

LAÍS SANTOS DOMINGUES

Validação da ativação do eixo intracelular PKCépsilon-ALDH2 como mecanismo-chave na cardioproteção induzida pelo exercício físico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

RESUMO

DOMINGUES, LS. **Validação da ativação do eixo intracelular PKC ϵ -ALDH2 como mecanismo-chave na cardioproteção induzida pelo exercício físico.** 2018. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As doenças isquêmicas representam a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo. Dessa forma, o melhor entendimento dos sinais intracelulares envolvidos no estabelecimento e propagação do dano induzido pela isquemia-reperfusão (I/R) é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias, futuramente utilizadas na prevenção e no tratamento do infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e isquemia renal. O processo de isquemia-reperfusão gera danos irreparáveis aos tecidos acometidos. A reperfusão do tecido afetado, que ficara temporariamente mantido em hipóxia (com baixa tensão de oxigênio), resulta em um brusco aporte de oxigênio (alta tensão de oxigênio) e conseqüente colapso metabólico, caracterizado pela disfunção mitocondrial associada à elevada produção de radicais livres. Recentemente demonstramos que estímulos cardioprotetores (ex. pré-condicionamento isquêmico e etanol) são acompanhados pela ativação da proteína quinase C isoforma épsilon (PKC ϵ), aumento de sua translocação para a mitocôndria e conseqüente fosforilação/ativação da enzima mitocondrial aldeído desidrogenase 2 (ALDH2). A ALDH2 é uma enzima chave na proteção contra danos isquêmicos devido a sua capacidade de oxidar aldeídos, como 4-hidroxi-2-nonenal e acetaldeído, produzidos durante estresse oxidativo. Semelhante ao pré-condicionamento isquêmico, o exercício físico (EF) também promove um aumento da tolerância do miocárdio à lesão de isquemia-reperfusão, entretanto os mecanismos celulares envolvidos nessa cardioproteção ainda são pouco compreendidos. No presente projeto de pesquisa buscamos validar o eixo intracelular PKC ϵ -ALDH2 como possível mecanismo cardioprotetor induzido pelo EF frente estresse de isquemia-reperfusão. Inicialmente, utilizando camundongos selvagens, avaliamos se o exercício físico (7 dias consecutivos) modula a PKC ϵ e a ALDH2, e se essa resposta é transiente ou sustentada. Em seguida, por meio da técnica de isquemia-reperfusão *ex vivo* (Langendorff), avaliamos a participação individual da PKC ϵ e ALDH2 na cardioproteção mediada pelo exercício físico.

Nossos resultados mostram que o exercício físico aumenta a expressão da PKC ϵ no cardiomiócito de forma transiente, visto que 24h após a última sessão de exercício físico esse valor foi restabelecido, e a ALDH2 mostrou aumento sustentado em sua atividade, mantida até mesmo 24h após a última sessão de exercício físico. Além disso, sete dias de exercício físico é capaz de proteger o coração da lesão de isquemia e reperfusão. Entretanto, quando foram utilizados inibidores específicos ou animais geneticamente modificados, essa cardioproteção foi perdida. Assim, nossos resultados sugerem um papel importante do eixo PKC ϵ -ALDH2 na cardioproteção induzida pelo exercício físico frente a uma lesão por isquemia/reperfusão.

Palavras-chave: Infarto agudo do miocárdio; Pré-condicionamento isquêmico; Langendorff; Proteína quinase C; Enzima ALDH2; Exercício Físico.

ABSTRACT

DOMINGUES, LS. **Intracellular PKC ϵ -ALDH2 axis as a key mechanism in exercise-mediated cardioprotection.** 72s. Master thesis (Morphofunctional Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Ischemic diseases are the leading cause of mortality and morbidity worldwide. Thus, a better understanding of the intracellular signals involved in the establishment and propagation of damage induced by ischemia-reperfusion is essential to the development of new strategies that can be used in the prevention and treatment of myocardial infarction, stroke and renal ischemia. The process known as ischemia-reperfusion (I/R) causes irreparable damage to the affected tissues due to the wide variation in tissue oxygen tension. Reperfusion of the affected tissue, which had been temporarily maintained at hypoxia (low oxygen tension), results in abrupt oxygen supply (high oxygen tension) and consequent metabolic collapse, characterized by mitochondrial dysfunction associated with high production of free radicals. We recently demonstrated that cardioprotective stimuli (i.e. ischemic preconditioning and ethanol) are accompanied by increased translocation of protein kinase C isoform epsilon (PKC ϵ) to the mitochondria and subsequent phosphorylation-activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase enzyme 2 (ALDH2), which has an inverse correlation with myocardial injury. ALDH2 is a key enzyme in the protection against ischemic damage due to its capacity to oxidize aldehydes (i.e. acetaldehyde and 4-hydroxynonenal) produced during oxidative stress. Similar to ischemic preconditioning, exercise promotes increased myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury; however, the cellular mechanisms involved in this process are still poorly understood. We proposed to validate the intracellular PKC ϵ -ALDH2 axis as a possible exercise-mediated cardioprotective mechanism upon ischemia-reperfusion. Firstly, using wild-type mice, we evaluated whether exercise (7 consecutive days) modulates the activity of PKC ϵ and ALDH2 (transient vs. sustained). Then, through the *ex vivo* ischemia-reperfusion technique (Langendorff), we evaluated the individual participation of PKC ϵ and ALDH2 in exercise-mediated cardioprotection. Our results show that physical exercise increases the cardiomyocyte PKC ϵ levels in a transient way, since this response was reestablished 24h after the last physical

exercise session. Moreover, ALDH2 showed a sustained increase in its activity, which was maintained even 24h after the last session. In addition, seven days of physical exercise was able to protect the heart from ischemia and reperfusion injury, whereas this cardioprotection was lost when specific inhibitors or genetically modified animals (PKC ϵ knockout mice and ALDH2 knock-in mice) were used. Thus, our results suggest an important role of the PKC ϵ -ALDH2 axis in the cardioprotection induced by exercise against ischemia/reperfusion injury.

Key words: Myocardial infarction; Ischemic preconditioning; Langendorff; Protein kinase C; ALDH2 enzyme, Physical Exercise.

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, cerca de 17,7 milhões de mortes no mundo estão relacionados às doenças cardiovasculares, representando um importante problema de saúde pública. Apesar da tendência de diminuição na taxa de mortalidade, as doenças cardiovasculares ainda se destacam como a principal causa de óbitos, sobretudo em países em desenvolvimento, como o Brasil (figura 1 e 2) (Riley *et al.*, 2014; Who, 2017b).

Mundialmente, dentre as doenças cardiovasculares, a doença isquêmica cardíaca representa a principal causa de morte tanto em homens (46%) quanto em mulheres (38%) (Mendis *et al.*, 2011). Somente em 2015, o infarto agudo do miocárdio causou 8,7 milhões de óbitos, liderando o ranking “*Top 10 causes of death*”, da Organização Mundial da Saúde.

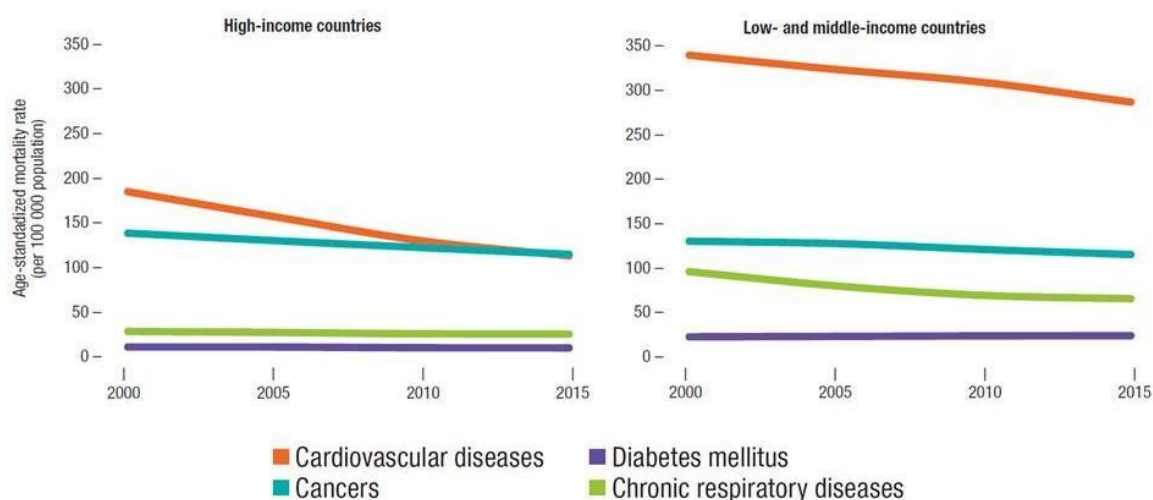


Figura 1 - Tendências globais da taxa de mortalidade por doenças não transmissíveis, 2000-2015; “Cardiovascular Diseases” (Doenças cardiovasculares) representam a principal causa de mortalidade em países desenvolvidos (junto ao câncer) e em desenvolvimento (Who, 2017b).

Considerando as informações epidemiológicas supracitadas, é de extrema importância compreender os mecanismos celulares que regulam a morte celular após um evento isquêmico. Esse entendimento auxiliará no desenvolvimento de novos tratamentos (farmacológicos e não farmacológicos) capazes de atenuar os danos provocados pela lesão de isquemia e reperfusão (I/R).

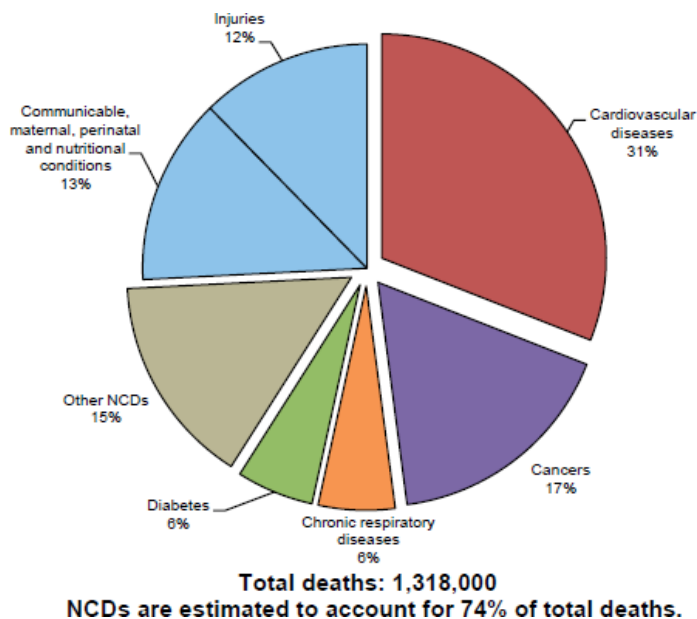


Figura 2 - Causas de mortalidade no Brasil. Porcentagem de todos os óbitos por doenças não transmissíveis; “Cardiovascular Diseases” (Doenças cardiovasculares) representam a principal causa de mortalidade no Brasil, com 31% (Riley et al., 2014).

A doença isquêmica cardíaca possui como origem o infarto agudo do miocárdio, caracterizado por mudanças nas propriedades bioquímicas durante a isquemia e, principalmente durante a reperfusão (Figueira *et al.*, 2013). A privação de oxigênio e nutrientes no tecido cardíaco, um dos tecidos com maior demanda energética, provoca a morte de cardiomiócitos e gera danos irreversíveis. Uma forma não farmacológica, capaz de prevenir e auxiliar no tratamento das disfunções cardíacas associadas à I/R, é o exercício físico.

Sabe-se que é de extrema importância a prática de atividade física para a saúde, pois ela reduz o risco de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e diabetes tipo 2. Além disso, também melhora a função da musculatura esquelética, controle do peso corporal e reduz sintomas de depressão. Mesmo com a compreensão dos efeitos protetores da prática regular de exercício físico, a inatividade física tem aumentado em muitos países, sendo considerado atualmente como quarto maior fator de risco de mortalidade em todo o mundo. Estima-se que a inatividade física esteja associada à cerca de 30% de cardiopatias isquêmicas, como demonstrado na figura 3 (Who, 2009).

O exercício físico (EF) aumenta a tolerância do miocárdio ao insulto de isquemia/reperfusão (Bowles *et al.*, 1992; Lakka *et al.*, 1994; Demirel *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2001; Quindry *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2006; Chicco *et al.*, 2007;

French *et al.*, 2008; Melling *et al.*, 2009). Porém, embora haja considerável fundamentação demonstrando o efeito cardioprotetor do exercício físico, os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda não são claramente compreendidos.

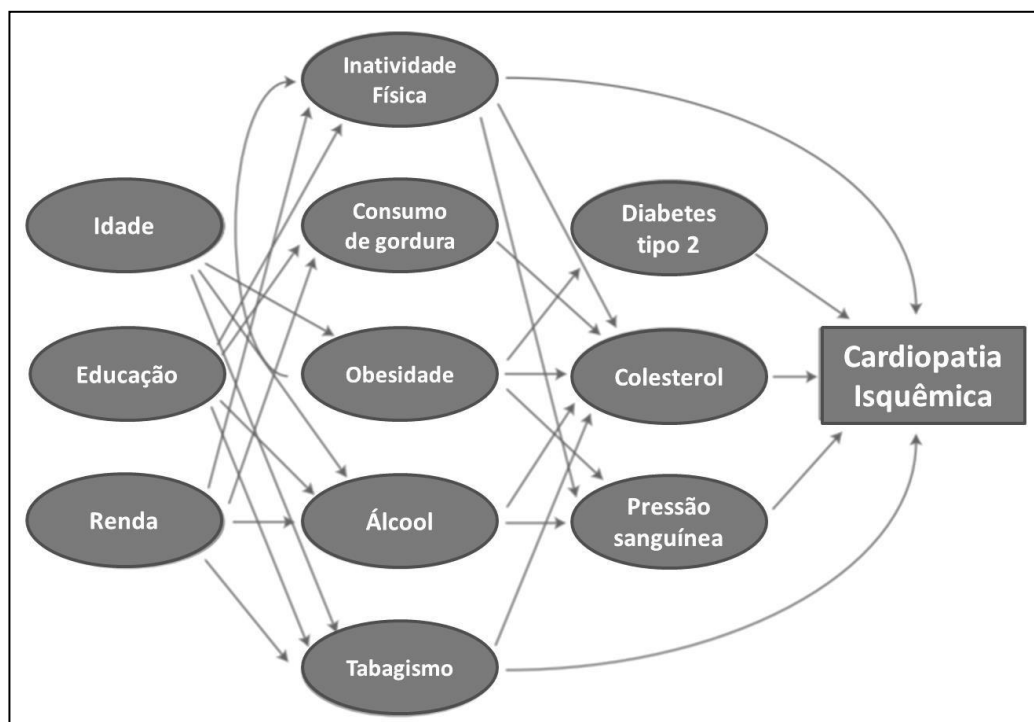


Figura 3 - As principais causas de cardiopatia isquêmica. As setas indicam alguns dos caminhos pelos quais as causas de cardiopatia isquêmica interagem. Estima-se que a inatividade física esteja associada à cerca de 30% de cardiopatias isquêmicas (Who, 2009).

Dados da última década da literatura sugerem que a família da proteína quinase C (PKCs) exerce um papel-chave na cardioproteção obtida pelo exercício físico previamente a um evento isquêmico. Yamashita e colaboradores demonstraram que ratos pré-tratados com 5 mg/kg de cloreto de queleritina, um inibidor não-seletivo das PKCs, não foram beneficiados pela cardioproteção mediada pelo exercício físico agudo no insulto de isquemia/reperfusão (Yamashita *et al.*, 2001). Além disso, Melling e colaboradores evidenciaram que após lesão global por I/R a porcentagem da área de infarto foi significativamente reduzida de 50% no grupo controle sedentário para 20% no grupo que realizou exercício físico agudo prévio, e a inibição das PKCs com queleritina elevou para 75% a área infartada (Melling *et al.*, 2009).

Dentre as PKCs, a isoforma épsilon (PKC ϵ) é reconhecida pelo seu papel importante na sinalização cardioprotetora durante o processo de I/R, visto que sua ativação seletiva promove a diminuição da área de infarto e sua inibição impede a cardioproteção mediada pelo pré-condicionamento isquêmico (Dorn *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Churchill *et al.*, 2010). Essa resposta protetora da PKC ϵ ocorre pela sua translocação para a mitocôndria e subsequente fosforilação da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) (Chen *et al.*, 2008). Baseados nos resultados supracitados, levantamos a hipótese de que a sinalização intracelular PKC ϵ -ALDH2 é essencial na cardioproteção mediada pelo exercício físico. Sendo assim, estabelecemos como objetivos do presente estudo: 1) Caracterizar o perfil de ativação da PKC ϵ e da ALDH2 após treinamento físico e 2) Estudar o envolvimento individual da PKC ϵ e ALDH2 na cardioproteção mediada pelo exercício físico.

2 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o exercício físico aumenta a PKC ϵ no cardiomiócito de forma transiente, visto que 24h após a última sessão de exercício físico esse valor foi restabelecido. Apesar de não encontrarmos diferenças na expressão da ALDH2 logo após a última sessão de exercício físico, essa proteína mostrou aumento sustentado em sua atividade, mantida até mesmo 24h após a última sessão de exercício físico. Assim demonstramos, pela primeira vez, que o estresse da sessão de exercício físico é capaz de promover alterações na enzima cardioprotetora ALDH2.

Além disso, sete dias de exercício físico é capaz de proteger o coração da lesão de isquemia e reperfusão. Entretanto quando foram utilizados inibidores específicos ou animais geneticamente modificados essa cardioproteção foi perdida. Por fim, nossos resultados demonstram um papel importante do eixo PKC ϵ -ALDH2 na cardioproteção induzida pelo exercício físico frente a uma lesão por isquemia/reperfusão.

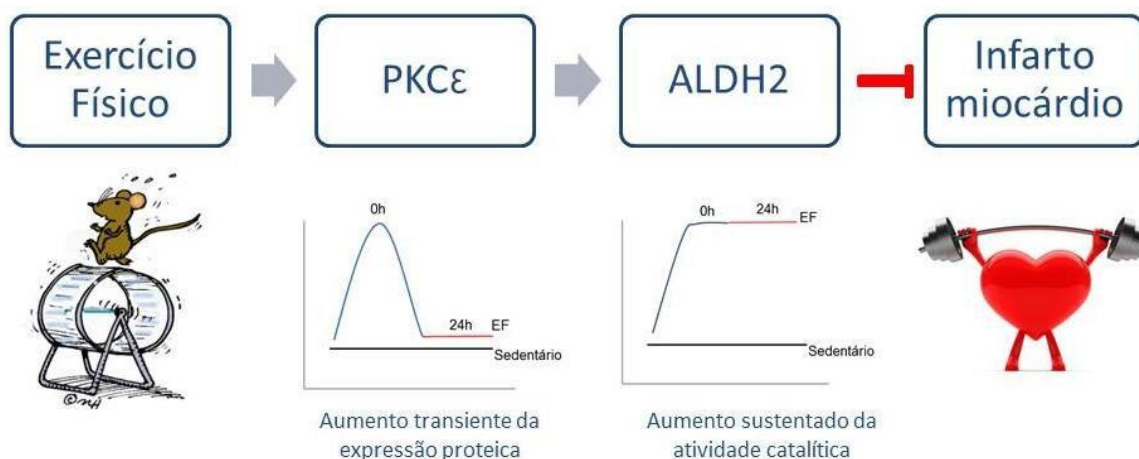


Figura 27 - Esquema ilustrativo: A cardioproteção induzida pelo exercício físico [quando realizado previamente] depende da ativação do eixo intracelular PKC ϵ -ALDH2 (aldeído desidrogenase 2). A ausência [ou inativação] de qualquer componente desse eixo resulta na perda do efeito cardioprotetor do exercício físico frente estresse de isquemia-reperfusão. Para testar a importância de cada componente do eixo supracitado foram utilizadas ferramentas farmacológicas capazes de modular seletivamente tanto a PKC ϵ quanto a enzima mitocondrial ALDH2 e modelos de animais mutantes (camundongos PKC ϵ nocaute e camundongos ALDH2 *knock-in*). Os resultados obtidos no presente projeto contribuem para o entendimento mais pontual dos sinais intracelulares envolvidos na cardioproteção mediada pelo exercício físico pós-evento isquêmico, abrindo novas perspectivas na utilização do exercício.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIO, G. et al. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. **J Clin Invest**, v. 87, n. 6, p. 2056-66, Jun 1991. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645750> >.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **J Mol Cell Cardiol**, v. 50, n. 6, p. 940-50, Jun 2011. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385587> >.

BIJNEN, F. C.; CASPERSEN, C. J.; MOSTERD, W. L. Physical inactivity as a risk factor for coronary heart disease: a WHO and International Society and Federation of Cardiology position statement. **Bull World Health Organ**, v. 72, n. 1, p. 1-4, 1994. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8131243> >.

BLOOR, C. M.; WHITE, F. C.; SANDERS, T. M. Effects of exercise on collateral development in myocardial ischemia in pigs. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 56, n. 3, p. 656-65, Mar 1984. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6706773> >.

BOATENG, S.; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Dis Mon**, v. 59, n. 3, p. 83-96, Mar 2013. ISSN 1557-8194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410669> >.

BOWLES, D. K.; FARRAR, R. P.; STARNES, J. W. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3 Pt 2, p. H804-9, Sep 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415606> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRAUNWALD, E.; KLONER, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? **J Clin Invest**, v. 76, n. 5, p. 1713-9, Nov 1985. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4056048> >.

BUDAS, G. R.; CHURCHILL, E. N.; MOCHLY-ROSEN, D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 523-36, Jun 2007. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576073> >.

BUDAS, G. R. et al. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) confers cardioprotection in protein kinase C epsilon (PKCepsilon) knockout mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 4, p. 757-64, Apr 2010. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913552> >.

BUDAS, G. R.; MOCHLY-ROSEN, D. Mitochondrial protein kinase Cepsilon (PKCepsilon): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1052-4, Nov 2007. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956277> >.

BUJA, L. M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. **Cardiovasc Pathol**, v. 14, n. 4, p. 170-5, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 1054-8807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009313> >.

BUJA, L. M.; ENTMAN, M. L. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. **Circulation**, v. 98, n. 14, p. 1355-7, Oct 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9760287> >.

CALABRESE, E. J. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. **Ageing Res Rev**, v. 7, n. 1, p. 8-20, Jan 2008. ISSN 1568-1637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17768095> >.

_____. Hormesis: a fundamental concept in biology. **Microb Cell**, v. 1, n. 5, p. 145-149, Apr 2014. ISSN 2311-2638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357236> >.

CAMPOS, J. C. et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. **Autophagy**, v. 13, n. 8, p. 1304-1317, Aug 2017. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28598232> >.

CANCHERINI, D. V.; QUELICONI, B. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K+ channel activity in isolated heart mitochondria. **Cardiovasc Res**, v. 73, n. 4, p. 720-8, Mar 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208207> >.

CARSON, L. D.; KORZICK, D. H. Dose-dependent effects of acute exercise on PKC levels in rat heart: is PKC the heart's prophylactic? **Acta Physiol Scand**, v. 178, n. 2, p. 97-106, Jun 2003. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780383> >.

CHAVES, E. A. et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 99, n. 4-5, p. 223-30, Jun 2006. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621517> >.

CHEN, C. H. et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. **Science**, v. 321, n. 5895, p. 1493-5, Sep 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787169> >.

_____. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. **Physiol Rev**, v. 94, n. 1, p. 1-34, Jan 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382882> >.

CHEN, C. H.; GRAY, M. O.; MOCHLY-ROSEN, D. Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12784-9, Oct 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536000> >.

CHEN, L. et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11114-9, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553773> >.

CHEN, Y. R.; ZWEIER, J. L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. **Circ Res**, v. 114, n. 3, p. 524-37, Jan 2014. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481843> >.

CHICCO, A. J. et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2432-7, May 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237239> >.

CHURCHILL, E. N. et al. Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of deltaPKC during reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 2, p. 385-94, Jan 2010. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820255> >.

_____. Reperfusion-induced translocation of deltaPKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. **Circ Res**, v. 97, n. 1, p. 78-85, Jul 2005. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961716> >.

CHURCHILL, E. N.; SZWEDA, L. I. Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. **Arch Biochem Biophys**, v. 439, n. 2, p. 194-9, Jul 2005. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963450> >.

DEMIREL, H. A. et al. Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 8, p. 1211-6, Aug 1998. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710859> >.

DOENST, T.; NGUYEN, T. D.; ABEL, E. D. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. **Circ Res**, v. 113, n. 6, p. 709-24, Aug 2013. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23989714> >.

DORN, G. W. et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12798-803, Oct 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536002> >.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, Aug 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600553> >.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, Jun 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23244576> >.

FRENCH, J. P. et al. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. **FASEB J**, v. 22, n. 8, p. 2862-71, Aug 2008. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417547> >.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respir Physiol**, v. 128, n. 3, p. 277-97, Nov 2001. ISSN 0034-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11718759> >.

HAMILTON, K. L. et al. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 7, p. 800-9, Apr 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654467> >.

HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, S. et al. Targeting mitochondria for cardiac protection. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 586-600, May 2013. ISSN 1873-5592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458575> >.

HUI, P. et al. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. **Hypertens Res**, v. 30, n. 7, p. 585-92, Jul 2007. ISSN 0916-9636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785925> >.

INAGAKI, K. et al. Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. **Circulation**, v. 108, n. 19, p. 2304-7, Nov 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597593> >.

INOUE, M. et al. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. **J Biol Chem**, v. 252, n. 21, p. 7610-6, Nov 1977. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199594> >.

JIN, Z. Q. et al. Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. **Am J**

Physiol Heart Circ Physiol, v. 282, n. 6, p. H1970-7, Jun 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003800> >.

KORZICK, D. H. et al. Chronic exercise improves myocardial inotropic reserve capacity through alpha1-adrenergic and protein kinase C-dependent effects in Senescent rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 59, n. 11, p. 1089-98, Nov 2004. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602054> >.

KRENZ, M. et al. **Cell Survival Programs and Ischemia /Reperfusion: Hormesis, Preconditioning, and Cardioprotection** MORGAN & CLAYPOOL LIFE SCIENCES, 2013.

KRIEGER, J. E. **Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares: A integração entre a pesquisa e a prática clínica.** São Paulo 2008.

LAKKA, T. A. et al. Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 330, n. 22, p. 1549-54, Jun 1994. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8177243> >.

LAUGHLIN, M. H.; OLTMAN, C. L.; BOWLES, D. K. Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 3, p. 352-60, Mar 1998. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526880> >.

LENNON, S. L. et al. Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 96, n. 4, p. 1299-305, Apr 2004. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672968> >.

LIU, H.; MCPHERSON, B. C.; YAO, Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 1, p. H404-10, Jul 2001. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406509> >.

MARONGIU, E.; CRISAFULLI, A. Cardioprotection acquired through exercise: the role of ischemic preconditioning. **Curr Cardiol Rev**, v. 10, n. 4, p. 336-48, Nov 2014. ISSN 1875-6557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720421> >.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica.** Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan 1999.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Res Rev**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Jan 2008. ISSN 1568-1637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162444> >.

MELLING, C. W. et al. Myocardial Hsp70 phosphorylation and PKC-mediated cardioprotection following exercise. **Cell Stress Chaperones**, v. 14, n. 2, p. 141-50,

Mar 2009. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668351> >.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva: World Health Organization 2011.

MITCHELL, P.; MOYLE, J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 213, n. 5072, p. 137-9, Jan 1967. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4291593> >.

MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 12, p. 937-57, Dec 2012. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197040> >.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Preconditioning: the mitochondrial connection. **Annu Rev Physiol**, v. 69, p. 51-67, 2007. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007587> >.

MURRIEL, C. L.; MOCHLY-ROSEN, D. Opposing roles of delta and epsilonPKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. **Arch Biochem Biophys**, v. 420, n. 2, p. 246-54, Dec 2003. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654063> >.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124-36, Nov 1986. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3769170> >.

NENE, A. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation and coevolution of its ϵ PKC-mediated phosphorylation sites. **J Biomed Sci**, v. 24, n. 1, p. 3, Jan 2017. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28056995> >.

PERRINI, S. et al. Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 21-4, Jan 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693693> >.

PORTO, C. C. **Doenças cardiovasculares: prevenção e tratamento**. PORTO, A. L. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan. 2 2005.

QUINDRY, J. et al. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 5, p. 416-25, May 2005. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919594> >.

RILEY, L.; COWAN, M.; AL., E. **Noncommunicable Diseases: Country Profiles 2014**: World Health Organization 2014.

SAURIN, A. T. et al. Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated

buffer-perfused mouse hearts. **Cardiovasc Res**, v. 55, n. 3, p. 672-80, Aug 2002. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160964> >.

SEITZ, H. K. et al. Alcohol and cancer. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 5 Suppl ISBRA, p. 137S-143S, May 2001. ISSN 0145-6008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391063> >.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 79, n. 3, p. 675-86, Sep 1995. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567503> >.

SOUTHAM, C. M.; ERLICH, J. **Effects of Extract of Western Red-cedar Heartwood on Certain Wood-decaying Fungi in Culture**: Phytopathology 1943.

STARNES, J. W. Effect of storage conditions on lactate dehydrogenase released from perfused hearts. **Int J Cardiol**, v. 127, n. 1, p. 114-6, Jun 2008. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683812> >.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 9, p. 1283-97, May 2009. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245829> >.

THYGESEN, K. et al. Universal definition of myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 28, n. 20, p. 2525-38, Oct 2007. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951287> >.

WANG, B. et al. The association of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) polymorphism with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease in Chinese. **J Neurol Sci**, v. 268, n. 1-2, p. 172-5, May 2008. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201725> >.

WHO. **The top 10 causes of death 2000-2015**: World Health Organization 2017a.

_____. **World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva 2017b.

WHO, W. H. O. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks 2009**.

XU, F. et al. ALDH2 genetic polymorphism and the risk of type II diabetes mellitus in CAD patients. **Hypertens Res**, v. 33, n. 1, p. 49-55, Jan 2010. ISSN 1348-4214. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876063> >.

YAMASHITA, N.; BAXTER, G. F.; YELLON, D. M. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 331-6, Mar 2001. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179278> >.

YELLON, D. M.; ALKHULAIFI, A. M.; PUGSLEY, W. B. Preconditioning the human myocardium. **Lancet**, v. 342, n. 8866, p. 276-7, Jul 1993. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101304> >.

YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial reperfusion injury. **N Engl J Med**, v. 357, n. 11, p. 1121-35, Sep 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855673> >.

YTREHUS, K.; LIU, Y.; DOWNEY, J. M. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. **Am J Physiol**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1145-52, Mar 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8160817> >.

ZAMBELLI, V. O. et al. Aldehyde dehydrogenase-2 regulates nociception in rodent models of acute inflammatory pain. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 251, p. 251ra118, Aug 2014. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163478> >.