolerância ao esforço quando comparados aos camundongos WT aos cinco meses de idade ($p=0,013$). Porém, o treinamento físico aumentou a tolerância ao esforço no grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade ($p<0,001$).

Após o período experimental de oito semanas, a razão peso úmido/peso seco dos pulmões foi avaliada com o intuito de verificar o teor de água nos pulmões (Figura 3B). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade apresentaram um maior teor de água nos pulmões quando comparados ao grupo WT ($p=0,010$), o que sugere edema pulmonar nestes animais. Após o treinamento físico os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram um melhor prognóstico associado a um menor edema pulmonar quando comparados ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,005$).

apresentando valores de razão peso úmido/peso seco semelhante ao do grupo WT ($p=0,280$).

O exame ecocardiográfico pré- e pós-período de treinamento físico foi realizado com o intuito de avaliar a função contrátil cardíaca dos diferentes grupos por meio da fração de encurtamento (FS), um índice de função sistólica (Figura 3C). Foi observado efeito grupo ($p<0,000$), uma tendência no tempo ($p=0,072$) e uma interação entre grupo em tempo ($p=0,032$). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentavam disfunção sistólica caracterizada por uma menor FS quando comparados aos camundongos WT aos cinco meses de idade ($p<0,001$). O treinamento físico restabeleceu a FS nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,050$) para valores semelhantes ao do grupo WT o que reflete a melhora na função contrátil desses animais aos sete meses de idade.

Figura 3 - Distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo (A), antes (□) e após (■) o período experimental, razão peso úmido/peso seco dos pulmões dos grupos (B) e fração de encurtamento antes (□) e após (■) o período experimental nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). * diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), & diferença significativa vs. pré-treinamento ($p < 0,05$), # diferença significativa vs. DKO.

5.1.2 Efeito do treinamento físico sobre a estrutura cardíaca

Por meio do ecocardiograma, foram avaliados os diâmetros diastólicos e sistólicos do ventrículo esquerdo para verificação de possíveis alterações estruturais cardíacas observadas na insuficiência cardíaca, como a dilatação das câmaras cardíacas, como demonstradas na Tabela 1.

Em relação ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, foi observado efeito no grupo ($p < 0,000$). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram aumento no diâmetro diastólico final quando comparado ao grupo WT aos cinco meses de idade ($p = 0,011$) e o treinamento físico não modificou significativamente as dimensões do diâmetro diastólico destes animais aos sete meses de idade quando comparados ao grupo WT ($p = 0,021$).

Em relação ao diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, foi observado efeito no grupo ($p < 0,000$), uma tendência de efeito no tempo ($p = 0,075$) e interação entre grupo e tempo ($p < 0,000$). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram aumento no diâmetro sistólico final quando comparados ao grupo WT aos cinco meses de idade ($p < 0,001$). O treinamento físico por sua vez não alterou as dimensões do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo destes animais, uma vez que camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO ainda apresentaram aumento no diâmetro sistólico aos sete meses de idade quando comparados ao grupo WT ($p < 0,000$).

Tabela 1 – Freqüência cardíaca (FC), diâmetro diastólico final (DDVE) e diâmetro sistólico final (DSVE) do ventrículo esquerdo pré- e pós o período experimental avaliados por meio do ecocardiograma dos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	FC	FC	DDVE	DDVE	DSVE	DSVE
	(bpm)	(bpm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
WT (n=9)	435±6	440±14	3,758±0,074	3,886±0,087	2,930±0,076	3,077±0,067
DKO (n=11)	430±12	409±10	4,025±0,050*	4,002±0,063*	3,442±0,064*	3,385±0,075*
DKOT (n=12)	416±16	398±10	4,055±0,050*	4,017±0,047*	3,450±0,038*	3,268±0,052*

*Diferença significativa vs. WT (p< 0,05).

Com o intuito de verificar se as alterações estruturais cardíacas por ecocardiograma refletiam sobre a massa do ventrículo esquerdo e diâmetro dos cardiomiócitos, a avaliação da massa cardíaca das câmaras cardíacas (átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo) corrigidas pela tibia e do diâmetro transverso dos cardiomiócitos foi realizada.

Em relação à massa cardíaca foi observado efeito no grupo (p=0,009) como pode ser observado na Figura 4A. De fato, dentre as câmaras cardíacas avaliadas, observou-se que a massa cardíaca do ventrículo esquerdo dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade estava aumentada quando comparada à dos camundongos WT (p=0,015). Já os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento não apresentaram

alterações em relação aos grupos WT ($p=0,454$). Portanto, estes resultados sugerem que o treinamento físico previne o aumento da massa cardíaca do ventrículo esquerdo dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO.

Em relação ao diâmetro dos cardiomiócitos foi observado efeito no grupo ($p<0,000$) como pode ser observado na Figura 4B. O aumento da massa cardíaca do ventrículo esquerdo nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO foi acompanhado de hipertrofia dos cardiomiócitos representada pelo aumento no diâmetro transversal dos cardiomiócitos quando comparado com os camundongos dos grupos WT ($p<0,000$). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento físico ainda apresentaram aumento do diâmetro transversal quando comparados ao grupo WT ($p<0,000$), mas apresentaram redução do diâmetro transversal dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p<0,000$), o que sugere uma redução parcial do diâmetro transversal dos cardiomiócitos após o treinamento físico.

Figura 4 – Massa dos átrios, ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tibia (A), diâmetro transversal dos cardiomiócitos (B) nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). * Diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), # Diferença significativa vs. DKO ($p < 0,05$).

Além dos dados morfológicos e morfométricos cardíacos, também avaliamos a expressão gênica da isoforma β de miosina de cadeia pesada (β -MHC) gene associado a reprogramação fetal e comumente associado a transição da hipertrofia compensada para descompensada e insuficiência

cardíaca. Foi observado efeito no grupo ($p=0,013$), como pode ser observado na Figura 5. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram aumento na expressão gênica de β -MHC quando comparados ao grupo WT ($p=0,023$). Interessante, após o treinamento físico os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram diminuição na expressão gênica de β -MHC quando comparados ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,023$) sendo essa similar a do grupo WT ($p=0,351$), o que sugere uma reversão na reprogramação fetal no grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento físico.

Figura 5 – Expressão gênica da β -MHC nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). * vs WT ($p < 0,05$), # vs DKO ($p < 0,05$).

Em conjunto, os dados referentes à análise da estrutura cardíaca nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO sugerem que esses animais apresentam hipertrofia cardíaca associada à disfunção cardíaca, intolerância aos esforços e edema pulmonar e o treinamento físico apresenta um potencial terapêutico eficaz em reduzir, ao menos parcialmente, as alterações estruturais cardíacas observadas.

5.1.3 Efeitos do treinamento físico sobre a via de sinalização intracelular da calcineurina nas adaptações estruturais cardíacas

Com o intuito de investigar as possíveis vias moleculares associadas às alterações estruturais cardíacas observadas nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, assim como avaliar o potencial terapêutico do treinamento físico sobre essas vias, demos continuidade ao presente estudo investigando a via da calcineurina. Portanto, para avaliar a contribuição relativa da via da calcineurina no remodelamento cardíaco em nosso modelo, quantificamos a expressão das proteínas calcineurina, NFATc3 e GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares por *Western blot*.

Em relação à expressão da proteína calcineurinaB, não foi observado nenhum efeito tanto nos extratos citoplasmáticos ($p=0,846$) como nucleares ($p=0,552$) nos diferentes grupos estudados como pode ser observado na Figura 6 A e B.

Em relação à expressão da proteína NFATc3, nos extratos citoplasmáticos foi observada uma tendência de efeito no grupo ($p=0,072$), mas nos extratos nucleares foi observado efeito no grupo ($p=0,003$) como pode ser observado na Figura 6 A e C. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO

apresentaram um significativo aumento na expressão de NFATc3 nos extratos nucleares quando comparados ao grupo WT ($p=0,045$). Além disso, os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento físico apresentaram uma significativa diminuição na expressão da proteína NFATc3 nos extratos nucleares quando comparados ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,024$). Estes dados sugerem uma translocação da proteína NFATc3 do sub-compartimento citosólico para o nuclear nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, e uma reversão desta resposta pelo treinamento físico.

Em relação à expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos não foi observado nenhum efeito entre os grupos estudados ($p=0,531$), mas nos extratos nucleares foi observado efeito no grupo WT ($p=0,014$) como pode ser observado na Figura 6A e D. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram um significativo aumento na expressão da proteína GATA-4 nos extratos nucleares quando comparados com o grupo WT ($p=0,007$). Após o treinamento físico, os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram uma significativa diminuição na expressão da proteína GATA-4 nos extratos nucleares quando comparados ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,020$). Estes dados sugerem um aumento na expressão da proteína GATA-4 no sub-compartimento nuclear, enquanto o treinamento físico a reduz para valores semelhantes aos do grupo WT.

Figura 6 – Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização da calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Autoradiografias representativas das expressões das proteínas estudadas (A), expressão da proteína CnB (B), NFATc3 (C) e GATA-4 (D). * Diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), # Diferença significativa vs. DKO ($p < 0,05$).

Adicionalmente à quantificação da expressão das proteínas da via da calcineurina, verificamos a localização subcelular das proteínas NFATc3 e GATA-4 pela imunofluorescência por microscopia confocal em cardiomiócitos isolados (Figura 7). Interessante, os resultados obtidos por imunofluorescência corroboraram os observados pela técnica de *Western blot*, ou seja, aumento no NFATc3 nuclear nos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO (~20%) quando comparados com o grupo WT e redução pelo treinamento físico (Figura 7B).

Figura 7 – Distribuição subcelular de NFATc3 por imunofluorescência por microscopia confocal em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Imunolocalização representativa de cada grupo de animais estudados (A) e representação gráfica dos dados obtidos para quantificação e tratamento estatístico (B) Controle (-) situação em que a incubação com o anticorpo primário foi omitida.

A imunolocalização nuclear da proteína GATA-4, nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO foi similar a encontrada pela técnica de *Western blot*, ou seja, maior nos α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentários, e reduzida pelo treinamento físico nos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO (Figura 7B).

Figura 8 – Distribuição subcelular de GATA-4 por imunofluorescência por microscopia confocal em cardiomiócitos isolados de camundongos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Imunolocalização representativa de cada grupo de animais estudados (A) e representação gráfica dos dados obtidos para quantificação e tratamento estatístico (B) Controle (-) situação em que a incubação com o anticorpo primário foi omitida.

Em conjunto, os dados referentes ao perfil molecular das proteínas da via da calcineurina nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO sugerem que esses animais apresentam hipertrofia cardíaca com participação significativa da via da calcineurina, e que o treinamento físico pode ser uma potencial estratégia terapêutica com pequeno mas significativo impacto sobre a estrutura cardíaca.

Com o intuito de comprovar o envolvimento da via da calcineurina no nosso modelo de insuficiência cardíaca e o potencial efeito do treinamento sobre esta via, utilizamos a estratégia de inibir a via da calcineurina com ciclosporina nos grupos estudados, resultados os quais serão demonstrados a seguir.

5.2 TRATAMENTO COM CICLOSPORINA

5.2.1 Efeito do tratamento com ciclosporina sobre a tolerância ao esforço e função cardíaca

Após o tratamento dos animais com ciclosporina por quatro semanas foram realizados testes de tolerância ao esforço em esteira rolante, com o intuito de verificar a capacidade de tolerância ao esforço nestes animais. Foi observado efeito no grupo ($p < 0,000$) como pode ser observado na Figura 9A. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina melhoraram a tolerância ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p < 0,000$). No entanto, esses animais ainda apresentavam intolerância ao esforço quando comparados aos camundongos WT aos sete meses de idade ($p = 0,017$). Estes dados

sugerem que o tratamento com ciclosporina pode promover um sutil aumento na tolerância ao esforço nos camundongos quando comparados ao grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO não tratado, mas não o suficiente para reverter a intolerância observada quando comparados ao grupo WT.

Após o tratamento com ciclosporina, observou-se diferença significativa (efeito no grupo, $p=0,005$) no teor de água dos pulmões (Figura 9B). De fato o tratamento com ciclosporina nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO reduziu o edema pulmonar nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,013$) sendo que a razão peso úmido/seco dos pulmões passou a ser semelhante a do grupo WT ($p=0,866$).

Na avaliação ecocardiográfica dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina foi observado efeito grupo ($p<0,001$) (Figura 9C). Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados melhoram a função contrátil quando comparados aos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,011$) que passou a ser semelhante a dos camundongos WT ($p=0,388$) α_{2A}/α_{2C} ARKO treinados.

Figura 9 - Distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo pós período experimental, razão peso úmido/peso seco dos pulmões dos grupos (B) e fração de encurtamento pós período experimental nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). * Diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), # Diferença significativa vs. pré-treinamento/tratamento ($p < 0,05$) & vs DKO ($p < 0,05$).

5.2.2 Efeito do tratamento com ciclosporina sobre a estrutura cardíaca

Para avaliação de possíveis alterações estruturais cardíacas nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina realizou-se o exame ecocardiográfico. O tratamento dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO com ciclosporina não alterou significativamente o diâmetro diastólico ($3,884 \pm 0,114$ vs. $4,002 \pm 0,063$, respectivamente) e sistólico ($3,078 \pm 0,311$ vs. $3,385 \pm 0,250$, respectivamente) finais quando comparados aos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO.

Em relação à avaliação da massa cardíaca foi observado efeito no grupo ($p=0,014$) como pode ser observado na Figura 10A. O efeito observado se refere ao aumento da massa do ventrículo esquerdo dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade quando comparados com os camundongos WT. Nós observamos que o tratamento com ciclosporina preveniu o aumento de massa cardíaca do ventrículo esquerdo observada nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, uma vez que os camundongos tratados apresentaram massa ventricular esquerda semelhante a do grupo WT ($p=0,497$).

Figura 10 – Massa dos átrios, ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tibia (A) nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT), α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). * Diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), # Diferença significativa vs. DKO ($p < 0,05$).

5.2.3 Efeito do tratamento com ciclosporina sobre as via de sinalização intracelular da calcineurina nas adaptações estruturais cardíacas.

Para avaliar a contribuição relativa da via da calcineurina no remodelamento cardíaco em nosso modelo, quantificamos a expressão das proteínas calcineurina, NFATc3 e GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina por *Western blot*.

Em relação à expressão da proteína calcineurinaB, não foi observado nenhum efeito tanto nos extratos citoplasmáticos ($p=0,717$) como nucleares ($p=0,543$) nos diferentes grupos estudados como pode ser observado na Figura 11A e B.

Em relação à expressão da proteína NFATc3 nos extratos citoplasmáticos, foi observada uma tendência de efeito no grupo ($p=0,081$), mas nos extratos nucleares foi observado efeito no grupo ($p=0,007$) como pode ser observado na Figura 11A e C. O efeito observado se refere às diferenças entre o grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO e α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento físico, uma vez que o tratamento não reduziu a expressão da proteína NFATc3 nos extratos nucleares nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,426$). Estes dados sugerem que a translocação da proteína NFATc3 do sub-compartimento citosólico para o nuclear observadas nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, não foi reduzida pelo tratamento com ciclosporina.

Em relação à expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos não foi observado nenhum efeito entre os grupos estudados ($p=0,897$), mas nos extratos nucleares foi observado efeito no grupo ($p=0,002$) como pode ser observado na Figura 11D. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados apresentaram uma significativa redução na expressão da proteína GATA-4 nos extratos nucleares quando comparados com o grupo α_{2A}/α_{2C} ARKO ($p=0,004$). Esses dados nos sugerem uma redução na expressão da proteína GATA-4 no sub-compartimento nuclear nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após o tratamento com ciclosporina.

Figura 11 – Perfil molecular de expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização da calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH dos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). Autorradiografias representativas das expressões das proteínas estudadas (A), expressão da proteína CnB (B), NFATc3 (C) e GATA-4 (D). * Diferença significativa vs. WT ($p < 0,05$), # Diferença significativa vs. DKO ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O treinamento físico e o tratamento com ciclosporina nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO:

- 1- Tiveram efeitos diferenciados sobre a tolerância ao esforço, onde o treinamento físico aumentou e o tratamento com não modificou a tolerância ao esforço;
- 2- Melhoraram a função contrátil cardíaca avaliada pela fração de encurtamento;
- 3- Reduziram o edema pulmonar;
- 4- Reduziram a massa cardíaca do ventrículo esquerdo para dimensões semelhantes ao grupo controle WT;
- 5- O treinamento físico reduziu parcialmente o diâmetro transversal dos cardiomiócitos;
- 6- O treinamento físico reduziu a expressão gênica de β -MHC;
- 7- Reduziram a participação da via da calcineurina no remodelamento cardíaco associado à hiperatividade simpática e insuficiência cardíaca sendo essa resposta relacionada a redução de ambos GATA4 e NFATc3 na fração nuclear pelo treinamento físico e somente redução do GATA4 nuclear pelo tratamento com ciclosporina.

A intolerância à realização de esforço tem sido considerada como um dos sintomas associados à insuficiência cardíaca sendo observada em portadores de doenças cardiovasculares (Hambrecht et al., 1997), além de estar associada à severidade da doença (Negrao et al., 2001). Além disso, o

teste de esforço tem sido comumente utilizado como diagnóstico ou prognóstico de doenças cardíacas, já que algumas anormalidades cardíacas são detectadas somente durante a realização de um exercício máximo até a exaustão. Entretanto, a intolerância ao esforço e os sintomas de fadiga e dispnéia observados na IC não estão somente relacionados à disfunção cardíaca observada na IC. Pelo contrário, a intolerância ao exercício físico está intimamente relacionada a anormalidades na função (Lipkin et al., 1988; Minotti et al., 1993), na estrutura (Mancini *et al.*, 1989; Sullivan et al., 1990) e no metabolismo da musculatura esquelética (Massie et al., 1987; Sullivan *et al.*, 1991).

Por meio da técnica de histoquímica para enzima ATPase, foram feitas avaliações estruturais da musculatura esquelética realizadas nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO aos sete meses de idade (Bacurau, 2006). Os principais resultados deste estudo realizado em nosso laboratório são que os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO nesta faixa etária possuem atrofia muscular com transição das fibras do tipo I para fibras do tipo II e rarefação capilar, alterações as quais pareceram ainda estar acompanhadas por mudança no perfil metabólico com redução da atividade de enzimas oxidativas e aumento na atividade de enzimas glicolíticas. Além da intolerância ao esforço estes animais apresentaram edema pulmonar evidenciado aos cinco e sete meses de idade (Ferreira, 2006). Índices de função sistólica, como fração de encurtamento e fração de ejeção são freqüentemente utilizados como fim de prognóstico e indicadores da progressão da IC (Frigerio & Roubina, 2005), uma vez que aumentos nestes parâmetros são interpretados com melhoria

no quadro da IC (Curtis *et al.*, 2003). Portadores de IC freqüentemente apresentam diminuições significantes e progressivas em índices de função contrátil com alterações estruturais cardíacas associadas a hiperatividade dos sistemas neuro-humorais. Desta maneira, os efeitos de uma persistente estimulação neuro-humoral sobre o remodelamento cardíaco e progressão da IC tem sido cada vez mais investigados (Barki-Harrington *et al.*, 2004) e a identificação de vias intracelulares específicas responsáveis pelos efeitos deletérios observados na IC tornam-se importantes alvos para o tratamento de pacientes com IC.

A disfunção cardíaca está intimamente relacionada a alterações na homeostasia de cálcio cardíaco, com redução na expressão de SERCA2 que pode promover uma menor recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático durante a fase diastólica dificultando o relaxamento cardíaco, o que conseqüentemente promoverá extrusão de cálcio para o meio extracelular por meio do trocador sódio-cálcio (NCX) (Lindner *et al.*, 1998; Pogwizd *et al.*, 2001; Shannon *et al.*, 2003), ao que culminará em depleção nos estoques intracelulares de cálcio que indubitavelmente reduzirá a eficiência contrátil em ciclos cardíacos subseqüentes. As alterações na homeostasia de cálcio na insuficiência cardíaca ativam a via da proteína fosfatase calcineurina (Dolmetsch *et al.*, 1997; Crabtree, 1999). De fato, a calcineurina pode prejudicar a atividade da SERCA2 no seu papel como bomba recaptadora de cálcio no retículo sarcoplasmático (Munch *et al.*, 2002), assim como se opor a fosforilação via proteína cinase A (PKA)

dos controladores de atividade da SERCA2, o fosfolambam (Sulakhe et al., 1997; Santana et al., 2002).

Em estudos realizados previamente no nosso laboratório foi demonstrado que os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram redução na função cardíaca acompanhada por alterações na homeostase de cálcio (Rolim et al., 2007; Rolim, 2007; Medeiros *et al.*, 2008). Assim, estas alterações podem ser consideradas em parte responsáveis pelo prejuízo na resposta contrátil destes animais. No presente estudo, o treinamento físico nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO melhorou a tolerância ao esforço e a função cardíaca além de reduzir o edema pulmonar. Esses resultados sugerem que o treinamento físico melhorou a capacidade física e função cardíaca destes animais. O aumento na tolerância ao esforço era esperado, uma vez que tem sido observadas após um programa de treinamento físico melhoras nas respostas oxidativas no músculo esquelético (Hambrecht et al., 1997), assim como aumento no fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética (Roveda et al., 2003), e diminuição da rarefação vascular observada na IC (Hambrecht et al., 1997), fatores que em conjunto podem contribuir para um maior aporte de nutrientes e oxigênio para a musculatura esquelética. Além dos fatores periféricos, a melhora da função ventricular observada também pode ter contribuído para a melhora na tolerância aos esforços, pela maior eficácia no bombeamento de sangue para tecidos periféricos (Sullivan et al., 1989). A melhora na função cardíaca dos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após o treinamento físico corroborou os estudos previamente realizados em nosso laboratório (Rolim et al., 2007; Rolim,

2007; Medeiros et al., 2008), onde a melhora na função contrátil estava relacionada à homeostasia de cálcio cardíaco com aumento na expressão de SERCA2, na fosforilação do fosfolambam nos resíduos de Ser¹⁶ e Thr¹⁷ e aumento nos transientes de cálcio.

Enquanto o treinamento físico teve impacto significativo na tolerância ao esforço nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, o tratamento com ciclosporina não promoveu ganho significativo. No entanto ao tratamento com ciclosporina melhorou significativamente a função contrátil e reduziu o edema pulmonar. Portanto, apesar de os ganhos funcionais terem sido de menor magnitude, a ciclosporina teve efeitos benéficos cardíacos nos camundongos com insuficiência cardíaca. Essa resposta era esperada, uma vez que a inibição da via da calcineurina pela ciclosporina também afeta a musculatura esquelética e por sua vez a tolerância ao esforço, uma vez que a mesma está implicada na manutenção e expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo oxidativo da musculatura esquelética (Handschin et al., 2003) e, portanto o bloqueio por ciclosporina leva a prejuízos musculares cruciais para o desempenho físico aeróbico relacionados a atrofia muscular e transição nas fibras do tipo para tipo II (Zbreski et al., 2006) o que de certo modo possa manter ou até promover ainda mais alterações na musculatura esquelética.

A melhora na função cardíaca após o tratamento com ciclosporina foi similar à observada com o treinamento físico. A melhora contrátil pela inibição da via da calcineurina pode estar relacionada a melhora no balanço de cálcio, uma vez que a inibição da proteína calcineurina com ciclosporina

melhorou a atividade β -adrenérgica cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (MacDonnell et al., 2007).

Em relação as alterações estruturais cardíaca observadas no presente estudo, a hipertrofia cardíaca foi confirmada por aumento da massa cardíaca e diâmetros diastólico e sistólico finais em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO. Tanto o treinamento físico como o tratamento com ciclosporina reduziram apenas parcialmente a dilatação das câmaras nesses animais aos sete meses de idade. Esses dados corroboraram dados prévios do nosso grupo (Bartholomeu et al., 2008) em animais na mesma faixa etária, que observou redução parcial mas significativa na massa cardíaca após o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações. Como a ecocardiografia sofre influência de algumas variáveis como a frequência cardíaca basal e profundidade da anestesia, o que dificulta a detecção de pequenas variações nas dimensões cardíacas, nós realizamos medidas adicionais para o estudo da estrutura cardíaca como avaliação da massa cardíaca das câmaras cardíacas corrigidas pela tibia e diâmetro transverso dos cardiomiócitos. Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentaram aumento da massa cardíaca do ventrículo esquerdo e diâmetro transverso dos cardiomiócitos quando comparados ao grupo WT aos sete meses de idade. Interessante, o treinamento físico diminuiu a massa cardíaca do ventrículo esquerdo desses animais se equiparando ao grupo WT. Similarmente ao observado com o treinamento, o tratamento com ciclosporina também reduziu a massa cardíaca quando comparada ao grupo WT, corroborando desta maneira os achados na literatura (Sussman et al.,

1998; Meguro et al., 1999; Lim et al., 2000). Esses dados sugerem o envolvimento da via da calcineurina na hipertrofia cardíaca apresentada nesse modelo genético de insuficiência cardíaca e um potencial efeito do treinamento na inativação desta via.

Além dos dados morfológicos e morfométricos cardíacos, também avaliamos a expressão de genes envolvidos na reprogramação fetal (genes somente expressos em fases de desenvolvimento embrionário do tecido cardíaco e reprimidos no período pós-natal) que têm sido utilizados como marcadores moleculares da transição de hipertrofia compensada para insuficiência cardíaca (Hasegawa et al., 1997; Herzig et al., 1997; Sadoshima & Izumo, 1997; Thum et al., 2007). Dentre esses genes, destacam-se, o peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e a β -miosina de cadeia pesada (β -MHC). Observamos no presente estudo um aumento na expressão gênica da β -MHC nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO quando comparados com os camundongos WT aos sete meses de idade e o treinamento físico diminuiu a expressão gênica da β -MHC nesses animais. Esses resultados sugerem a re-expressão de genes marcadores de reprogramação fetal nesse modelo de insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática. Cabe também ressaltar o papel fundamental do treinamento físico em normalizar o perfil molecular de expressão deste gene. Além da β -MHC, demonstramos em estudo prévio do laboratório, um aumento na expressão de outro gene marcador de reprogramação fetal, o ANP, cuja expressão foi reduzida após o tratamento com metoprolol e carvedilol, antagonistas β -adrenérgicos de segunda e

terceira geração, respectivamente (Bartholomeu et al., 2008). Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento da via da calcineurina na hipertrofia observada nesse modelo genético de insuficiência cardíaca, e o treinamento físico parece reduzir as alterações estruturais observadas inibindo diretamente ou indiretamente esta via.

O envolvimento da via da calcineurina no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca já está bem estabelecido, e tem se observado o envolvimento da mesma tanto em modelos experimentais como em pacientes com IC em estágios iniciais (Diedrichs et al., 2007), ou avançados da síndrome (Lim & Molkentin, 1999; Diedrichs et al., 2004; Diedrichs et al., 2007). Dessa forma, o presente estudo foi relevante, pois demonstrou que estratégias terapêuticas não farmacológicas como o treinamento físico promovem remodelamento reverso parcial e melhora na função cardíaca. O envolvimento da via da calcineurina nesse modelo de insuficiência cardíaca foi comprovado com o tratamento com ciclosporina, que reconhecidamente, inibe a via da calcineurina. De fato, o tratamento com ciclosporina foi eficaz na reversão da hipertrofia em modelos experimentais (Sussman et al., 1998; Meguro et al., 1999; Lim et al., 2000). No entanto, seu uso clínico é restrito pelos efeitos colaterais da ciclosporina (Crespo-Leiro, 2005).

A utilização do treinamento físico como estratégia terapêutica não farmacológica promove redução da atividade neuro-humoral que está exacerbada na IC (Coats et al., 1992; Adamopoulos et al., 1995; Roveda et al., 2003). Estudos realizados previamente pelo nosso grupo corroboraram os achados na literatura, uma vez que os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO

apresentaram redução no tônus simpático assim como bradicardia em repouso após oito semanas de treinamento físico (Medeiros, 2006; Rolim, 2007). Portanto, o treinamento físico nesse modelo genético de insuficiência cardíaca, assim como em humanos, minimiza a hiperatividade dos sistemas neurohumorais na síndrome e promove regressão, mesmo que parcial, da hipertrofia cardíaca.

Alguns estudos investigaram a participação da via da calcineurina sob diferentes estímulos hemodinâmicos. No entanto, a ativação da via estava associada somente a estresses patológicos (ex. aumento de pós-carga) e não ao treinamento físico (Wilkins et al., 2004; Bourajaj et al., 2008). Cabe ressaltar que, embora os benefícios do treinamento físico sejam bastante conhecidos, essa estratégia foi muito pouco explorada na literatura com o intuito de inibir a ativação da via da calcineurina.

No presente estudo, observamos uma significativa participação da via da calcineurina nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, identificada por um aumento na expressão de NFATc3 e GATA-4 nos extratos nucleares e imunolocalização nuclear, corroborando achados da literatura (Diedrichs et al., 2004; Diedrichs et al., 2007). Após o treinamento físico, foi observada uma redução tanto na expressão de NFATc3 e GATA4 assim como na imunolocalização nuclear. O efeito do tratamento com ciclosporina foi restrito para a expressão de GATA-4, reduzida na fração nuclear. Esses dados sugerem que o treinamento físico é capaz de inibir desta via. Portanto, os achados deste estudo comprovaram a hipótese que o treinamento físico

apresentaria potencial terapêutico sobre a via da calcineurina em doenças do sistema cardiovascular.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o treinamento físico apresenta potencial terapêutico no remodelamento reverso cardíaco associado a redução na ativação da via da calcineurina em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOPOULOS, S., PONIKOWSKI, P., CERQUETANI, E., PIEPOLI, M., ROSANO, G., SLEIGHT, P. & COATS, A. J. (1995). Circadian pattern of heart rate variability in chronic heart failure patients. Effects of physical training. *Eur Heart J* **16**, 1380-1386.
- ALTMAN, J. D., TRENDLENBURG, A. U., MACMILLAN, L., BERNSTEIN, D., LIMBIRD, L., STARKE, K., KOBILKA, B. K. & HEIN, L. (1999). Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **56**, 154-161.
- BACURAU, A. V. N. (2006). Caracterização Fenotípica do músculo esquelético na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. *Dissertação (Mestrado em Educação Física) Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo*.
- BALKE, C. W. & SHOROFKY, S. R. (1998). Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **37**, 290-299.
- BARKI-HARRINGTON, L., PERRINO, C. & ROCKMAN, H. A. (2004). Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **63**, 391-402.
- BARTHOLOMEU, J. B., VANZELLI, A. S., ROLIM, N. P., FERREIRA, J. C., BECHARA, L. R., TANAKA, L. Y., ROSA, K. T., ALVES, M. M., MEDEIROS, A., MATTOS, K. C., COELHO, M. A., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E., RAMIRES, P. R., GUATIMOSIM, S. & BRUM, P. C. (2008). 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* **45**, 240-249.
- BOURAJJAJ, M., ARMAND, A. S., DA COSTA MARTINS, P. A., WEIJTS, B., VAN DER NAGEL, R., HEENEMAN, S., WEHRENS, X. H. & DE WINDT, L. J. (2008). NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *J Biol Chem* **283**, 22295-303.
- BRUM, P. C., KOSEK, J., PATTERSON, A., BERNSTEIN, D. & KOBILKA, B. (2002). Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1838-1845.
- BUENO, O. F., WILKINS, B. J., TYMITZ, K. M., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F., LORENZ, J. N. & MOKKENTIN, J. D. (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4586-4591.

- CASTRO, C. H., SANTOS, R. A., FERREIRA, A. J., BADER, M., ALENINA, N. & ALMEIDA, A. P. (2005). Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* **46**, 937-942.
- COATS, A. J., ADAMOPOULOS, S., RADAELLI, A., MCCANCE, A., MEYER, T. E., BERNARDI, L., SOLDA, P. L., DAVEY, P., ORMEROD, O., FORFAR, C. & ET AL. (1992). Controlled trial of physical training in chronic heart failure. Exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation* **85**, 2119-2131.
- CRABTREE, G. R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611-614.
- CRESPO-LEIRO, M. G. (2005). Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *Transplant Proc* **37**, 4018-4020.
- CURTIS, J. P., SOKOL, S. I., WANG, Y., RATHORE, S. S., KO, D. T., JADBABAIE, F., PORTNAY, E. L., MARSHALCO, S. J., RADFORD, M. J. & KRUMHOLZ, H. M. (2003). The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* **42**, 736-742.
- DIEDRICHS, H., CHI, M., BOELCK, B., MEHLHORN, U. & SCHWINGER, R. H. (2004). Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail* **6**, 3-9.
- DIEDRICHS, H., HAGEMEISTER, J., CHI, M., BOELCK, B., MULLER-EHMSSEN, J. & SCHNEIDER, C. A. (2007). Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium. *J Int Med Res* **35**, 803-818.
- DOLMETSCH, R. E., LEWIS, R. S., GOODNOW, C. C. & HEALY, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.
- DORN, G. W., 2ND, ROBBINS, J. & SUGDEN, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* **92**, 1171-1175.
- FERREIRA, J. C., BACURAU, A. V., EVANGELISTA, F. S., COELHO, M. A., OLIVEIRA, E. M., CASARINI, D. E., KRIEGER, J. E. & BRUM, P. C. (2008). 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* **294**, R26-32.
- FERREIRA, J. C., ROLIM, N. P., BARTHOLOMEU, J. B., GOBATO, C. A., KOKUBUN, E. & BRUM, P. C. (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 760-765.

- FERREIRA, J. C. B. (2006). Caracterização da participação do sistema renina angiotensina na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo).
- FREY, N. & OLSON, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* **65**, 45-79.
- FRIGERIO, M. & ROUBINA, E. (2005). Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. *Am J Cardiol* **96**, 10L-18L.
- GWATHMEY, J. K., COPELAS, L., MACKINNON, R., SCHOEN, F. J., FELDMAN, M. D., GROSSMAN, W. & MORGAN, J. P. (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* **61**, 70-76.
- HAMBRECHT, R., FIEHN, E., YU, J., NIEBAUER, J., WEIGL, C., HILBRICH, L., ADAMS, V., RIEDE, U. & SCHULER, G. (1997). 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* **29**, 1067-1073.
- HANDSCHIN, C., RHEE, J., LIN, J., TARR, P. T. & SPIEGELMAN, B. M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7111-7116.
- HASEGAWA, K., LEE, S. J., JOBE, S. M., MARKHAM, B. E. & KITSIS, R. N. (1997). cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* **96**, 3943-3953.
- HEIN, L., ALTMAN, J. D. & KOBILKA, B. K. (1999). Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* **402**, 181-184.
- HERZIG, T. C., JOBE, S. M., AOKI, H., MOLKENTIN, J. D., COWLEY, A. W., JR., IZUMO, S. & MARKHAM, B. E. (1997). Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7543-7548.
- KATZ, A. M. (2003). Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. *J Cell Mol Med* **7**, 1-10.

- KLEIN, L., O'CONNOR, C. M., GATTIS, W. A., ZAMPINO, M., DE LUCA, L., VITARELLI, A., FEDELE, F. & GHEORGHIAD, M. (2003). Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. *Am J Cardiol* **91**, 18F-40F.
- LIM, H. W., DE WINDT, L. J., STEINBERG, L., TAIGEN, T., WITT, S. A., KIMBALL, T. R. & MOLKENTIN, J. D. (2000). Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **101**, 2431-2437.
- LIM, H. W. & MOLKENTIN, J. D. (1999). Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* **5**, 246-247.
- LINDNER, M., ERDMANN, E. & BEUCKELMANN, D. J. (1998). Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 743-749.
- LIPKIN, D. P., JONES, D. A., ROUND, J. M. & POOLE-WILSON, P. A. (1988). Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* **18**, 187-195.
- LIPS, D. J., DEWINDT, L. J., VAN KRAAIJ, D. J. & DOEVENDANS, P. A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* **24**, 883-896.
- LITWIN, S. E., KATZ, S. E., MORGAN, J. P. & DOUGLAS, P. S. (1994). Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* **89**, 345-354.
- LOWES, B. D., GILBERT, E. M., ABRAHAM, W. T., MINOBE, W. A., LARRABEE, P., FERGUSON, D., WOLFEL, E. E., LINDENFELD, J., TSVETKOVA, T., ROBERTSON, A. D., QUAFIE, R. A. & BRISTOW, M. R. (2002). Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* **346**, 1357-1365.
- MACDONNELL, S. M., KUBO, H., HARRIS, D. M., CHEN, X., BERRETTA, R., BARBE, M. F., KOLWICZ, S., REGER, P. O., ECKHART, A., RENNA, B. F., KOCH, W. J., HOUSER, S. R. & LIBONATI, J. R. (2007). Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H3122-3129.
- MANCINI, D. M., COYLE, E., COGGAN, A., BELTZ, J., FERRARO, N., MONTAIN, S. & WILSON, J. R. (1989). Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation* **80**, 1338-1346.

- MASSIE, B. M., CONWAY, M., YONGE, R., FROSTICK, S., SLEIGHT, P., LEDINGHAM, J., RADDA, G. & RAJAGOPALAN, B. (1987). ³¹P nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* **60**, 309-315.
- MEDEIROS, A. (2006). Efeito do treinamento físico com natação na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos com ablação dos receptores α_2a/ α_2c -adrenérgicos. Tese (Doutorado em Educação Física) Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.
- MEDEIROS, A., ROLIM, N. P., OLIVEIRA, R. S., ROSA, K. T., MATTOS, K. C., CASARINI, D. E., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E. & BRUM, P. C. (2008). Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol* **104**, 103-109.
- MEGURO, T., HONG, C., ASAI, K., TAKAGI, G., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N. & VATNER, S. F. (1999). Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res* **84**, 735-740.
- MINOTTI, J. R., PILLAY, P., OKA, R., WELLS, L., CHRISTOPH, I. & MASSIE, B. M. (1993). Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure. *J Appl Physiol* **75**, 373-381.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J. R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228.
- MOLKENTIN, J. D. & OLSON, E. N. (1997). GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation* **96**, 3833-3835.
- MUNCH, G., BOLCK, B., KARCZEWSKI, P. & SCHWINGER, R. H. (2002). Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 321-334.
- NEGRAO, C. E., RONDON, M. U., TINUCCI, T., ALVES, M. J., ROVEDA, F., BRAGA, A. M., REIS, S. F., NASTARI, L., BARRETTO, A. C., KRIEGER, E. M. & MIDDLEKAUFF, H. R. (2001). Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1286-1292.

- OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-692.
- PACKER, M. (1997). Effects of beta-adrenergic blockade on survival of patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* **80**, 46L-54L.
- POGWIZD, S. M., SCHLOTTHAUER, K., LI, L., YUAN, W. & BERS, D. M. (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* **88**, 1159-1167.
- RAO, A., LUO, C. & HOGAN, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-747.
- ROLIM, N. P., MEDEIROS, A., ROSA, K. T., MATTOS, K. C., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E. & BRUM, P. C. (2007). Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics* **29**, 246-252.
- ROLIM, N. P. L. (2007). Efeito do treinamento físico em modelo genético de insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática. Tese (Doutorado em Educação Física, Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo).
- ROVEDA, F., MIDDLEKAUFF, H. R., RONDON, M. U., REIS, S. F., SOUZA, M., NASTARI, L., BARRETTO, A. C., KRIEGER, E. M. & NEGRAO, C. E. (2003). The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* **42**, 854-860.
- SABBAH, H. N. (2004). Effects of cardiac support device on reverse remodeling: molecular, biochemical, and structural mechanisms. *J Card Fail* **10**, S207-214.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* **59**, 551-571.
- SAHN, D. J., DEMARIA, A., KISSLO, J. & WEYMAN, A. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* **58**, 1072-1083.
- SANTANA, L. F., CHASE, E. G., VOTAW, V. S., NELSON, M. T. & GREVEN, R. (2002). Functional coupling of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* **544**, 57-69.

- SHANNON, T. R., POGWIZD, S. M. & BERS, D. M. (2003). Elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res* **93**, 592-594.
- SHOROFKY, S. R., AGGARWAL, R., CORRETTI, M., BAFFA, J. M., STRUM, J. M., AL-SEIKHAN, B. A., KOBAYASHI, Y. M., JONES, L. R., WIER, W. G. & BALKE, C. W. (1999). Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res* **84**, 424-434.
- SULAKHE, P. V., VO, X. T., MORRIS, T. E., PATO, M. D. & KHANDELWAL, R. L. (1997). Protein phosphorylation in rat cardiac microsomes: effects of inhibitors of protein kinase A and of phosphatases. *Mol Cell Biochem* **175**, 109-115.
- SULLIVAN, M. J., GREEN, H. J. & COBB, F. R. (1990). Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* **81**, 518-527.
- SULLIVAN, M. J., GREEN, H. J. & COBB, F. R. (1991). Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation* **84**, 1597-1607.
- SULLIVAN, M. J., KNIGHT, J. D., HIGGINBOTHAM, M. B. & COBB, F. R. (1989). Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. *Circulation* **80**, 769-781.
- SUSSMAN, M. A., LIM, H. W., GUDE, N., TAIGEN, T., OLSON, E. N., ROBBINS, J., COLBERT, M. C., GUALBERTO, A., WIECZOREK, D. F. & MOLKENTIN, J. D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* **281**, 1690-1693.
- TENDERA, M. (2005). Epidemiology, treatment, and guidelines for the treatment of heart failure in Europe. *European Heart Journal Supplements* **7**, j5-j9.
- THUM, T., GALUPPO, P., WOLF, C., FIEDLER, J., KNEITZ, S., VAN LAAKE, L. W., DOEVENDANS, P. A., MUMMERY, C. L., BORLAK, J., HAVERICH, A., GROSS, C., ENGELHARDT, S., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2007). MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **116**, 258-267.
- VEGA, R. B., BASSEL-DUBY, R. & OLSON, E. N. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* **278**, 36981-36984.

- WILKINS, B. J., DAI, Y. S., BUENO, O. F., PARSONS, S. A., XU, J., PLANK, D. M., JONES, F., KIMBALL, T. R. & MOLKENTIN, J. D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **94**, 110-118.
- WILKINS, B. J., DE WINDT, L. J., BUENO, O. F., BRAZ, J. C., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F. & MOLKENTIN, J. D. (2002). Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* **22**, 7603-7613.
- XIAO, R. P., ZHU, W., ZHENG, M., CHAKIR, K., BOND, R., LAKATTA, E. G. & CHENG, H. (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 358-365.
- ZBRESKI, M. G., HELWIG, B. G., MITCHELL, K. E., MUSCH, T. I., WEISS, M. L. & McALLISTER, R. M. (2006). Effects of cyclosporine-A on rat soleus muscle fiber size and phenotype. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 833-839.
- ZHANG, W. (2002). Old and new tools to dissect calcineurin's role in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **53**, 294-303.

ANEXOS –

ANEXO I - Tabela com dados da distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo, em (m), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT		DKO		DKOT	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	297	294	205	247	243	380
2	297	328	182	191	183	463
3	310	349	175	197	170	324
4	337	339	206	197	187	534
5	324	341	170	179	201	367
6	328	346	176	170	191	451
7	329	338	210	234	188	439
8	297	351	256	232	226	378
9	351	308			201	378
10					250	607
11					162	367
12					211	600
13					202	605
14					192	568
15					211	771
16					144	661
Média	319	333	197	206	199	413
Desvio padrão	20	20	28	28	28	130
Erro padrão	7	7	10	10	7	33

ANEXO II - Tabela com dados da razão peso úmido/peso seco dos pulmões, em (u.a.) nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	5,92	5,87	6,36
2	5,40	6,62	6,68
3	4,79	5,66	5,87
4	5,48	6,33	5,48
5	5,64	5,17	5,68
6	4,33	6,30	4,86
7	5,79	7,17	4,54
8	5,56		4,68
9	5,67		4,71
10	5,81		4,75
11	5,85		4,94
12	5,37		4,32
13	6,08		5,07
Média	5,57	6,44	5,27
Desvio padrão	0,50	1,01	0,72
Erro padrão	0,13	0,36	0,19

ANEXO III - Tabela com dados da fração de encurtamento, em (%), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT		DKO		DKOT	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	22,30	22,30	15,50	12,80	16,60	20,30
2	22,10	21,70	12,30	13,60	12,80	16,70
3	20,00	22,60	13,30	12,70	15,80	18,00
4	22,50	21,70	13,80	14,96	14,20	19,55
5	22,70	22,30	13,40	15,17	13,10	20,10
6	16,92	24,15	14,00	13,19	14,30	20,51
7	24,66	17,36	13,40	14,10	14,20	18,72
8	23,61	20,44	14,20	14,44	14,20	21,30
9	23,65	18,11	19,29	14,57	13,50	20,51
10			15,85	22,50	17,99	17,93
11			16,71	23,14	19,19	15,05
12					15,66	16,40
Média	22,05	21,18	14,71	15,56	15,13	18,76
Desvio padrão	2,32	2,19	1,99	3,68	1,98	1,96
Erro padrão	0,77	0,73	0,60	1,11	0,57	0,57

ANEXO IV Tabela com dados do diâmetro diastólico final (DDVE) final do

- ventrículo esquerdo avaliado por meio do ecocardiograma, em (mm), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT		DKO		DKOT	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	3,80	4,10	4,00	4,10	4,00	4,10
2	3,30	3,80	4,10	4,20	3,60	4,10
3	4,10	4,40	3,90	3,60	4,20	4,00
4	3,80	3,70	4,00	4,21	4,10	3,99
5	3,70	4,10	4,00	4,22	4,20	4,13
6	3,90	3,81	4,20	4,17	4,10	3,90
7	3,73	3,63	4,30	3,90	4,10	3,90
8	3,60	3,62	4,10	3,81	4,10	3,85
9	3,89	3,81	3,68	4,05	4,00	3,90
10			4,10	4,00	3,89	3,96
11			3,89	3,76	4,22	3,92
12					4,15	4,45
Média	3,76	3,89	4,02	4,00	4,06	4,02
Desvio padrão	0,22	0,26	0,17	0,21	0,17	0,16
Erro padrão	0,07	0,09	0,05	0,06	0,05	0,05

ANEXO V Tabela com dados do diâmetro sistólico final (DSVE) final do

- ventrículo esquerdo avaliado por meio do ecocardiograma, em (mm), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT		DKO		DKOT	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	2,90	3,20	3,40	3,50	3,40	3,30
2	2,60	3,00	3,60	3,70	3,20	3,40
3	3,30	3,50	3,40	3,20	3,60	3,30
4	3,00	2,90	3,40	3,58	3,50	3,21
5	2,80	3,20	3,50	3,58	3,60	3,30
6	3,24	2,89	3,60	3,62	3,50	3,10
7	2,81	3,00	3,80	3,35	3,50	3,17
8	2,75	2,88	3,50	3,26	3,50	3,03
9	2,97	3,12	2,97	3,46	3,50	3,10
10			3,45	3,10	3,19	3,25
11			3,24	2,89	3,41	3,33
12					3,50	3,72
Média	2,93	3,08	3,44	3,39	3,45	3,27
Desvio padrão	0,23	0,20	0,21	0,25	0,13	0,18
Erro padrão	0,08	0,07	0,06	0,08	0,04	0,05

ANEXO VI - Tabela com dados da massa dos átrios normalizados pela tíbia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	0,480	0,353	0,340
2	0,300	0,333	0,267
3	0,600	0,413	0,393
4	0,453	0,287	0,538
5	0,407	0,453	0,320
6	0,387	0,567	0,360
7	0,400	0,480	0,353
8	0,338	0,567	0,347
9	0,433		0,287
10	0,413		0,353
11			0,287
12			0,333
13			0,300
Média	0,421	0,432	0,344
Desvio padrão	0,082	0,104	0,074
Erro padrão	0,026	0,307	0,020

ANEXO VII - Tabela com dados da massa do ventrículo direito (VD) normalizado pela tíbia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	1,000	1,413	1,807
2	1,107	1,313	1,607
3	1,460	1,680	1,640
4	2,000	1,460	1,438
5	1,520	1,600	0,687
6	1,680	1,600	1,827
7	1,380	1,433	1,333
8	1,725	1,693	1,107
9	2,547		1,473
10	1,627		1,553
11			1,453
12			1,667
13			1,253
Média	1,607	1,524	1,450
Desvio padrão	0,442	0,138	0,342
Erro padrão	0,156	0,056	0,095

ANEXO VIII - Tabela com dados da massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizado pela tíbia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	5,340	6,260	5,687
2	5,200	6,353	5,527
3	5,367	5,580	6,027
4	5,333	6,513	5,631
5	6,273	6,487	4,873
6	6,147	6,660	6,313
7	4,760	6,440	6,187
8	6,188	7,833	6,387
9	6,607		5,393
10	5,180		5,987
11			6,127
12			6,800
13			6,447
Média	5,639	6,516	5,951
Desvio padrão	0,608	0,625	0,468
Erro padrão	0,215	0,255	0,130

ANEXO IX - Tabela com dados do diâmetro transverso dos cardiomiócitos, em (μm), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	17,20	19,98	18,12
2	17,60	19,97	18,50
3	17,33	20,34	17,90
4	16,45	19,43	18,45
5	17,32	20,43	18,34
6	16,22		
7	16,67		
Média	16,97	19,99	18,26
Desvio padrão	0,52	0,41	0,25
Erro padrão	0,20	0,18	0,11

ANEXO X - Tabela com dados da expressão gênica da β -MHC, em (% do controle), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT).

	WT	DKO	DKOT
1	94,89	125,09	121,57
2	99,39	107,05	105,23
3	103,91	120,56	105,10
4	108,54	108,54	107,75
5	93,27	100,20	107,44
6			97,71
Média	100	112,29	107,47
Desvio padrão	6,32	10,24	7,81
Erro padrão	2,83	4,58	3,19

ANEXO XI - Tabela com dados da expressão da proteína calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	121,07	66,56	72,28	65,87	60,87	83,79
2	103,81	115,52	105,02	100,46	126,63	119,83
3	82,61	119,95	108,86	57,34	70,60	124,01
4	106,84	108,53	99,95	94,56	91,39	68,90
5	80,62	107,24	87,39	102,91	107,54	109,12
6	70,15	67,65	111,34	88,66	97,96	109,50
7	112,72	96,12	63,97	112,08	116,00	78,40
8	135,87	103,23			77,97	86,51
9	91,18	129,97			129,97	
10	95,13	85,25				
Média	100,00	100,00	92,69	88,84	93,62	97,51
Desvio padrão	20,07	21,27	18,63	20,11	22,85	20,61
Erro padrão	6,35	6,72	7,04	7,60	8,08	7,29

ANEXO XII - Tabela com dados da expressão da proteína NFATc3 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	120,79	86,96	60,56	165,11	88,30	126,14
2	137,96	75,29	101,69	119,79	85,48	142,06
3	62,95	116,70	112,49	132,36	85,35	81,81
4	100,50	75,28	46,40	114,77	54,97	66,83
5	142,38	99,40	108,68	103,16	110,26	116,96
6	136,63	116,35	38,61	211,00	128,90	63,16
7	105,23	110,24	26,75	115,99	50,19	116,55
8	76,21	81,99	14,01	120,71	70,68	108,76
9	72,67	96,03	36,37	152,31	28,97	57,52
10	89,52	136,47	111,98	115,99	88,07	52,21
11	55,17	105,29			105,12	87,47
12					102,00	91,99
Média	100,00	100,00	65,75	135,12	83,19	92,62
Desvio padrão	31,37	19,34	38,95	32,61	28,12	29,44
Erro padrão	9,46	5,83	12,32	10,31	8,12	8,50

ANEXO XIII - Tabela com dados da expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	109,67	49,78	107,62	109,18	157,51	85,16
2	81,12	101,59	124,99	146,47	118,95	138,34
3	108,74	133,68	130,08	169,10	127,58	75,00
4	79,30	81,61	102,55	105,54	83,78	83,31
5	102,95	150,08	108,58	199,85	116,26	83,57
6	103,75	68,24	96,44	160,50	114,45	113,19
7	104,47	115,02			99,67	109,81
8					63,10	41,18
Média	100,00	100,00	111,71	148,44	110,17	91,19
Desvio padrão	13,98	35,92	13,10	36,33	28,51	29,21
Erro padrão	5,28	13,58	5,35	13,73	10,08	10,33

ANEXO XIV - Tabela com dados da distribuição subcelular de NFATc3 por imunofluorescência por microscopia confocal em cardiomiócitos isolados, em (%) de camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	97,50	2,50	24,30	75,70	97,60	2,40
2	100,00	0	100,00	0	100	0
3	100,00	0	97,80	2,20	100	0
4	100,00	0	60,00	40,00	100	0
5			88,00	12,00	100	0
6			100,00	0		
7			82,30	17,70		
Média	0,63	99,38	78,91	21,09	0,48	99,52
Desvio padrão	1,25	1,25	27,93	27,93	1,07	1,07
Erro padrão	0,63	0,63	10,56	10,56	0,48	0,48

ANEXO XV - Tabela com dados da distribuição subcelular de GATA-4 por imunofluorescência por microscopia confocal em cardiomiócitos isolados, em (%), de camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	15,80	84,20	51,40	48,60	95,40	4,60
2	30,00	70,00	10,89	89,20	12,20	87,80
3	0	100,00	37,50	62,50	36,40	63,60
4			50,00	50,00	8,50	91,50
5			0	100,00	53,00	47,00
6			38,90	61,10	93,75	6,25
7			10,00	90,00	58,00	42,00
8			15,80	84,20	66,60	33,30
Média	15,27	84,73	26,80	73,20	52,98	47,02
Desvio padrão	15,01	15,01	19,93	19,93	32,93	32,93
Erro padrão	8,66	8,66	7,05	7,05	11,64	11,64

ANEXO XVI - Tabela com dados da distância percorrida durante teste de tolerância ao esforço máximo, em (m), nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	294	247	380	315
2	328	191	463	243
3	349	197	324	254
4	339	197	534	235
5	341	179	367	235
6	346	170	451	252
7	338	234	439	191
8	351	232	378	212
9	308		378	293
10			607	
11			367	
12			600	
13			605	
14			568	
15			771	
16			661	
Média	333	206	413	248
Desvio padrão	20	28	130	38
Erro padrão	7	10	33	13

ANEXO XVII - Tabela com dados da razão peso úmido/peso seco dos pulmões, em (u.a.), nos grupos controle (WT SED), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	5,92	5,87	6,36	5,22
2	5,40	6,62	6,68	5,73
3	4,79	5,66	5,87	6,03
4	5,48	6,33	5,48	6,72
5	5,64	5,17	5,68	5,82
6	4,33	6,30	4,86	4,99
7	5,79	7,17	4,54	5,55
8	5,56		4,68	4,84
9	5,67		4,71	4,82
10	5,81		4,75	
11	5,85		4,94	
12	5,37		4,32	
13	6,08		5,07	
Média	5,57	6,44	5,27	5,52
Desvio padrão	0,50	1,01	0,72	0,63
Erro padrão	0,13	0,36	0,19	0,21

ANEXO XVIII - Tabela com dados da fração de encurtamento, em (%), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	22,30	12,80	20,30	21,43
2	21,70	13,60	16,70	24,39
3	22,60	12,70	18,00	22,58
4	21,70	14,96	19,55	16,67
5	22,30	15,17	20,10	19,51
6	24,15	13,19	20,51	20,00
7	17,36	14,10	18,72	15,00
8	20,44	14,44	21,30	24,32
9	18,11	14,57	20,51	15,79
10		22,50	17,93	
11		23,14	15,05	
12			16,40	
Média	21,18	15,56	18,76	19,97
Desvio padrão	2,19	3,68	1,96	3,55
Erro padrão	0,73	1,11	0,57	1,18

ANEXO XIX - Tabela com dados do diâmetro diastólico final (DDVE) do ventrículo esquerdo pós o período experimental avaliado por meio do ecocardiograma, em (mm), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	4,10	4,10	4,10	4,20
2	3,80	4,20	4,10	4,10
3	4,40	3,60	4,00	3,10
4	3,70	4,21	3,99	3,60
5	4,10	4,22	4,13	4,10
6	3,81	4,17	3,90	4,00
7	3,63	3,90	3,90	4,00
8	3,62	3,81	3,85	3,70
9	3,81	4,05	3,90	3,80
10		4,00	3,96	
11		3,76	3,92	
12			4,45	
Média	3,89	4,00	4,02	3,84
Desvio padrão	0,26	0,21	0,16	0,34
Erro padrão	0,09	0,06	0,05	0,11

ANEXO XX - Tabela com dados do diâmetro sistólico final (DSVE) do ventrículo esquerdo pós o período experimental avaliado por meio do ecocardiograma, em (mm), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO) e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	3,20	3,50	3,30	3,30
2	3,00	3,70	3,40	3,10
3	3,50	3,20	3,30	2,40
4	2,90	3,58	3,21	3,00
5	3,20	3,58	3,30	3,30
6	2,89	3,62	3,10	3,20
7	3,00	3,35	3,17	3,40
8	2,88	3,26	3,03	2,80
9	3,12	3,46	3,10	3,20
10		3,10	3,25	
11		2,89	3,33	
12			3,72	
Média	3,08	3,39	3,27	3,08
Desvio padrão	0,20	0,25	0,18	0,31
Erro padrão	0,07	0,08	0,05	0,10

ANEXO XXI - Tabela com dados da massa dos átrios normalizados pela tíbia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa)

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	0,480	0,353	0,340	0,333
2	0,300	0,333	0,267	0,333
3	0,600	0,413	0,393	0,293
4	0,453	0,287	0,538	0,413
5	0,407	0,453	0,320	0,400
6	0,387	0,567	0,360	0,560
7	0,400	0,480	0,353	0,400
8	0,338	0,567	0,347	0,387
9	0,433		0,287	
10	0,413		0,353	
11			0,287	
12			0,333	
13			0,300	
Média	0,421	0,432	0,344	0,390
Desvio padrão	0,082	0,104	0,074	0,081
Erro padrão	0,026	0,307	0,020	0,028

ANEXO XXII - Tabela com dados da massa do ventrículo direito (VD) normalizados pela tibia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	1,000	1,413	1,807	1,200
2	1,107	1,313	1,607	1,340
3	1,460	1,680	1,640	1,600
4	2,000	1,460	1,438	1,160
5	1,520	1,600	0,687	0,920
6	1,680	1,600	1,827	2,000
7	1,380	1,433	1,333	1,373
8	1,725	1,693	1,107	1,453
9	2,547		1,473	
10	1,627		1,553	
11			1,453	
12			1,667	
13			1,253	
Média	1,607	1,524	1,450	1,381
Desvio padrão	0,442	0,138	0,342	0,323
Erro padrão	0,156	0,056	0,095	0,114

ANEXO XXIII - Tabela com dados da massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizados pela tibia, em (mg), nos grupos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa).

	WT	DKO	DKOT	DKO Csa
1	5,340	6,260	5,687	6,760
2	5,200	6,353	5,527	5,807
3	5,367	5,580	6,027	5,933
4	5,333	6,513	5,631	5,960
5	6,273	6,487	4,873	5,033
6	6,147	6,660	6,313	5,513
7	4,760	6,440	6,187	5,567
8	6,188	7,833	6,387	6,080
9	6,607		5,393	
10	5,180		5,987	
11			6,127	
12			6,800	
13			6,447	
Média	5,639	6,516	5,951	5,843
Desvio padrão	0,608	0,625	0,468	0,497
Erro padrão	0,215	0,255	0,130	0,176

ANEXO XXIV - Tabela com dados da expressão da proteína calcineurina (CnB) nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT		DKO Csa	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	121,07	66,56	72,28	65,87	60,87	83,79	135,29	84,35
2	103,81	115,52	105,02	100,46	126,63	119,83	65,69	73,80
3	82,61	119,95	108,86	57,34	70,60	124,01	123,60	67,84
4	106,84	108,53	99,95	94,56	91,39	68,90	89,29	102,92
5	80,62	107,24	87,39	102,91	107,54	109,12	107,46	126,20
6	70,15	67,65	111,34	88,66	97,96	109,50		
7	112,72	96,12	63,97	112,08	116,00	78,40		
8	135,87	103,23			77,97	86,51		
9	91,18	129,97						
10	95,13	85,25						
Média	100,00	100,00	92,69	88,84	93,62	97,51	104,27	91,04
Desvio padrão	20,07	21,27	18,63	20,11	22,85	20,61	27,66	23,76
Erro padrão	6,35	6,72	7,04	7,60	8,08	7,29	12,37	10,62

ANEXO XXV - Tabela com dados da expressão da proteína NFATc3 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT		DKO Csa	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	120,79	86,96	60,56	165,11	88,30	126,14	110,03	99,38
2	137,96	75,29	101,69	119,79	85,48	142,06	54,48	135,40
3	62,95	116,70	112,49	132,36	85,35	81,81	23,85	121,41
4	100,50	75,28	46,40	114,77	54,97	66,83	67,20	66,90
5	142,38	99,40	108,68	103,16	110,26	116,96	107,88	151,60
6	136,63	116,35	38,61	211,00	128,90	63,16	38,61	163,93
7	105,23	110,24	26,75	115,99	50,19	116,55		
8	76,21	81,99	14,01	120,71	70,68	108,76		
9	72,67	96,03	36,37	152,31	28,97	57,52		
10	89,52	136,47	111,98	115,99	88,07	52,21		
11	55,17	105,29			105,12	87,47		
12					102,00	91,99		
Média	100,00	100,00	65,75	135,12	83,19	92,62	67,01	123,11
Desvio padrão	31,37	19,34	38,95	32,61	28,12	29,44	35,63	35,66
Erro padrão	9,46	5,83	12,32	10,31	8,12	8,50	14,55	14,56

ANEXO XXVI - Tabela com dados da expressão da proteína GATA-4 nos extratos citoplasmáticos e nucleares normalizados pelo GAPDH, em (% do controle), nos camundongos controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO (DKO), α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado (DKOT) e α_{2A}/α_{2C} ARKO tratados com ciclosporina (DKO Csa). Citoplasma (cito), núcleo (núc).

	WT		DKO		DKOT		DKO Csa	
	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc	Cito	Núc
1	109,67	49,78	107,62	109,18	157,51	85,16	109,73	18,22
2	81,12	101,59	124,99	146,47	118,95	138,34	78,41	84,38
3	108,74	133,68	130,08	169,10	127,58	75,00	21,12	36,44
4	79,30	81,61	102,55	105,54	83,78	83,31	96,53	175,98
5	102,95	150,08	108,58	199,85	116,26	83,57	212,72	33,27
6	103,75	68,24	96,44	160,50	114,45	113,19	38,62	91,43
7	104,47	115,02			99,67	109,81	166,89	18,17
8					63,10	41,18		
Média	100,00	100,00	111,71	148,44	110,17	91,19	103,43	65,41
Desvio padrão	13,98	35,92	13,10	36,33	28,51	29,21	67,90	57,14
Erro padrão	5,28	13,58	5,35	13,73	10,08	10,33	25,66	21,60