

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Fisiologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**ASSOCIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO COM VIAS DE  
SINALIZAÇÃO INTRACELULARES RELACIONADAS COM A  
HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA**

MARIANE BERTAGNOLLI

Orientadora: Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Co-orientadora: Dra Katya Rigatto

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia**

Porto Alegre, 2008

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Maria Cláudia Irigoyen por todas as oportunidades oferecidas, pela confiança e pelo exemplo de pesquisadora.

A minha co-orientadora e amiga Katya Rigatto pelo apoio incondicional e dedicação ao nosso trabalho, e por me ensinar o caminho da pesquisa.

À professora Adriane Belló-Klein pelos ensinamentos e pelo exemplo de perseverança e conquistas por mim testemunhadas.

À professora Maria Flávia Ribeiro pelo incentivo, apoio, ensinamentos técnicos e confiança no meu trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de fisiologia cardiovascular, pelo companheirismo, amizade e alegrias compartilhadas.

Aos professores do departamento de fisiologia e do pós-graduação que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desta tese e para a construção do meu conhecimento sobre a fisiologia.

Em especial aos Professores Ilma S. Brum da Silva e Edison Capp pela inspiração desse trabalho durante as suas disciplinas.

Ao Fabrício e aos demais amigos pelo incentivo e apoio ao longo da minha vida.

À minha família pelo amor e por me fazer ser o que sou, sempre perseverante e otimista.

Àqueles que, segundo o Professor A. Belló, sempre tem a razão...

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS _____	V
LISTA DE ABREVIATURAS _____	VI
RESUMO _____	VIII
ABSTRACT _____	X
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1. Hipertrofia Cardíaca _____	1
1.2. Vias de Sinalização Intracelulares Hipertróficas e Apoptóticas _____	7
1.3. Relação Estresse Oxidativo e Hipertrofia Cardíaca _____	12
1.4. Papel do Exercício sobre a Hipertrofia Cardíaca _____	15
2. HIPÓTESE _____	19
3. OBJETIVOS _____	20
3.1. Objetivo Geral _____	20
3.2. Objetivos Específicos _____	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS _____	21
4.1. Animais _____	21
4.2. Protocolos Experimentais de Treinamento Físico _____	21
4.3. Tratamento com Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina _____	23
4.4. Avaliações Hemodinâmicas _____	23
4.4.1. Procedimentos Cirúrgicos e Registro Intraarterial _____	23
4.4.2. Procedimentos Cirúrgicos e Registros Intraventriculares _____	25
4.5. Medidas Morfométricas Cardíacas e Preparo do Tecido _____	25
4.6. Atividade da Enzima Citrato Sintase _____	26
4.7. Concentração da Norepinefrina Cardíaca _____	27
4.8. Medidas de Dano Oxidativo _____	27
4.9. Atividade das Enzimas Antioxidantes _____	28
4.10. Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio _____	30
4.11. Avaliação do Metabolismo da Glutathione _____	30
4.12. Determinação dos Nitratos Totais _____	31

4.13. Expressão Protéica por Western Blot	32
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6. RESULTADOS	35
6.1. Artigo I: “ <i>Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats</i> ”	36
6.2. Artigo II: “ <i>Cardiac oxidative stress and p38 activation in spontaneously hypertensive rats pathological cardiac hypertrophy</i> ”	43
6.3. Artigo III: “ <i>Enalapril improves oxidative status and reduces p38 activation and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats</i> ”	69
6.4. Artigo IV: “ <i>Renin-angiotensin system influence on physiological cardiac hypertrophy: modulation of oxidative stress, hypertrophyc pathways and epidermal growth factor</i> ”	96
6.5. Artigo V: “ <i>Exercise training reduces pathological cardiac hypertrophy through decreasing cardiac oxidative stress and stimulating intracellular survival mechanisms</i> ”	129
7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA	158
8. PERSPECTIVAS	168
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** – Apresentação do eixo elaborado a partir da hipótese e objetivos da tese. Esta figura ilustra a seqüência dos mecanismos estudados.

**Figura 2** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo I.

**Figura 3** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo II.

**Figura 4** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo III.

**Figura 5** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo IV.

**Figura 6** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo V.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	proteína cinase B
<b>ASK</b>	cinase reguladora de sinais apoptóticos
<b>AT1</b>	receptor da angiotensina 1
<b>CAT</b>	catalase
<b>CHI</b>	“cardiac hypertrophy index”
<b>DHBA</b>	diidroxibenzilamina
<b>DNPB</b>	dinitro fenil hidrazina
<b>EAO</b>	espécies ativas de oxigênio
<b>ECA</b>	enzima conversora da angiotensina
<b>EGF</b>	fator de crescimento epidermal
<b>ERK</b>	cinase regulada por sinais extracelulares
<b>FC</b>	frequência cardíaca
<b>GPX</b>	glutathiona peroxidase
<b>GSH</b>	glutathiona reduzida
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	glicogênio sintase cinase-3 beta
<b>GSSG</b>	glutathiona oxidada
<b>HCF</b>	hipertrofia cardíaca fisiológica
<b>HCP</b>	hipertrofia cardíaca patológica
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta performance
<b>IGF1</b>	fator de crescimento semelhante à insulina 1
<b>JNK</b>	cinase c-jun-NH <sub>2</sub> terminal
<b>LVEDP</b>	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
<b>LVSP</b>	pressão sistólica do ventrículo esquerdo
<b>MAPK</b>	proteínas cinases ativadas por mitógenos
<b>mTOR</b>	“mammalian target of rapamycin”
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>PA</b>	pressão arterial
<b>PAS</b>	pressão arterial sistólica

<b>PAD</b>	pressão arterial diastólica
<b>PI3K</b>	fosfatidil inositol-3-cinase
<b>SHR</b>	ratos espontaneamente hipertensos
<b>SNS</b>	sistema nervoso simpático
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>SRA</b>	sistema renina-angiotensina
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	fator de crescimento tecidual $\beta$ 1

## RESUMO

Baseado na hipótese de que a modulação do estresse oxidativo cardíaco é diretamente associada à ativação de vias de sinalização de crescimento celular, propomos estudar o perfil oxidativo cardíaco em modelos de hipertrofia cardíaca patológica (HCP) e fisiológica (HCF). Além disso, buscamos verificar se existe associação deste perfil com a ativação de vias de sinalização de crescimento celular, bem como com a função cardíaca e se isto é influenciado pelo exercício físico e pelos sistemas renina-angiotensina (SRA) e nervoso simpático (SNS). Para isso, desenvolvemos cinco trabalhos onde avaliamos parâmetros funcionais, morfológicos, bioquímicos e moleculares que permitem avaliação dos mecanismos relacionados com o objetivo desta tese. No primeiro artigo (I), mostramos o efeito do exercício em animais SHR sobre a diminuição do estresse oxidativo e da atividade simpática cardíaca, avaliada através da concentração de noradrenalina no coração. Esses parâmetros apresentaram fortes correlações com a redução da hipertrofia cardíaca patológica hipertensiva. Este primeiro estudo mostrou que atividade do SNS sobre o coração está associada ao aumento do estresse oxidativo, podendo, então, estimular o desenvolvimento da HCP. No segundo estudo (artigo II), buscamos comparar o perfil oxidativo cardíaco em ratos normotensos e hipertensos e associar estes parâmetros com a ativação de vias de sinalização intracelulares. Verificamos que os animais SHR com hipertensão estabelecida apresentam elevado estresse oxidativo cardíaco, e isto está fortemente associado com o índice de hipertrofia cardíaca (IHC) e com a ativação da p38. Por outro lado, verificamos uma associação inversa entre o dano protéico oxidativo e a ativação da ERK1/2. Os resultados demonstram, assim, que animais SHR com hipertensão estabelecida e HCP, apresentam um quadro de estresse oxidativo cardíaco, e isso pode determinar o predomínio da ativação de vias pró-apoptóticas, em detrimento das vias de sobrevivência celular. Após, realizamos o terceiro estudo (artigo III), onde avaliamos o efeito do enalapril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) sobre os parâmetros avaliados no estudo anterior. Mostramos através do uso do enalapril, que o SRA estimula o estresse oxidativo cardíaco e a ativação da p38 nos animais SHR com hipertensão estabelecida e HCP. No entanto, este sistema não exerce influência sobre a Akt e a ERK1/2 nesta fase da hipertensão. Na seqüência, o artigo IV possibilitou a avaliação do perfil oxidativo cardíaco e das vias e fatores relacionados com o crescimento celular e o desenvolvimento da HCF induzida pelo exercício de natação. Demonstramos, através deste estudo, que o estresse oxidativo e o desequilíbrio redox não estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da HCF, uma vez que estes estavam diminuídos nos animais treinados. No entanto, verificamos o aumento da

fosforilação da Akt e da ERK1/2 na HCF, e esta ativação de vias relacionadas ao crescimento celular pode estar sendo estimulada pelo SRA, provavelmente via fatores de crescimento, como o EGF avaliado neste estudo. Assim, realizamos o último trabalho (artigo V) onde avaliamos os efeitos induzidos pelo exercício sobre a redução da HCP de animais SHR, e a participação do SRA nesses mecanismos. Verificamos que o exercício isolado diminuiu o estresse oxidativo cardíaco, como já havíamos observado no artigo I, mas também demonstramos que esse efeito parece determinar a diminuição da ativação da p38 e o aumento da Akt. Esses achados indicam que o exercício parece reduzir os fatores pró-apoptóticos cardíacos e estimular mecanismos de sobrevivência, que no final resultam na melhora da função cardíaca. A participação do SRA nesse mecanismo benéfico do exercício parece ser discreta pela sua possível redução, porém influencia a ativação da Akt na regressão da HCP. Dessa forma, concluímos que o estresse oxidativo está diretamente associado ao desenvolvimento da HCP possivelmente promovendo o desequilíbrio entre vias de sobrevivência e apoptose celulares, determinando assim, em condições patológicas, o predomínio da última. Nessas condições, o SRA e o SNS são importantes por estimular esse quadro de estresse oxidativo, e o exercício, pelo contrário, atua sobre esses sistemas melhorando o estado geral cardíaco. Em condições fisiológicas, a ativação de vias relacionadas ao crescimento celular passa a desempenhar um papel chave na determinação da HCF, e isso se deve à participação do SRA e de fatores de crescimento sobre o coração.

## ABSTRACT

Considering that oxidative stress is directly associated with cell growth pathways activation, the aim of this study was to assess cardiac oxidative stress profile in rat models of physiological (HCF) and pathological (HCP) cardiac hypertrophy. In addition, we aimed to verify whether an association exists with intracellular pathways activation and cardiac function. The participation of renin-angiotensin (SRA) and sympathetic nervous (SNS) systems and exercise training effect on cardiac hypertrophy were also assessed. Therefore, we have evaluated functional, morphological, biochemical, and molecular parameters to assess hypertrophic mechanisms. The first study (I) demonstrated in spontaneously hypertensive rats (SHR) that exercise training decreased cardiac oxidative stress and sympathetic activity, assessed through cardiac norepinephrine concentration. The data were strongly correlated with the reduction of pathological cardiac hypertrophy. The first study therefore has shown that cardiac SNS activity is associated with the increase of oxidative stress, which could determine HCP. In the second study (II), we aimed to compare the cardiac oxidative status between normotensive and hypertensive rats, and to establish an association with intracellular pathways activation. We have observed that SHR with established hypertension have increased cardiac oxidative stress, and it was directly associated the cardiac hypertrophy index (CHI) and with p38 activation. On the other hand, it was verified negative correlation between protein oxidative damage and ERK1/2 activation. Thus, the results indicate that SHR with established hypertension and HCP have high oxidative stress, which could determine the predominance of proapoptotic mechanisms. Next, the third study (III) has evaluated an angiotensin-converting enzyme (ECA) inhibitor, enalapril, effect on the same parameters assessed in article II. We have shown in SHR with established hypertension that SRA stimulates cardiac oxidative stress and p38 activation, whereas enalapril has not modified Akt and ERK1/2 activation. The fourth study (IV) investigated cardiac oxidative profile and cell growth related pathways on swimming training-induced HCF. We have demonstrated that the decrease of oxidative stress and the enhanced redox status were not directly associated with IHC. However, we verified increased Akt and ERK1/2 phosphorylation on HCF. This pathways response may be stimulated by SRA through increasing growth factors such as EGF. Thus, the fifth study (V) associated exercise training and enalapril to assess the exercise effect and SRA participation on hypertrophic mechanisms. It was demonstrated that only exercise decreased cardiac oxidative stress, as previously observed in article I, but it has also decreased p38 activation while increased Akt. The findings indicate that, in SHR, exercise may decrease cardiac proapoptotic factors and stimulates survival mechanisms, improving the cardiac function. Moreover, in SHR it is

possible that exercise induces the decrease of angiotensin II or inhibits its action whereas it was also observed a small SRA participation in trained SHR by enalapril-induced decrease of Akt phosphorylation. Therefore, the overall results indicate that oxidative stress is directly associated with HCF and might promote the imbalance between cell survival and proapoptotic pathways. Moreover, SRA and SNS stimulate cardiac oxidative stress while exercise improves the overall cardiac function. On the other hand, in physiologic conditions, the activation of cell growth-related pathways exerts a key role on HCF development, and it depends on SRA participation.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hipertrofia Cardíaca

O remodelamento cardíaco é um dos principais elementos envolvidos na patogênese de diversas doenças, incluindo a hipertensão e a insuficiência cardíaca (Swynghedauw, 1999). Este processo pode ser definido como modificações intersticiais, celulares e moleculares que promovem alterações no formato e tamanho do coração, bem como de sua função após lesão ou sobrecarga cardíaca (Cohn, Ferrari *et al.*, 2000). O crescimento dos cardiomiócitos durante o remodelamento cardíaco é diferente do observado nas células cardíaca não musculares. Enquanto o crescimento pós-natal dos cardiomiócitos acontece exclusivamente de forma hipertrófica, as células fibroblásticas e endoteliais respondem com hipertrofia e hiperplasia. Assim, o remodelamento cardíaco resulta da hipertrofia de miócitos, hipertrofia e hiperplasia de células não miócitos e crescimento dos componentes intersticiais (Swynghedauw, 1999).

Diante disso, pode-se dizer que a hipertrofia de cardiomiócitos constitui uma importante característica do processo de remodelamento, sendo uma adaptação inicial, tanto às condições fisiológicas, quanto patológicas, associadas ao aumento do trabalho cardíaco. A resposta hipertrófica inicialmente normaliza o estresse da parede cardíaca e mantém a função ventricular (Bing, Conrad *et al.*, 2002). No entanto, a sustentação do estímulo hipertrófico determina alterações patológicas nas células do coração e

predispõe ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, o que torna a sua hipertrofia um importante fator de morbidade e mortalidade (Mosterd, Cost *et al.*, 2001).

De acordo com as adaptações miocárdicas e a natureza da carga imposta ao coração, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada como patológica ou fisiológica, (Richey e Brown, 1998). Estes padrões de hipertrofia apresentam diferentes características estruturais e funcionais, assim como fatores bioquímicos e moleculares que influenciam no remodelamento cardíaco (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2003).

O treinamento físico induz hipertrofia cardíaca, também chamada de “coração do atleta” (Raskoff, Goldman *et al.*, 1976). Essa hipertrofia é considerada fisiológica, por ser uma resposta adaptativa que beneficia o sistema cardiovascular, isto é, diminui a frequência cardíaca de repouso e submáxima, além de aumentar o tempo de enchimento ventricular. Esses ajustes melhoram a função cardíaca e permitem que o coração suporte o aumento da demanda durante o exercício (Richey e Brown, 1998).

Em atletas, o estudo do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica vem acompanhando a evolução das técnicas de imagem, principalmente ecocardiográficas. Um estudo envolvendo atletas de diferentes modalidades verificou que em aproximadamente 50% dos atletas, existe alguma evidência de remodelamento cardíaco (Maron e Pelliccia, 2006). Dentre as evidências mais comuns, pode-se citar a alteração das dimensões das câmaras ventriculares, tanto do ventrículo esquerdo quanto do direito, associadas à normal função diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo

(Pelliccia, Maron *et al.*, 1991). As alterações morfológicas observadas na hipertrofia cardíaca fisiológica são reversíveis e, devido à ausência de fibrose, não promovem efeitos deletérios tardios (Maron e Pelliccia, 2006). No entanto, o aumento da incidência de morte súbita em atletas chamou a atenção para os mecanismos associados ao desenvolvimento desta adaptação fisiológica. A partir de então, foi evidenciado que o padrão de hipertrofia cardíaca fisiológica apresenta uma associação de diversos fatores neuroendócrinos e genéticos que podem potencializar este remodelamento, podendo então, evoluir para uma situação patológica (Maron, Carney *et al.*, 2003).

Em animais, a hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício é caracterizada pelo aumento da relação do peso do coração pelo peso corporal, associado à melhora do retorno venoso e do volume diastólico final (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2001). Essas alterações determinam o aumento do volume sistólico e induzem a bradicardia de repouso (Geenen, Buttrick *et al.*, 1988; Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2001). Assim, os modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica demonstram a melhora da função cardíaca associada às modificações estruturais do coração.

Os fatores que desencadeiam a hipertrofia cardíaca fisiológica estão normalmente relacionados a modificações da sobrecarga de volume ou pressão imposta pelo treinamento e pela modalidade do exercício. Além disso, estudos também apontam para o envolvimento de fatores neuroendócrinos e parácrinos estimulados pelo exercício (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2003; Evangelista e Krieger, 2006). Estudos prévios mostraram o aumento da concentração do hormônio do crescimento e fatores de crescimento após o

exercício (Kim, Wende *et al.*, 2008). Como exemplo, a literatura indica o fator semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF) (Heineke e Molckentin, 2006). Estes fatores atuam sobre receptores tirosina cinases e desencadeiam a ativação de diversas vias intracelulares que promovem, no final, o aumento da transcrição protéica e do volume celular. Além disso, esses fatores podem também atuar sobre células intersticiais estimulando a fibrose cardíaca (Shah e Catt, 2003).

O sistema renina-angiotensina (SRA) também está, atualmente, sendo relacionado com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica, uma vez verificado que o treinamento aumentou alguns dos seus componentes. Um estudo prévio mostrou que o treinamento promoveu o aumento da expressão de receptores AT1 no coração (Barauna, Junior *et al.*, 2005). No entanto, o papel do SRA no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca é controverso, uma vez que, este sistema também está associado a mecanismos que determinam a hipertrofia cardíaca patológica.

O padrão patológico de hipertrofia cardíaca vem sendo extensamente estudado buscando a compreensão dos principais mecanismos que determinam a sua evolução para a insuficiência cardíaca (Bing, Conrad *et al.*, 2002). Para tanto, os principais modelos de hipertrofia utilizados são os associados a doenças como a hipertensão arterial sistêmica e pós-infarto do miocárdio. A sobrecarga pressórica imposta ao coração na hipertensão arterial induz a hipertrofia cardíaca patológica. Este padrão de hipertrofia é uma adaptação compensatória ao aumento do trabalho cardíaco e é acompanhada por modificações estruturais do miocárdio, incluindo perda de cardiomiócitos,

desenvolvimento vascular defeituoso e fibrose (González, Ravassa *et al.*, 2006).

O modelo genético de hipertensão experimental que utiliza ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresenta sobrecarga pressórica e gradualmente desenvolve a hipertensão e a hipertrofia cardíaca. Esse modelo demonstra muitas similaridades com a hipertensão essencial em humanos, como o período pré-hipertensivo seguido pelas fases de desenvolvimento e de hipertensão sustentada (Okamoto e Aoki, 1963; Bell, Kelso *et al.*, 2004).

Bell e colaboradores (Bell, Kelso *et al.*, 2004), ao avaliarem o curso temporal da hipertensão em animais SHR, verificaram que a pressão arterial (PA) aumenta progressivamente a partir da 7ª semana de vida até a 16ª semana, quando então é atingido o platô, caracterizando a fase sustentada da hipertensão. A hipertrofia cardíaca acompanha parcialmente a elevação da PA nesses animais, aumentando a partir da 16ª semana, isto é, já na fase de sustentação da hipertensão. Durante esta fase a hipertrofia encontra-se estável e compensada, porém, após 18-24 meses, os SHR apresentam um quadro de insuficiência cardíaca grave com disfunção mecânica, prejuízo da contratilidade, dilatação das câmaras e fibrose (Bing, Conrad *et al.*, 2002).

O tamanho das células cardíacas, bem como a massa protéica dos cardiomiócitos, é maior nos animais SHR, comparados com seus controles normotensos (Lushnikova e Nepomnyashchikh, 2003). No entanto, o desenvolvimento da hipertrofia patológica é considerado multifatorial nesses animais, e inclui fatores mecânicos e neuroendócrinos. Dentre esses fatores, o aumento da atividade do SRA no coração, bem como do sistema nervoso

simpático (SNS), estimula a hipertrofia e o remodelamento cardíaco (Fortuño, Ravassa *et al.*, 2001).

Sabe-se que tanto o SNS quanto o SRA estimulam a hipertrofia de cardiomiócitos e, dependendo da intensidade das suas atividades, também promovem a proliferação fibroblástica e aumento da fibrose cardíaca (Kim, Zhan *et al.*, 2000; Amin, Xiao *et al.*, 2001). Esta ação de crescimento tecidual é gerada a partir da ativação de diferentes sistemas intracelulares, metabólicos e sinalizadores, que culminam na estimulação da transcrição de alguns genes relacionados com a hipertrofia e hiperplasia celular (Heineke e Molkenin, 2006). A intensidade elevada e a duração prolongada do estímulo durante a hipertensão, associadas aos fatores hemodinâmicos e neuroendócrinos sobre o coração, podem estimular a apoptose de cardiomiócitos durante a hipertrofia patológica. A diminuição do número de cardiomiócitos é, em seguida, compensada através da hipertrofia das células remanescentes e da proliferação fibroblástica. (Iwata, Cowling *et al.*, 2005).

Sendo assim, a hipertrofia cardíaca patológica pode ser subdividida em etapas, sendo estas a fase de desenvolvimento hipertrófico, a fase de sustentação e a fase de transição para a insuficiência cardíaca (Swynghedauw, 1999). Cada fase apresenta características peculiares morfofuncionais e bioquímicas que permitem a sua identificação e o seu estudo. A fase de desenvolvimento hipertrófico é caracterizada por alterações energéticas e bioquímicas que culminam no aumento do metabolismo tecidual e da síntese protéica (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2003). Durante esta fase, diversos mecanismos de regulação, sistêmicos e locais, equilibram o estresse

gerado pelos fatores hipertróficos e promovem a adaptação celular. Durante a fase de sustentação, os fatores desencadeantes passam a superar os mecanismos de adaptação e, a partir de então, verifica-se o início de lesão tecidual, alterações metabólicas e morfológicas que culminam com a disfunção cardíaca. Esta fase também passa a ser conhecida como fase de descompensação ou mal-adaptada (Opie, Commerford *et al.*, 2006).

Durante a fase de descompensação cardíaca, o constante desequilíbrio homeostático estimula mecanismos relacionados com a morte celular, como a inflamação e necrose, mas também, a apoptose (Fortuño, Ravassa *et al.*, 2001; González, Ravassa *et al.*, 2006). A evolução deste quadro gera a transição para a insuficiência cardíaca, onde praticamente todos os mecanismos de compensação e regulação estão inibidos ou modificados (Bing, Conrad *et al.*, 2002).

Assim, durante a fase de sustentação da hipertrofia cardíaca patológica, o estudo de fatores bioquímicos locais, associados à lesão celular, assim como o estudo de fatores moleculares envolvidos neste processo, importam na compreensão e prevenção da insuficiência cardíaca.

## **1.2. Vias de Sinalização Intracelulares Hipertróficas e Apoptóticas**

Os diferentes fatores que determinam a hipertrofia cardíaca em animais SHR ativam vias de sinalização intracelulares importantes para a proliferação de miofilamentos, assim como para o aumento do tamanho e da força contrátil dos cardiomiócitos. Duas importantes vias de sinalização intracelulares

associadas ao crescimento celular são as vias das MAPK e proteína cinase B/Akt.

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (do inglês “mitogen-activated protein kinases”, MAPK) são proteínas ativadas pela fosforilação de resíduos de treonina e tirosina, e podem ser classificadas em cinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês “extracellular signal-regulated kinases”, ERK 1/2), grande MAPK (BMK1 ou ERK5), ou proteínas cinase ativadas por estresse, como a cinase c-Jun N-terminal (JNK) e a p38 (Nishida e Gotoh, 1993). Previamente, foi reportado que a família das ERK medeia a diferenciação celular e crescimento, enquanto a JNK e a p38 atuam nos mecanismos de apoptose e alteração da expressão gênica em resposta ao estresse (Kyaw, Yoshizumi *et al.*, 2004).

Estudos prévios com animais SHR mostraram o aumento da ativação tanto da ERK1/2 quanto da JNK no coração desses animais durante os estágios pré-hipertensivo e de estabelecimento da hipertensão (Izumi, Kim *et al.*, 2000; Kacimi e Gerdes, 2003). Estes achados indicam o envolvimento dessas MAPK no mecanismo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica dos SHR. A ERK1/2 é uma cinase citoplasmática que é ativada pela ação de uma cascata de outras cinases. No topo desta via estão importantes fatores de estimulação relacionados a receptores de membrana. O primeiro é a ativação de receptores acoplados à proteína G. Parte desses receptores, ao serem ativados, estimulam fosfolipases e mecanismos de ativação de segundos mensageiros que promovem a ativação da via Ras/Raf (Heineke e Molkenin, 2006).

A via Ras/Raf também está associada à ativação de receptores tirosina cinases de fatores de crescimento, como o IGF e EGF, além de outros. Quando ativados, através da fosforilação de resíduos de tirosina, estimulam diversas moléculas sinalizadoras, incluindo o  $\text{Ca}^{2+}$ , tirosinas cinases e espécies ativas de oxigênio (EAO) (Clerk, Cullingford *et al.*, 2007). Desta forma, a ativação destes receptores pode também promover a ativação da cascata de cinases que culmina na fosforilação e ativação da ERK1/2. Esta MAPK, uma vez fosforilada é translocada para o núcleo e ativa a transcrição gênica de proteínas hipertróficas (Sugden, 2001).

Por outro lado, situações de estresse celular oxidativo ou osmótico promovem preferencialmente a ativação das MAPK p38 e JNK, (Tibbles e Woodgett, 1999). O início da cascata de ativação destas MAPK frequentemente inicia com a ativação da cinase regulada por sinais apoptóticos 1 (do inglês “apoptosis signal-regulating kinase 1”, ASK1). Essa cinase é membro de uma família de cinases das MAPK e culmina na ativação da p38 e da JNK. Esta via está fortemente relacionada com mecanismos apoptóticos celulares (Matsuzawa e Ichijo, 2005).

Outra importante via proliferativa é a via da proteína cinase B, também chamada de Akt. As proteínas ativadas pela Akt fosforilam uma grande variedade de substratos intracelulares que regulam o crescimento, o metabolismo e a sobrevivência celular (Debosch, Sambandam *et al.*, 2006). A Akt fosforila e inibe o produto do gene TSC2, um inibidor do importante fator que promove o crescimento tecidual, o “mammalian target of rapamycin” (mTOR) (Inoki, Li *et al.*, 2002). A via do fosfatidil inositol-3-cinase (PI3K)/Akt

está ativada no coração de ratos em resposta à sobrecarga de pressão e também por fatores neuroendócrinos (Oh, Fujio *et al.*, 1998). No entanto, ainda existem muitas controvérsias em relação ao seu papel no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica, pois os aumentos da sua expressão e ativação foram também evidenciados em estudos com a hipertrofia cardíaca fisiológica (Debosch, Treskov *et al.*, 2006).

Outras vias intracelulares que desempenham importante papel na determinação morfofuncional da hipertrofia cardíaca patológica são as vias apoptóticas, como a via das caspases e da família bcl2. Estudos realizados com ratos SHR mostraram um aumento da expressão da caspase-3 e da relação Bax/Bcl2 no coração hipertrófico (Lee, Cho *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica, verificou-se a perda gradativa do número de cardiomiócitos, o que permite o maior desenvolvimento das células remanescentes e a proliferação fibroblástica (Iwata, Cowling *et al.*, 2005). Assim, a ativação progressiva de vias apoptóticas, estimuladas principalmente por fatores neuroendócrinos, deve ser determinante para o desenvolvimento do padrão morfofuncional da hipertrofia cardíaca patológica em animais SHR.

Na literatura científica existem achados que demonstram a ação da angiotensina II sobre o seu receptor AT<sub>1</sub> e a ativação de importantes vias de sinalização intracelulares. No tecido cardíaco, a angiotensina II apresenta papéis controversos dependendo da célula estimulada e da sua concentração. Estudos indicam o papel hipertrófico da angiotensina II, através da ativação de vias de crescimento celular (Aoki, Richmond *et al.*, 2000). No entanto, outros

trabalhos demonstraram que altas concentrações deste peptídeo estimulam vias apoptóticas (Fabris, Candido *et al.*, 2007). Em cardiomiócitos, a angiotensina II estimula a ativação da p38-MAPK que, por sua vez, ativa proteínas ativadoras (AP-1), e estas, ativam o TGF- $\beta$ 1. Esse último fator de crescimento tecidual pode apresentar, além do seu papel proliferativo, uma ação pró-apoptótica e está associado ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca induzida por angiotensina II (Schröder, Heger *et al.*, 2006).

Além do TGF- $\beta$ 1, membros da família bcl-2 também podem mediar a apoptose no músculo cardíaco (Fortuño, Ravassa *et al.*, 1998). A família bcl-2 é composta por mais de 15 membros, classificados como anti- ou pró-apoptóticos. O bcl-2 é um fator de sobrevivência, enquanto o bax acelera o processo apoptótico. Logo, a razão bax/bcl-2 determina a sobrevivência ou a morte celular após um estímulo apoptótico (Diep, El Mabrouk *et al.*, 2002). Outros fatores envolvidos na regulação da apoptose são as proteases que pertencem à família das caspases, especialmente a caspase-3 (Nicholson e Thornberry, 1997). Em um estudo, utilizando o modelo de hipertensão induzida por angiotensina II, verificou-se o aumento da expressão da caspase-3 e aumento da razão bax/bcl2, sendo que o tratamento com losartan, um bloqueador do receptor AT<sub>1</sub>, determinou a diminuição da expressão desses fatores nos corações hipertrofiados (Diep, El Mabrouk *et al.*, 2002). A avaliação desses fatores em ratos SHR também demonstrou o aumento da expressão do bax no ventrículo esquerdo (Fortuño, Ravassa *et al.*, 1998). Além disso, a administração de angiotensina II em cardiomiócitos de SHR

elevou a expressão da caspase-3 assim como do bax (Ravassa, Fortuño *et al.*, 2000).

Dessa forma, ao estudarmos as vias de sinalização relacionadas com a hipertrofia cardíaca, verificamos que os estudos não afirmam quais vias estão exatamente associadas com o padrão fisiológico e quais estão com o padrão patológico. O que verificamos na literatura é a constatação de que existem vias relacionadas com a sobrevivência celular e outras com a morte. Assim, acredita-se que o equilíbrio entre essas vias ou o predomínio de uma sobre a outra determinem o desenvolvimento destes padrões hipertróficos. Nesse aspecto, os diversos fatores neuroendócrinos, parácrinos e até mesmo autócrinos que atuam sobre o coração desempenham um papel fundamental no controle, na regulação e na estimulação destas vias.

### **1.3. Relação Estresse Oxidativo e Hipertrofia Cardíaca**

O estresse oxidativo parece intermediar o desenvolvimento dos diferentes padrões de hipertrofia cardíaca, e a sua estreita relação com diversos fatores hipertróficos pode justificar esse papel. Sabe-se que na hipertensão ocorre o aumento do estresse oxidativo e desequilíbrio redox (Touyz, 2004). Fatores esses já citados na literatura como capazes de diretamente ativar vias de sinalização intracelulares (Akao, Ohler *et al.*, 2001). Por outro lado, no exercício, apesar de haver aumento da produção de EAO, também ocorre aumento das defesas antioxidantes (Bertagnolli, Campos *et al.*, 2006). Essa modulação do estresse oxidativo pode alterar o padrão de

ativação de vias de sinalização intracelulares e determinar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica.

O aumento da produção de EAO está relacionado com diversos mecanismos envolvidos com o remodelamento cardíaco. Em cardiomiócitos isolados, o moderado aumento destas espécies induz hipertrofia e apoptose (Siwik, Tzortzis *et al.*, 1999). No entanto, já foi demonstrado que a utilização de antioxidantes inibiu a hipertrofia induzida pela angiotensina II (Nakamura, Fushimi *et al.*, 1998). Além disso, o tratamento com a vitamina E preveniu o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por hipertireoidismo (Araujo, Enzweiler *et al.*, 2007). Esses achados mostram a participação do estresse oxidativo nos mecanismos hipertróficos.

Os efeitos mitogênicos das EAO no coração podem envolver a modulação de mecanismos de sinalização sensíveis ao estado redox, como os mediados por MAPK. Essas ativam fatores transcricionais e induzem a hipertrofia cardíaca patológica (Aikawa, Komuro *et al.*, 1997; Sugden, 2001). No estudo realizado por Li e colaboradores (Li, Gall *et al.*, 2002), foi observado que o aumento da atividade da NADPH oxidase em cardiomiócitos, um importante gerador de ânion superóxido, foi acompanhado pela ativação das MAPK ERK1/2, ERK5 e p38.

Em animais SHR, a angiotensina II parece estimular o estresse oxidativo por aumentar a produção de ânion superóxido através da ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Frank, Eguchi *et al.*, 2000). Além disso, o complexo da NADPH oxidase é formado por um núcleo heterodímero constituído por duas subunidades: p22phox e

gp91phox; e quatro subunidades reguladoras: p40phox, p47phox, p67phox e rac1 (Babior, 1999). Alguns estudos mostraram a presença da NADPH oxidase em cardiomiócitos de corações com hipertrofia de ventrículo esquerdo (Mohazzab-H, Kaminski *et al.*, 1997). Esses dados podem, assim, indicar a maior produção de EAO pela NADPH oxidase durante a hipertrofia cardíaca patológica.

Dessa forma, as EAO, assim como as MAPK, parecem estar envolvidas no remodelamento vascular e cardíaco em diversas condições patológicas, como na hipertensão (González, Fortuño *et al.*, 2003). Sabe-se que as MAPK são sensíveis ao estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) estimula a atividade e a expressão de alguns membros da família das MAPK, como ERK1/2, JNK e p38, em células musculares lisas da aorta de ratos (Yoshizumi, Abe *et al.*, 2000). O  $H_2O_2$  também pode diretamente ativar vias apoptóticas, como a via da caspase-3 (Akao, Ohler *et al.*, 2001). Além disso, não apenas o aumento das EAO, mas também o estado redox pode contribuir para a modulação de vias de sinalização. A alteração do estado redox induzida pela angiotensina II ativa vias de sinalização como a p38 e TGF- $\beta$ 1, sendo que a utilização de antioxidantes preveniu a ativação dessas vias (Wenzel, Taimor *et al.*, 2001). Esses achados indicam que a alteração do estado oxidativo cardíaco, induzida pela angiotensina II, apresenta um papel importante na mediação da ativação de vias de sinalização intracelulares.

Dessa forma, verificamos a importância da realização de estudos que indiquem as vias de sinalização relacionadas com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, tanto patológica quanto fisiológica. Igualmente importante

é a pesquisa em torno da associação destas vias de sinalização com o estado redox e a função cardíaca. Este conhecimento facilitará o entendimento dos mecanismos pelos quais diferentes formas de intervenções, farmacológicas ou não, podem influenciar e modificar os padrões de remodelamento.

#### **1.4. Papel do Exercício sobre a Hipertrofia Cardíaca**

O estudo do papel do exercício sobre os mecanismos hipertróficos é importante, não apenas pelo fato deste ser utilizado como uma ferramenta de indução de hipertrofia fisiológica, mas também por agir sobre diversos mecanismos celulares associados à hipertrofia cardíaca.

Em animais normotensos, o exercício crônico induz hipertrofia cardíaca, embora esse efeito dependa do protocolo utilizado (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2001). Atualmente o exercício de natação em ratos mostrou-se mais eficiente para a indução de hipertrofia cardíaca quando comparado ao realizado em esteira. Isto provavelmente se deve ao fato de que no ambiente aquático ocorre um importante aumento da sobrecarga de volume e do retorno venoso (Medeiros, Oliveira *et al.*, 2004). Na água, a associação de exercícios dinâmicos com o efeito da imersão deve colaborar para o aumento da hipertrofia cardíaca. Em ratos submetidos ao treinamento de natação, verificou-se o aumento do tamanho do coração associado à melhora da função cardíaca (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2003; Medeiros, Oliveira *et al.*, 2004). Assim, o exercício freqüentemente é utilizado em experimentos que

buscam elucidar os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica.

No entanto, o exercício também pode ser utilizado como uma forma de intervenção sobre os mecanismos relacionados com a hipertrofia cardíaca patológica. O treinamento físico moderado diminui os valores de pressão arterial em animais SHR (Gava, Vêras-Silva *et al.*, 1995; Bertagnolli, Campos *et al.*, 2006), colaborando com a redução da hipertrofia cardíaca nesse modelo. Embora o efeito do exercício sobre o peso cardíaco de ratos SHR dependa da metodologia utilizada, estudos demonstraram que o exercício crônico diminui discretamente a hipertrofia cardíaca em animais SHR, e melhora o metabolismo e a função cardíaca (Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2001; Iemitsu, Miyauchi *et al.*, 2003; Lee, Cho *et al.*, 2006). Acredita-se que essa redução da hipertrofia ocorra pela modificação do seu padrão patológico para um padrão semelhante ao fisiológico, induzida pelo exercício crônico.

Diversos mecanismos fisiológicos induzidos pelo exercício podem colaborar com a alteração da hipertrofia cardíaca em animais SHR. Dentre eles, a diminuição da frequência cardíaca, provavelmente induzida pela diminuição da atividade simpática ao coração (Negrao, Moreira *et al.*, 1992), e da resistência vascular periférica (Grassi, Seravalle *et al.*, 1994). Ambos fatores promovem a diminuição do trabalho cardíaco e, conseqüentemente, diminuem a hipertrofia cardíaca.

Em relação aos fatores neuroendócrinos, a modulação do SRA cardíaco, induzida pelo exercício, pode alterar o padrão de hipertrofia cardíaca. A realização de treinamento de resistência em ratos normotensos

aumentou a expressão dos receptores  $AT_1$  no coração (Barauna, Junior *et al.*, 2005). Neste mesmo estudo, o tratamento com losartan preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento. Estes achados indicam que o SRA local exerce uma influência na determinação da hipertrofia cardíaca estimulada pelo exercício.

Em um estudo realizado com ratos SHR, o treinamento de natação promoveu a diminuição da concentração de angiotensina II plasmática, embora não tenha reduzido a sua concentração no tecido cardíaco (Filho (Filho, Ferreira *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo, foi observado o aumento da concentração de angiotensina 1-7 no coração, sem alteração da sua concentração plasmática. Estes resultados indicam que o treinamento físico modulou o SRA cardíaco mesmo em animais SHR.

Assim, o exercício parece apresentar efeitos benéficos sobre os mecanismos intracelulares que determinam a hipertrofia cardíaca. Esta ação benéfica pode ser determinada pela ativação de vias de sinalização de sobrevivência no tecido cardíaco. O exercício também diminui o estado apoptótico cardíaco de ratos SHR (Lee, Cho *et al.*, 2006). Dessa forma, achados da literatura indicam que o exercício crônico previne a hipertrofia cardíaca patológica de ratos SHR, provavelmente por alterar a expressão de vias de sinalização proliferativas e apoptóticas, embora esta relação ainda não esteja bem descrita na literatura.

Outro efeito cardioprotetor do exercício em animais SHR é a diminuição do estresse oxidativo no miocárdio, induzido tanto pela diminuição da produção de EAO, como pelo aumento da atividade das enzimas

antioxidantes nesse tecido (Hong e Johnson, 1995). O exercício parece exercer este efeito por modular a atividade simpática cardíaca e o SRA, dois sistemas já descritos como geradores de EAO.

Assim, embora algumas evidências sugiram o papel benéfico do exercício sobre a hipertrófica cardíaca patológica, ainda faltam estudos que demonstrem os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos. Além disso, ao ser utilizado como uma ferramenta de indução de hipertrofia cardíaca, o efeito pró-hipertrófico do exercício parece agir sobre mecanismos diferentes daqueles ativados em situações patológicas.

## 2. HIPÓTESE

H<sub>1</sub>: O exercício crônico diminui a atividade simpática, o estresse oxidativo e a hipertrofia cardíaca patológica em ratos espontaneamente hipertensos.

H<sub>2</sub>: O aumento do estresse oxidativo cardíaco está associado à ativação de vias de sinalização intracelulares pró-apoptóticas na hipertrofia cardíaca patológica de ratos espontaneamente hipertensos.

H<sub>3</sub>: O enalapril diminui o estresse oxidativo e a ativação de vias pró-apoptóticas cardíacas, contribuindo para a redução da hipertrofia e melhora da função cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos.

H<sub>4</sub>: O sistema renina-angiotensina estimula o estresse oxidativo e a ativação de vias hipertróficas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica.

H<sub>5</sub>: O treinamento físico promove a ativação de vias de sobrevivência e inibição de vias pró-apoptóticas em ratos espontaneamente hipertensos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o perfil do estresse oxidativo cardíaco em modelos de hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica, e verificar se existe associação com a ativação de vias de sinalização de crescimento celular, bem como com a função cardíaca.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar nos modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica:

- O perfil do estresse oxidativo cardíaco;
- As diferenças morfofuncionais cardiovasculares;
- A ativação de vias de sinalização de sobrevivência e pró-apoptóticas;
- O papel dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina, bem como do exercício crônico sobre o estresse oxidativo cardíaco.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos Wistar-Kyoto e espontaneamente hipertensos (SHR), com 15 semanas de idade e pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo quatro animais por caixa, e receberam ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada (20°C-25°C) e com ciclo claro escuro de 12 horas (das 6:00 às 18:00). Todos os protocolos realizados seguiram as normas da Comissão de Pesquisa e ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS e foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. A divisão dos grupos, bem como o *n* deste estudo, estão descritos nos materiais e métodos dos respectivos artigos.

### **4.2. Protocolos Experimentais de Treinamento Físico**

Os animais SHR foram submetidos ao protocolo de exercício físico 5 dias por semana, durante 10 semanas, em esteira ergométrica com divisórias de acrílico adaptada para ratos e camundongos (Imbramed TK-01). A duração da sessão, bem como a velocidade utilizada, aumentaram gradativamente até atingir o tempo de 1 hora e a velocidade de 25 m/min. Esta velocidade confere

ao protocolo uma intensidade de treinamento moderada de acordo com o teste de esforço máximo e avaliação da variação da concentração de lactato sanguínea previamente descritos por Bertagnolli e colaboradores (Bertagnolli, Campos *et al.*, 2006).

Os animais Wistar-Kyoto foram submetidos ao treinamento de natação, por este ser considerado um modelo descrito na literatura de indução de hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos e ratos (Evangelista, Brum *et al.*, 2003; Medeiros, Oliveira *et al.*, 2004). O treinamento de natação foi realizado 5 dias/semana e 1 hora de natação por dia. O protocolo foi realizado em um tanque adaptado com 12 divisórias de vidro para o treinamento de natação de ratos (1,00x0,80x0,80 m). A temperatura da água foi mantida em 30°C através de um sistema de aquecimento acoplado ao tanque.

A adaptação ao exercício de natação foi realizada a partir da 15ª semana de vida dos animais do experimento, sendo 15 minutos de exercício livre por dia, para que os animais se adaptassem ao ambiente aquático. A intensidade moderada do treinamento de natação foi determinada por um sobrepeso de chumbo amarrado à cauda dos animais. De acordo com Gobatto e colaboradores (Gobatto, De Mello *et al.*, 2001), sobrepesos de 4-6% do peso corporal do animal são considerados cargas aeróbicas e apresentam steady-state de lactato. Os animais deste experimento receberam sobrepeso equivalente a 4% do seu peso corporal.

### **4.3. Tratamento com Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina**

Os animais normotensos e hipertensos foram submetidos ao tratamento diário com enalapril ( $10 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), um inibidor da enzima conversora da angiotensina, por 10 semanas. O tratamento foi administrado uma vez por dia por *gavagem* intragástrica. Para tanto, os animais foram pesados semanalmente para o ajuste da dose.

### **4.4. Avaliações Hemodinâmicas**

#### **4.4.1. Procedimento Cirúrgico e Registro Intraarterial**

As avaliações hemodinâmicas foram realizadas através do procedimento cirúrgico de canulação intraarterial e intraventricular. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20 mg/kg) para implantação dos cateteres confeccionados em tubos tygon PE-50/PE-10 (Clay Adams, USA). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico 0,9% e heparina sódica (Liquelme-Roche, 5000U), na proporção de 0,5 mL para 0,02 mL, respectivamente. Através de uma incisão na região inguinal esquerda, as extremidades das cânulas foram introduzidas na artéria e veia femoral, para obtenção dos registros basais com o rato consciente da PA, frequência cardíaca (FC) e administração de drogas, respectivamente. Após esses procedimentos, os animais eram colocados em gaiolas individuais, aquecidos e receberam água e alimentos *ad libitum*.

Vinte e quatro horas após a cirurgia de canulação, a cânula arterial foi conectada a um transdutor eletromagnético de pressão (Strain-Gauge - Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) acoplado a um pré-amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais de PA e FC foram gravados em um microcomputador equipado com sistema de aquisição de dados (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) que permitiu a análise dos pulsos da pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal.

Para a avaliação do reflexo cardiopulmonar foram administradas doses intravenosas in bolus de 5-HT (serotonina, 2, 4, 8 and 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v., Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para induzir respostas hipotensoras e bradicárdicas. A comparação das respostas obtidas com os valores basais pré-injeções foi utilizada para calcular os índices do reflexo cardiopulmonar.

A variabilidade da PAS (var PAS) foi avaliada no domínio da frequência através da análise espectral. O processamento foi feito a partir de séries contínuas de 20 minutos de PAS, interpoladas a 250 Hz e decimadas para torná-la igualmente espaçada no tempo. Após a remoção de tendências lineares, a densidade espectral de potência foi obtida através da Transformada Rápida de Fourier (FFT) utilizando o método de Welch, sobre 16.384 pontos e janelas de Hanning com sobreposição de 50%. A potência espectral para as bandas de frequências baixas (LF 0,02 - 0,75 Hz) e altas (HF 0,75 - 4,00 Hz) foram calculadas através da integração da densidade espectral de potência em cada banda de frequência, utilizando uma rotina implementada (MATLAB 6.0, Mathworks).

#### **4.4.2. Procedimento Cirúrgico e Registros Intraventriculares**

Após o registro intraarterial, os ratos foram anestesiados com pentobarbital (45 mg/Kg) para a realização do procedimento intraventricular. Antes da colocação do catéter P50 no ventrículo, a pressão arterial foi registrada durante 2 minutos através da conexão da cânula arterial na carótida a um transdutor de pressão ligado ao amplificador de sinais. Logo após este registro, a cânula foi posicionada no ventrículo esquerdo e, após 5 minutos de estabilização, a pressão ventricular sistólica esquerda (LVSP) e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) foram registradas. Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (CODAS - Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 2000 Hz.

#### **4.5. Medidas Morfométricas Cardíacas e Preparo do Tecido**

Imediatamente após a medida das pressões intraventriculares e ainda sob efeito do anestésico, os animais do experimento foram pesados e mortos por deslocamento cervical, obedecendo as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. O coração e o músculo sóleo foram rapidamente extraídos e pesados. A relação entre o peso do coração, peso total dos ventrículos e peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (índice de hipertrofia cardíaca) foi expresso em

miligramas/gramas de peso corporal. Esta relação é aceita pela literatura como uma medida adequada de hipertrofia cardíaca no rato.

#### **4.6. Atividade da Enzima Citrato Sintase**

Os músculos sóleos foram homogeneizados durante 40 segundos em Ultra-Turrax, com tampão PBS (NaCl 136,8 mmol/L; KCl 2,7 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mmol/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mmol/L, pH 7,4) na proporção 100 mg/1 mL mais PMSF. Após, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -80°C para as posteriores dosagens.

A enzima citrato sintase é utilizada como um marcador da capacidade aeróbica do tecido avaliado, sendo também um indicador de adaptação ao treinamento físico. Sua atividade foi determinada utilizando a metodologia descrita por Alp (Alp, Newsholme *et al.*, 1976). A atividade enzimática foi avaliada a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA (coenzima A) liberada com o DTNB do meio. O tampão utilizado consiste em tris-aminometano 50 mmol/L, EDTA 1mmol/L, DTNB 0,2 mmol/L, oxaloacetato 0,5 mmol/L e Triton X-100 0,05% (v/v), ao qual é adicionado 10 µL do homogeneizado. O volume total do ensaio é de 1 mL e o pH 8,1. A reação é iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio de incubação e a cinética da reação se realiza a 25°C, por um intervalo de 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm.

#### 4.7. Concentração da Norepinefrina Cardíaca

A concentração da norepinefrina cardíaca foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando uma fase reversa ion-par de cromatografia acoplada a uma detecção eletroquímica (0,5 V), como previamente descrito por Naffah-Mazzacoratti e colegas (Naffah-Mazzacoratti, Casarini *et al.*, 1992). A separação isocrática foi realizada utilizando uma coluna RP 18 Brownlee (4,6 x 250 mm; Applied Biosystems, San Jose, CA, USA) eluída com a seguinte fase móvel: 20 mmol/L sódio dibásico fosfato, 20 mmol/L ácido cítrico, pH 2,64, contendo 10% methanol, 0,12 mmol/L Tris-EDTA, e 566 mg/L ácido heptanesulfônico. O tempo total para a análise das amostras foi de 30 minutos. A quantificação da norepinefrina foi realizada comparando as áreas dos picos das amostras com as áreas do padrão, utilizando diidroxibenzilamina (DHBA) como padrão interno. Os corações foram homogeneizados em ácido perclórico 0,1 mmol/L contendo 0,02% de sódio metabisulfite e 10 µL de 1 mmol/L de DHBA. Os homogeneizados foram mantidos overnight a 4°C e, após, centrifugados a 10000 rpm durante 50 minutos. Após, o supernatante foi filtrado e 100 µL foi injetado na coluna de fase reversa.

#### 4.8. Medidas de Dano Oxidativo

O dano oxidativo aos lipídeos foi avaliado através da quimiluminescência iniciada pelo hidroperóxido de tert-butil em solução

contendo homogeneizado cardíaco e avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden). O ensaio consiste em adicionar 3,5 mL de tampão (140 mmol/L de KCl, 20 mmol/L de fosfatos, pH 7,4) e 0,5 mL de homogeneizado para a realização da leitura basal. Adiciona-se ao meio de reação 30  $\mu$ L de t-BOOH (3 mmol/L) e realiza-se a segunda leitura (Gonzalez Flecha, Llesuy *et al.*, 1991).

O dano oxidativo às proteínas foi realizado utilizando o ensaio da determinação das carbonilas (Reznick e Packer, 1994). A técnica é baseada na reação das proteínas oxidadas do tecido com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido. Após sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos, incuba-se o ensaio com guanidina. A absorbância das carbonilas foi medida em espectrofotômetro a 360 nm.

#### **4.9. Atividade das Enzimas Antioxidantes**

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol

oxidado (Marklund, Oreland *et al.*, 1983). Para tanto, foram utilizados 15  $\mu$ l da amostra previamente preparada, tampão Tris-base, 8  $\mu$ l de pirogalol (24 mmol/L) e 4  $\mu$ l de catalase (30  $\mu$ mol/L). A variação na absorbância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

A atividade da CAT será avaliada através do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância ao comprimento de onda de 240 nm. O ensaio é realizado utilizando uma solução tampão de fosfatos de sódio a 50 mmol/L em pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (Aebi, 1984).

A atividade da enzima GPX é determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPX. Para tanto, adiciona-se 330  $\mu$ l de tampão de fosfatos 143 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), 500  $\mu$ l de NADPH (0,24 mmol/L), 10  $\mu$ L de azida sódica (1 mmol/L) para inibir a atividade da catalase, 50  $\mu$ l de GSH (5 mmol/L) e 10  $\mu$ L de glutathione redutase 0,25 U/mL. Após, adiciona-se 50  $\mu$ l de hidroperóxido de tert-butila (0,5 mmol/L), e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, será monitorada por aproximadamente 5 minutos. A absorbância é registrada a 340 nm e os resultados são expressos em nmoles/min/mg de proteína (Flohé e Günzler, 1984).

A dosagem das proteínas foi realizada seguindo o método de Lowry e colegas (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951).

#### 4.10. Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

O ensaio para a determinação da concentração do peróxido de hidrogênio é baseado na oxidação mediada pela peroxidase de rabanete (HRPO) e do vermelho de fenol através do peróxido de hidrogênio, levando à formação de um composto que absorve a 610 nm. As fatias de tecido cardíaco foram incubadas por 60 min a 37°C em um tampão fosfato à 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após, os sobrenadantes foram incubados com vermelho de fenol 0,28 mmol/L e HRPO 8,5 U/mL. Após 5 minutos, adicionou-se NaOH 1 mol/L e realizou-se a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g de tecido (Pick e Keisari, 1980).

#### 4.11. Avaliação do Metabolismo da Glutathiona

A razão entre a concentração da glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) foi determinada através da avaliação da concentração de glutathiona total e da sua forma oxidada no tecido cardíaco (100-200 mg) como descrito por Akerboom e Sies (Akerboom e Sies, 1981). Para determinar a concentração total de glutathiona (expressa em mmol/mg de proteína), o tecido foi desproteínizado com ácido perclórico 2 mol/L, centrifugado por 10 min 1000×g e o sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O ensaio foi realizado adicionando às amostras uma solução tampão de fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL e 5,5' dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)

70  $\mu\text{mol/L}$ . Para determinar a glutationa oxidada adicionou-se ao sobrenadante 20 mmol/L de N-etilmaleimida (NEM) e, após, as amostras também foram neutralizadas com hidróxido de potássio 2 mol/L. Após esta etapa, seguiu-se o mesmo procedimento de ensaio utilizado para a glutationa total. A leitura foi feita com um comprimento de onda de 412 nm. Os valores foram expressos em mmol/grama de tecido.

#### **4.12. Determinação dos Nitratos Totais**

A concentração dos nitratos totais no tecido cardíaco foi medida pela reação das amostras com o reagente de Griess. No meio da reação foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de amostra, 10  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,02 mmol/L, 7  $\mu\text{L}$  de Tris (1 mol/L, pH 7,5), 23  $\mu\text{L}$  de uma mistura de G6P/G6PDH (5 mmol/L e 10 U/mL, respectivamente) e 10  $\mu\text{L}$  de NR 1,0 U/mL. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftiletlenodiamina, 2,3 mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7 mL de água), o qual foi incubado, novamente, à temperatura ambiente sob agitação, por mais 10 minutos e a absorbância foi lida em ELISA a 540 nm.

Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrato de sódio 1 mmol/L e expressos em mmol/L (Granger, Anstey *et al.*, 1999).

#### 4.13. Expressão Protéica por Western Blot

A expressão protéica da Erk1/2, p38, Akt totais e fosforiladas, bem como do EGF, foram realizados por Western Blot. Para tanto, parte do coração (200-300 mg) foi homogeneizada em tampão contendo 20 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de EDTA, glycerol 10%, 20  $\mu$ mol/L de PMSF usando um homogenizador Politron por 40 segundos. As concentrações de proteína foram analisadas pelo método de Bradford (Bradford) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. 80  $\mu$ g de proteína foram utilizadas para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-14%. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH= 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados por 1 hora em incubação com solução bloqueadora (5% (p/v) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteccção utilizando-se os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-Akt total de cabra e anti-Akt fosforilada de coelho, anticorpo anti-EGF de coelho e anticorpo anti-ERK1/2 fosforilada de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e anticorpo anti-ERK1/2 total e anticorpo anti-p38 fosforilada e total de coelho (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Como anticorpos secundários foram utilizado os anticorpo anti-coelho e anticorpo anti-cabra

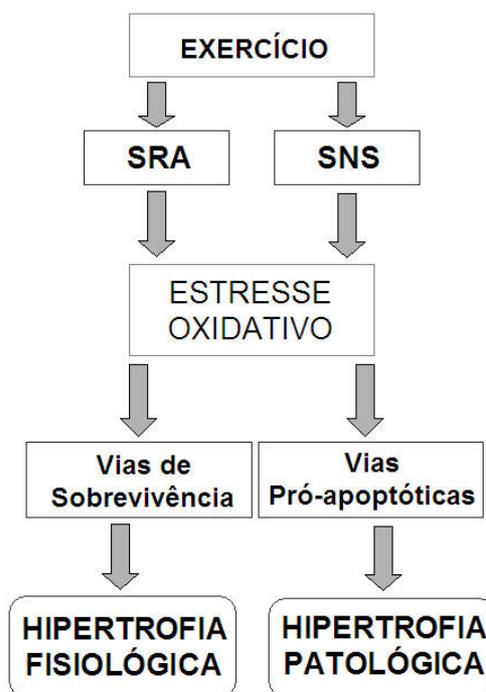
conjugados com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autoradiográficos foram analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados utilizando como referência um padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados foram normalizados através do método do Ponceau (Klein, Kern *et al.*, 1995).

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos resultados das análises, as médias e os seus desvios padrões foram calculados e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão em todos os artigos. Os dados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, o que justificou a utilização de testes estatísticos paramétricos para a obtenção das diferenças entre as médias. Os testes utilizados foram: teste t de Student para amostras não pareadas, ao compararmos apenas dois grupos (artigos I e II); ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Student-Newmann-Keuls ao compararmos quatro grupos e considerando dois fatores de influência (artigos III, IV e V); correlação de Pearson para realizarmos as associações entre os diferentes parâmetros obtidos. O Software utilizado para a realização da análise estatística foi o SigmaPlot, versão 11.0. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos em forma de artigos para a submissão em revistas internacionais. A divisão dos resultados em cinco artigos, bem como a ordem da sua apresentação, seguem a seqüência proposta na Figura 1 e tem como objetivo elucidar os mecanismos propostos por este estudo.



**Figura 1** – Apresentação do eixo elaborado a partir da hipótese e objetivos da tese. Esta figura ilustra a seqüência dos mecanismos estudados.

## 6.1. Artigo I

---

Título: **“Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats.”**

---

Status: Artigo aceito – *American Journal of Hypertension*, 2008 [Epub ahead of print]

Objetivo: Determinar *in vivo* as alterações da modulação simpática cardíaca e do estresse oxidativo induzidas pelo exercício, e se estes parâmetros estão associados com a hipertrofia cardíaca em animais SHR.

Conclusão: O treinamento físico atenuou a modulação simpática e a hipertrofia cardíaca patológica dos animais SHR. Estes parâmetros estavam associados à redução do estresse oxidativo cardíaco.

---



**Figura 2** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo I.













## 6.2. Artigo II

---

Título: **“Cardiac oxidative stress and p38 activation in spontaneously hypertensive rats pathological cardiac hypertrophy”.**

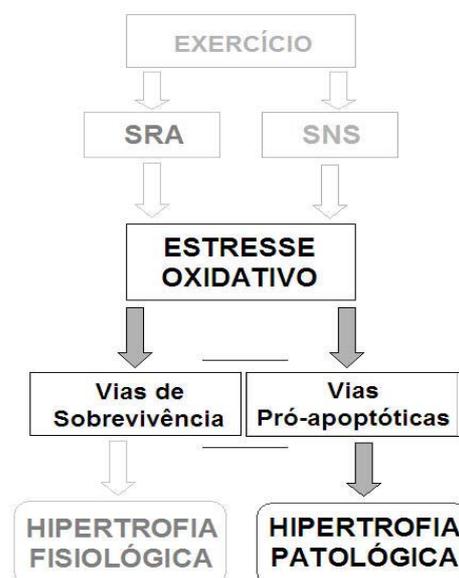
---

Status: Artigo submetido – *Journal of Hypertension*, 2008

Objetivo: Avaliar *in vivo* o estresse oxidativo cardíaco em ratos SHR com hipertensão estabelecida e estabelecer associações com a ativação de MAPK e com parâmetros morfológicos da hipertrofia cardíaca.

Conclusão: Os resultados indicam o elevado estresse oxidativo cardíaco na fase estabelecida da hipertensão, e esse está associado a mecanismos pró-apoptóticos que determinam a hipertrofia patológica e a disfunção cardíaca.

---



**Figura 3** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo II.



















































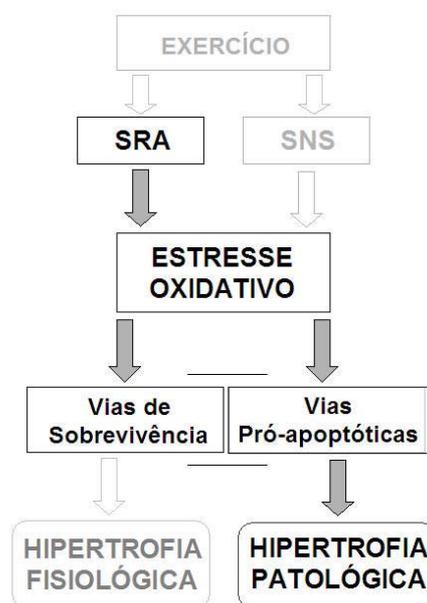
### 6.3. Artigo III

**Título:** “Enalapril improves oxidative status and reduces p38 activation and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.”

**Status:** Artigo submetido – *Hypertension*, 2008 (Supplemental Submission by Council of High Blood Pressure Research).

**Objetivo:** Avaliar *in vivo* os efeitos do enalapril sobre o perfil oxidativo e hipertrofia cardíaca, e se esse tratamento modifica a ativação das MAPK e Akt em SHR com hipertensão estabelecida.

**Conclusão:** O tratamento com o enalapril determinou efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular por melhorar a função cardíaca e diminuir a hipertrofia patológica, o estresse oxidativo e a ativação da p38.



**Figura 4** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo III.



















































## 6.4. Artigo IV

---

**Título:** “Renin-angiotensin system influence on physiological cardiac hypertrophy: modulation of oxidative stress, hypertrophic pathways and epidermal growth factor.”

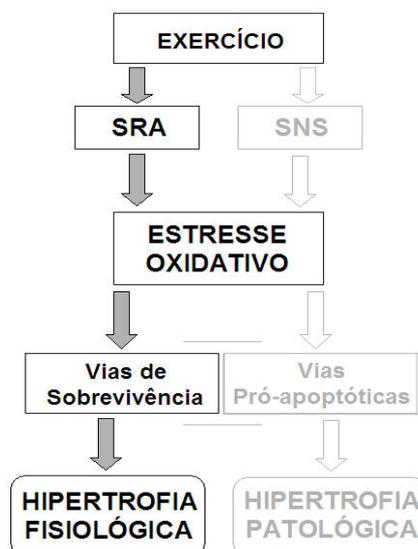
---

**Status:** Artigo Escrito.

**Objetivo:** Avaliar o estresse oxidativo cardíaco e mecanismos hipertróficos em ratos treinados, e se o SRA participa no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica.

**Conclusão:** O modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica apresenta diminuição do estresse oxidativo e aumento da ativação da ERK1/2 e Akt. O SRA influencia o desenvolvimento desse padrão de hipertrofia, provavelmente por estimular o EGF.

---



**Figura 5** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo IV.

































































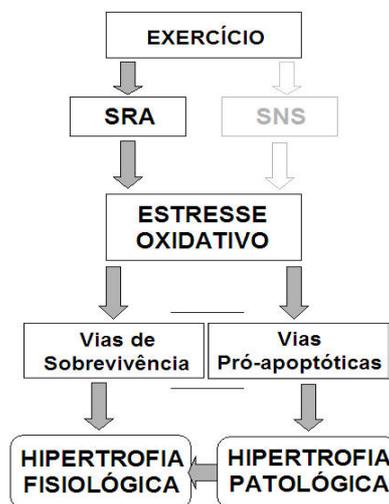
## 6.5. Artigo V

**Título:** “Exercise training reduces pathological cardiac hypertrophy through decreasing cardiac oxidative stress and stimulating intracellular survival mechanisms.”

**Status:** Artigo escrito.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do exercício em animais SHR sobre o estresse oxidativo e vias intracelulares, e determinar a participação do SRA no mecanismo de redução da hipertrofia cardíaca patológica.

**Conclusão:** Os achados indicam que o exercício reduziu a hipertrofia cardíaca patológica de SHR provavelmente por diminuir o estresse oxidativo e a ativação da p38, e por ativar a Akt. O SRA parece contribuir, ainda que discretamente, para alguns efeitos benéficos induzidos pelo exercício, como a ativação da Akt.



**Figura 6** – Eixo esquemático representando os mecanismos avaliados no artigo V.

























































## 7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

A avaliação do perfil oxidativo cardíaco em diferentes modelos de hipertrofia cardíaca indica a participação do estresse oxidativo apenas em condições patológicas. Em situações fisiológicas, como na induzida pelo exercício, o estresse oxidativo encontra-se diminuído e parece não estar associado à promoção da hipertrofia cardíaca.

Os artigos I e II demonstraram a participação do estresse oxidativo na hipertrofia cardíaca patológica de animais hipertensos. Nestes dois estudos mostramos a associação direta de parâmetros do estresse oxidativo com o índice de hipertrofia cardíaca. Apesar de não estabelecermos uma relação causa/efeito, a correlação direta nos indica que, os mecanismos que promovem a hipertrofia cardíaca patológica também interferem no estresse oxidativo cardíaco.

No artigo I, ao utilizarmos o exercício como uma intervenção anti-hipertensiva, verificamos que a redução da atividade simpática cardíaca em animais treinados também está associada à diminuição do estresse oxidativo. Este achado indica o provável papel do SNS promovendo este estresse e, assim, estimulando o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica. Na literatura, outros estudos corroboram com este mecanismo e também verificaram que a ação da noradrenalina sobre as células cardíacas estimula a produção de EAO (Amin, Xiao *et al.*, 2001). O estresse oxidativo presente nos cardiomiócitos é desencadeado principalmente pela ativação de receptores alfa-adrenérgicos e parece envolver também a ativação da NADPH oxidase

(Xiao, Pimentel *et al.*, 2002). Nesses estudos, o aumento das EAO está associado aos estímulos hipertróficos dos cardiomiócitos. Assim, a redução da atividade simpática sobre o coração não promove apenas a redução da pressão arterial, mas também pode modificar mecanismos bioquímicos e moleculares cardíacos que culminam na redução da hipertrofia cardíaca patológica nos SHR.

Ao avaliarmos alguns possíveis mecanismos moleculares relacionados com a hipertrofia cardíaca patológica, verificamos que a via das MAPK parece desempenhar um papel importante neste desenvolvimento. No artigo II, ao compararmos dois componentes dessa via em animais normotensos e hipertensos, verificamos que, durante o estágio de hipertensão e hipertrofia estabelecidas, a p38 MAPK encontra-se mais ativada. Por outro lado, a ERK1/2 está inibida nesses animais hipertensos. Este desequilíbrio entre a ativação das MAPK pode ser justificado pelo elevado estresse oxidativo cardíaco, uma vez que verificamos fortes associações entre esses parâmetros. Embora o estresse oxidativo esteja fortemente associado à ativação da p38, a correlação inversa entre a oxidação protéica e a ativação da ERK1/2 indica que essa MAPK pode estar sendo inibida em uma situação de elevado estresse cardíaco.

De fato, a literatura nos mostra que a via da p38, também considerada uma MAPK ativada pelo estresse celular, está elevada em condições de lesão celular e situações pro-apoptóticas (Tibbles e Woodgett, 1999; Baines e Molkenin, 2005). Além disso, a estreita relação desta MAPK com a ativação de vias apoptóticas nos indica o estado pró-morte celular na fase de

hipertensão e hipertrofia estabelecidas. Esse estado, apesar de promover a perda de cardiomiócitos, também está relacionado com o acúmulo de tecido intersticial e com a fibrose cardíaca (Fortuño, Ravassa *et al.*, 2001). Um estudo avaliou o envolvimento da p38 nos mecanismos de proliferação fibroblástica, e verificou que, a utilização de inibidores da p38 diminuiu a quantidade de tecido fibroso e melhorou a função cardíaca (See, Thomas *et al.*, 2004). Assim, o artigo II dessa tese mostra o desequilíbrio entre os componentes da via das MAPK com o predomínio da ativação da p38, o que sugere o estado pró-apoptótico do tecido cardíaco em animais SHR durante a fase de hipertensão estabelecida.

Em condições patológicas, além do SNS, o SRA também parece modular estes mecanismos hipertróficos. O artigo III mostra que o tratamento de ratos normotensos e hipertensos com o enalapril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina, modificou o perfil oxidativo cardíaco e a ativação da p38. A diminuição do estresse oxidativo cardíaco ocorreu tanto em animais normotensos quanto hipertensos. Esse achado nos indica que a modulação do estresse oxidativo cardíaco não depende apenas dos fatores mecânicos agindo sobre esse tecido. Além disso, nosso estudo também mostrou que a diminuição do estresse oxidativo, provavelmente induzida pela inibição do SRA, interferiu apenas na ativação da p38 e não sobre a ERK1/2 e a Akt. Outros estudos também demonstraram a relação da p38 com a angiotensina II. Estudos *in vitro* com cardiomiócitos mostraram que elevadas concentrações de angiotensina II estimulam a p38 e processos apoptóticos celulares (Yu, Akishita *et al.*, 2006). Além disso, o aumento da produção de EAO induzido

pela angiotensina II mediou mecanismos apoptóticos em cardiomiócitos (Hingtgen, Tian *et al.*, 2006; Yu, Akishita *et al.*, 2006). Assim, a angiotensina II parece contribuir para o estabelecimento da hipertrofia patológica. Ainda, através da sua influência sobre fatores bioquímicos e moleculares, o SRA estimula mecanismos relacionados com processos apoptóticos e mal-adaptativos no coração, o que resulta na piora da função cardíaca.

Assim, os três primeiros artigos deste estudo demonstram a associação do estresse oxidativo na mediação de mecanismos hipertróficos e apoptóticos cardíacos. Esse elevado estresse oxidativo, verificado em condições patológicas, pode determinar o predomínio de vias relacionadas com respostas mal-adaptativas e corrobora com o estabelecimento da disfunção mecânica na fase de sustentação e de transição para a insuficiência cardíaca.

Por outro lado, em situações fisiológicas, o estresse oxidativo parece não intervir sobre os mecanismos hipertróficos. O artigo IV deste estudo nos mostra que o estresse oxidativo cardíaco encontra-se significativamente reduzido na hipertrofia cardíaca fisiológica. Esse modelo, induzido pelo exercício, promoveu o aumento da defesa antioxidante enzimática cardíaca e melhorou o balanço redox, avaliado através do metabolismo da glutathione. No entanto, esta condição de baixo estresse oxidativo não ocasionou a redução do tamanho do coração. Pelo contrário, o que verificamos foi um importante aumento da hipertrofia cardíaca após o exercício crônico. Outros estudos também mostraram que o exercício melhorou o perfil oxidativo no coração (Kakarla, Vadluri *et al.*, 2005; Watson, Reusch *et al.*, 2007), principalmente por aumentar as defesas antioxidantes, já que o elevado metabolismo oxidativo

corporal, induzido pelo exercício, promove aumento da produção de EAO. O aumento dessas espécies durante o exercício ocorre principalmente por via mitocondrial e por ativação da xantina oxidase (Ascensão, Magalhães *et al.*, 2005). Estes mecanismos aumentam principalmente a produção de ânion superóxido no músculo cardíaco. Assim, a produção de EAO, pode, de forma compensatória, estimular o aumento da atividade das enzimas que dismutam e catalisam essas espécies em moléculas menos reativas (Atalay e Sen, 1999; Ji, 2002; Ji, Gomez-Cabrera *et al.*, 2006). Sendo assim, o aumento da defesa antioxidante enzimática associada à hipertrofia cardíaca fisiológica pode determinar a redução do estresse oxidativo cardíaco e a inibição dos seus efeitos deletérios sobre o tecido.

Assim, como o estresse oxidativo cardíaco compensado parece não ser o elemento chave na promoção da hipertrofia cardíaca fisiológica, investigamos, então, a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) no tecido cardíaco. De fato, a literatura mostra que essa expressão encontra-se elevada na hipertrofia cardíaca fisiológica, e pode estar associada com a ativação das vias de crescimento tecidual. Estes resultados demonstram o papel hipertrófico do EGF sobre os cardiomiócitos. Além disso, o aumento da expressão do EGF foi também verificado em humanos após uma sessão de exercício (Konradsen e Nexø, 1988). O receptor do EGF apresenta atividade tirosina cinase, isto é, pode ativar vias de sinalização independentes do estresse oxidativo, como a Ras/Raf/ERK1/2 (Shah e Catt, 2003; Heineke e Molkentin, 2006). Esses achados corroboram com os nossos resultados e

demonstram que este fator pode ser importante para a determinação de respostas adaptativas em situações fisiológicas como o treinamento físico.

O artigo IV também mostrou a ativação de vias envolvidas com processos de sobrevivência e crescimento celular no modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica. Verificamos que tanto a ERK1/2 quanto a Akt encontravam-se mais ativadas na hipertrofia fisiológica. Outros estudos também mostraram o aumento da ativação da ERK1/2 cardíaca após o treinamento físico (Melling, Thorp *et al.*, 2007; Hunter, Koch *et al.*, 2008). Além disso, um modelo transgênico que apresenta aumentada ativação da ERK1/2 possui hipertrofia cardíaca compensada sem fibrose associada (Bueno, De Windt *et al.*, 2000).

De fato, a via da Akt desempenha um papel fundamental no desenvolvimento hipertrófico do coração. A sua ativação está relacionada com processos fisiológicos nesse tipo de hipertrofia (Kemi, Ceci *et al.*, 2008). A Akt pode contribuir para o desenvolvimento de repostas adaptativas cardíacas através de dois mecanismos. Um deles, através da ativação do mTOR. O mTOR age sobre os ribossomos estimulando a síntese protéica, sendo um importante fator relacionado a situações de hipertrofia muscular (Heineke e Molckentin, 2006). A outra contribuição da Akt para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca é a inibição da cinase da glicogênio sintase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). A GSK3 $\beta$  é uma cinase que inibe fatores transcricionais hipertróficos, como NFAT e c-Myc (Proud, 2004). Sendo assim, a sua inibição pela Akt favorece o estabelecimento da hipertrofia cardíaca (Heineke e Molckentin, 2006).

O EGF pode também estimular a via da Akt e a ERK1/2 através da ativação do seu receptor tirosina cinase (Heineke e Molckentin, 2006; Clerk, Cullingford *et al.*, 2007). Esse mecanismo pode justificar a ativação destas vias sem a participação do estresse oxidativo. O baixo estresse oxidativo, verificado nesse estudo, sugere a participação de outros mecanismos relacionados, que podem participar do processo hipertrófico, tais como dos receptores tirosina cinases e de subseqüentes vias como PI3K/Akt e Ras/Raf/ERK1/2 no processo de hipertrofia fisiológica.

Dessa forma, ao compararmos os resultados do estresse oxidativo cardíaco e da ativação das vias de sinalização entre os modelos de hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica, verificamos diferentes perfis que auxiliam na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesses processos. Enquanto a hipertrofia patológica é caracterizada pelo elevado estresse oxidativo e predomínio de ativação de vias pró-apoptóticas, a hipertrofia fisiológica é caracterizada pelo baixo estresse oxidativo associado à ativação de importantes vias de sobrevivência e crescimento celular. Esse raciocínio também foi proposto por Matsuzawa e colaboradores (Matsuzawa e Ichijo, 2005) ao revisar as vias de sinalização intracelulares apoptóticas reguladas pelo estresse e estado redox, porém não diretamente relacionadas com a hipertrofia cardíaca. Assim, o nosso estudo mostra esses eixos de ativação e ainda relaciona com características funcionais cardíacas e morfológicas, o que contribuiu de maneira decisiva para a aceitação do mecanismo proposto.

Nesse contexto, buscamos então avaliar a participação do SRA nos mecanismos hipertróficos fisiológicos. No artigo III, havíamos avaliado o papel

deste sistema sobre a hipertrofia patológica. No artigo IV, ao inibirmos este sistema através do enalapril em animais normotensos, nós verificamos que o SRA participa de forma importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica. Embora a associação do enalapril com o exercício tenha reduzido discretamente a PAM e a PAD comparada ao grupo controle sedentário, as diferenças observadas em relação aos parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares entre os dois grupos treinados apontam para uma significativa ação pró-hipertrófica fisiológica do SRA.

Assim, em condições fisiológicas, nós propomos que o SRA, provavelmente, por ação da angiotensina II, estimule o aumento do EGF e a conseqüente ativação de vias de crescimento celular adaptativas, colaborando para a melhora da função cardíaca pós-treinamento. Esse raciocínio é reforçado por estudos na literatura que também mostraram a participação do SRA no desenvolvimento da hipertrofia após treinamento de resistência. Barauna e colaboradores (Barauna, Junior *et al.*, 2005) demonstraram o aumento da expressão do receptor AT1 no coração hipertrofiado. Além disso, ao associarem o treinamento com o losartan, um bloqueador deste receptor, a hipertrofia cardíaca foi significativamente reduzida. Assim, o nosso estudo é um dos pioneiros nessa linha de pesquisa, por mostrar a participação do SRA e o seu papel modulador sobre a ativação das vias de crescimento celular e sobre o EGF.

Ainda nesse contexto, ao avaliarmos o papel do SRA sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo exercício em animais hipertensos, nós verificamos que, em condições patológicas, onde este sistema já se encontra

ativado, a sua participação é bem menos importante. Assim, no último artigo (V) deste trabalho, ao avaliarmos o efeito isolado do treinamento físico em esteira sobre a hipertrofia cardíaca patológica do SHR, verificamos que este diminuiu o estresse oxidativo e promoveu uma importante alteração do padrão de ativação das vias de sinalização intracelulares. Mostramos também que o treinamento isolado diminuiu a ativação da p38 e aumentou a fosforilação da Akt. A participação do SRA nesse modelo mostrou que, com a associação do enalapril ao treinamento, a inibição desse sistema preveniu o aumento da ativação da Akt. Porém, não sabemos ao certo se no grupo apenas treinado o aumento da Akt se deve realmente ao SRA, uma vez que um estudo prévio mostrou a diminuição da angiotensina II cardíaca em SHR após o treinamento (Filho, Ferreira *et al.*, 2008). Assim, verificamos a necessidade da realização de uma avaliação mais aprofundada sobre o envolvimento do SRA no remodelamento cardíaco induzido pelo exercício na hipertensão.

O efeito do treinamento físico isolado sobre a ativação da p38 em animais SHR não foi ainda mostrado na literatura. No entanto, prévios estudos mostraram que o exercício nesse animal diminuiu a expressão de fatores pró-apoptóticos cardíacos, como caspase-3 e p53 (Sanchez-Prieto, Rojas *et al.*, 2000; Zhuang, Demirs *et al.*, 2000). Esses resultados, então, corroboram com o nosso ao mostrarem que as vias pró-apoptóticas, ativadas em situações patológicas, são moduladas pelo exercício. E ainda, essa modulação provavelmente contribui para a melhora da função cardíaca e redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo em animais SHR.

A escolha pelo treinamento em esteira, no experimento do artigo V, se deve ao fato de que, em um estudo prévio realizado em nosso laboratório com animais SHR, foi observada a redução da relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal utilizando o mesmo protocolo (Bertagnolli, Campos *et al.*, 2006). Além disso, um estudo realizado com o treinamento de natação nesse mesmo modelo mostrou o aumento do índice de hipertrofia cardíaca, considerando tanto o peso do coração quanto o peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (Filho, Ferreira *et al.*, 2008). Desta forma, verificamos que, em animais SHR, a modificação do padrão de hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício depende da metodologia utilizada, isto é, da modalidade do exercício e da sua intensidade.

Assim, em conjunto, nossos resultados indicam o papel importante do estresse oxidativo sobre a hipertrofia cardíaca patológica, bem como a sua associação com a modulação das vias de sinalização intracelulares envolvidas neste processo. O estresse oxidativo parece promover alterações no tecido cardíaco que determinam a ativação de vias pró-apoptóticas e estimulam respostas mal-adaptativas levando à disfunção deste órgão. No entanto, o exercício, por modular a participação do SNS e SRA sobre o coração, modifica o estresse oxidativo e promove a diminuição da ativação da via p38 pró-apoptótica e aumenta a via Akt de sobrevivência, o que contribui para a melhora da função cardíaca. Por outro lado, em modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica, o baixo estresse oxidativo não está associado aos mecanismos de trofismo celular. Nessa condição, a ativação de vias de crescimento e sobrevivência celulares está provavelmente relacionada a fatores de

crescimento, como o EGF, e ainda apontam para a participação do SRA nesse mecanismo.

## **8. PERSPECTIVAS**

A discussão dos resultados gerais obtidos nessa tese nos indica as várias linhas de investigação que podem ser avaliadas. Verificamos a necessidade de avaliar melhor o papel do SNS sobre a geração do estresse oxidativo e sobre a ativação de vias de sinalização intracelulares. Assim, poderemos estabelecer quais os efeitos atribuíveis ao SNS e/ou ao SRA. Em relação ao SRA, devem-se avaliar os seus componentes em cada uma das situações demonstradas, principalmente no modelo de hipertrofia fisiológica, onde verificamos sua significativa participação. No que concerne às vias de sinalização intracelulares, verificamos a importância da avaliação de vias específicas apoptóticas e marcadores finais de sobrevivência e hipertrofia. Também observamos que, a realização de análises de imagens dos corações hipertróficos será importante para melhor caracterizarmos o efeito das intervenções utilizadas sobre o número, tamanho e estrutura do cardiomiócito, bem como das células não miócitos e tecido fibroso. Dessa forma, a profunda caracterização dos modelos associada à avaliação dos fatores neuroendócrinos e moleculares enriquecerão este trabalho e ajudarão na compreensão exata dos mecanismos sugeridos nesta tese.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, v.105, p.121-6. 1984.
- Aikawa, R., I. Komuro, *et al.* Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. J Clin Invest, v.100, n.7, Oct, p.1813-21. 1997.
- Akao, M., A. Ohler, *et al.* Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. Circ Res, v.88, n.12, Jun, p.1267-75. 2001.
- Akerboom, T. e H. Sies. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol, v.77, p.373-82. 1981.
- Alp, P., E. Newsholme, *et al.* Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochem J, v.154, n.3, Mar, p.689-700. 1976.
- Amin, J., L. Xiao, *et al.* Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol, v.33, n.1, 2001 Jan, p.131-9. 2001.
- Aoki, H., M. Richmond, *et al.* Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. Biochem J, v.347 Pt 1, Apr, p.275-84. 2000.
- Araujo, A., A. Enzweiler, *et al.* Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. Mol Cell Biochem, v.303, n.1-2, 2007 Sep, p.89-95. 2007.
- Ascensão, A., J. Magalhães, *et al.* Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. Int J Sports Med, v.26, n.4, May, p.258-67. 2005.
- Atalay, M. e C. Sen. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. Ann N Y Acad Sci, v.874, Jun, p.169-77. 1999.
- Babior, B. NADPH oxidase: an update. Blood, v.93, n.5, Mar, p.1464-76. 1999.
- Baines, C. e J. Molkentin. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. J Mol Cell Cardiol, v.38, n.1, Jan, p.47-62. 2005.

Barauna, V., M. Junior, *et al.* Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.32, n.4, 2005 Apr, p.249-54. 2005.

Bell, D., E. Kelso, *et al.* Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. Cardiovasc Pathol, v.13, n.2, 2004 Mar-Apr, p.71-8. 2004.

Bertagnolli, M., C. Campos, *et al.* Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. J Hypertens, v.24, n.12, 2006 Dec, p.2437-43. 2006.

Bing, O., C. Conrad, *et al.* Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. Heart Fail Rev, v.7, n.1, Jan, p.71-88. 2002.

Bueno, O., L. De Windt, *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. EMBO J, v.19, n.23, Dec, p.6341-50. 2000.

Clerk, A., T. Cullingford, *et al.* Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. J Cell Physiol, v.212, n.2, Aug, p.311-22. 2007.

Cohn, J., R. Ferrari, *et al.* Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol, v.35, n.3, Mar, p.569-82. 2000.

Debosch, B., N. Sambandam, *et al.* Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. J Biol Chem, v.281, n.43, Oct, p.32841-51. 2006.

Debosch, B., I. Treskov, *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. Circulation, v.113, n.17, May, p.2097-104. 2006.

Diep, Q., M. El Mabrouk, *et al.* Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.282, n.5, May, p.H1635-41. 2002.

Evangelista, F., P. Brum, *et al.* Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Braz J Med Biol Res, v.36, n.12, Dec, p.1751-9. 2003.

Evangelista, F. e J. Krieger. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. Physiol Genomics, v.27, n.3, Nov, p.231-6. 2006.

- Fabris, B., R. Candido, *et al.* Dose and time-dependent apoptotic effects by angiotensin II infusion on left ventricular cardiomyocytes. J Hypertens, v.25, n.7, Jul, p.1481-90. 2007.
- Filho, A., A. Ferreira, *et al.* Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. Exp Physiol, v.93, n.5, May, p.589-98. 2008.
- Flohé, L. e W. Günzler. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.105, p.114-21. 1984.
- Fortuño, M., S. Ravassa, *et al.* Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. Hypertension, v.32, n.2, Aug, p.280-6. 1998.
- Fortuño, M., S. Ravassa, *et al.* Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. Hypertension, v.38, n.6, Dec, p.1406-12. 2001.
- Frank, G., S. Eguchi, *et al.* Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. Endocrinology, v.141, n.9, Sep, p.3120-6. 2000.
- Gava, N., A. Vêras-Silva, *et al.* Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.26, n.6 Pt 2, Dec, p.1129-33. 1995.
- Geenen, D., P. Buttrick, *et al.* Cardiovascular and hormonal responses to swimming and running in the rat. J Appl Physiol, v.65, n.1, Jul, p.116-23. 1988.
- Gobatto, C., M. De Mello, *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.130, n.1, Aug, p.21-7. 2001.
- Gonzalez Flecha, B., S. Llesuy, *et al.* Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. Free Radic Biol Med, v.10, n.2, p.93-100. 1991.
- González, A., M. Fortuño, *et al.* Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. Cardiovasc Res, v.59, n.3, Sep, p.549-62. 2003.
- González, A., S. Ravassa, *et al.* Apoptosis in hypertensive heart disease: a clinical approach. Curr Opin Cardiol, v.21, n.4, Jul, p.288-94. 2006.
- Granger, D., N. Anstey, *et al.* Measuring nitric oxide production in human clinical studies. Methods Enzymol, n.301, p.49-61. 1999.

- Grassi, G., G. Seravalle, *et al.* Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. Hypertension, v.23, n.3, Mar, p.294-301. 1994.
- Heineke, J. e J. Molkentin. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol, v.7, n.8, Aug, p.589-600. 2006.
- Hingtgen, S., X. Tian, *et al.* Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. Physiol Genomics, v.26, n.3, Aug, p.180-91. 2006.
- Hong, H. e P. Johnson. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. Int J Biochem Cell Biol, v.27, n.9, Sep, p.923-31. 1995.
- Hunter, C., L. Koch, *et al.* Initial signaling response to acute exercise bout is similar in hearts of rats bred for divergent exercise capacities. Front Biosci, v.13, p.347-55. 2008.
- Iemitsu, M., T. Miyauchi, *et al.* Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. Hypertens Res, v.26, n.10, 2003 Oct, p.829-37. 2003.
- Iemitsu, M., T. Miyauchi, *et al.* Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.281, n.6, Dec, p.R2029-36. 2001.
- Inoki, K., Y. Li, *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nat Cell Biol, v.4, n.9, Sep, p.648-57. 2002.
- Iwata, M., R. Cowling, *et al.* Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.6, Dec, p.H2356-63. 2005.
- Izumi, Y., S. Kim, *et al.* Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. Hypertension, v.36, n.4, Oct, p.511-6. 2000.
- Ji, L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. Ann N Y Acad Sci, v.959, Apr, p.82-92. 2002.
- Ji, L., M. Gomez-Cabrera, *et al.* Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. Ann N Y Acad Sci, v.1067, May, p.425-35. 2006.

- Kacimi, R. e A. Gerdes. Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure. Hypertension, v.41, n.4, Apr, p.968-77. 2003.
- Kakarla, P., G. Vadluri, *et al.* Vulnerability of the mid aged rat myocardium to the age-induced oxidative stress: influence of exercise training on antioxidant defense system. Free Radic Res, v.39, n.11, Nov, p.1211-7. 2005.
- Kemi, O., M. Ceci, *et al.* Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. J Cell Physiol, v.214, n.2, Feb, p.316-21. 2008.
- Kim, J., A. Wende, *et al.* IGF-1 Receptor Signaling is Required for Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy. Mol Endocrinol, Sep. 2008.
- Kim, S., Y. Zhan, *et al.* In vivo activation of rat aortic platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors by angiotensin II and hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.20, n.12, Dec, p.2539-45. 2000.
- Klein, D., R. Kern, *et al.* A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. Biochem Mol Biol Int, v.36, n.1, May, p.59-66. 1995.
- Konradsen, L. e E. Nexø. Epidermal growth factor in plasma, serum and urine before and after prolonged exercise. Regul Pept, v.21, n.3-4, Jun, p.197-203. 1988.
- Kyaw, M., M. Yoshizumi, *et al.* Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. Acta Pharmacol Sin, v.25, n.8, Aug, p.977-85. 2004.
- Lee, Y., J. Cho, *et al.* Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. Eur J Appl Physiol, v.97, n.2, May, p.216-24. 2006.
- Li, J., N. Gall, *et al.* Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. Hypertension, v.40, n.4, Oct, p.477-84. 2002.
- Lowry, O., N. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, 1951 Nov, p.265-75. 1951.
- Lushnikova, E. e L. Nepomnyashchikh. Morphological and stereological characteristics of myocardial remodeling in aged spontaneously hypertensive SHR rats. Bull Exp Biol Med, v.135, n.2, Feb, p.181-6. 2003.
- Marklund, S., L. Oreland, *et al.* Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics. Drug Alcohol Depend, v.12, n.3, 1983 Nov, p.209-15. 1983.

- Maron, B., K. Carney, *et al.* Relationship of race to sudden cardiac death in competitive athletes with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol, v.41, n.6, Mar, p.974-80. 2003.
- Maron, B. e A. Pelliccia. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. Circulation, v.114, n.15, Oct, p.1633-44. 2006.
- Matsuzawa, A. e H. Ichijo. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. Antioxid Redox Signal, v.7, n.3-4, 2005 Mar-Apr, p.472-81. 2005.
- Medeiros, A., E. Oliveira, *et al.* Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Braz J Med Biol Res, v.37, n.12, 2004 Dec, p.1909-17. 2004.
- Melling, C., D. Thorp, *et al.* Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.6, Dec, p.H3692-8. 2007.
- Mohazzab-H, K., P. Kaminski, *et al.* Lactate and PO<sub>2</sub> modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. Circulation, v.96, n.2, Jul, p.614-20. 1997.
- Mosterd, A., B. Cost, *et al.* The prognosis of heart failure in the general population: The Rotterdam Study. Eur Heart J, v.22, n.15, Aug, p.1318-27. 2001.
- Naffah-Mazzacoratti MC, Casarini DE, *et al.* Serum catecholamine levels determined by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. Arq Brasil Endocrinol Metabol, n.36, p.119-122. 1992.
- Nakamura, K., K. Fushimi, *et al.* Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. Circulation, v.98, n.8, Aug, p.794-9. 1998.
- Negrao, C., E. Moreira, *et al.* Vagal function impairment after exercise training. J Appl Physiol, v.72, n.5, May, p.1749-53. 1992.
- Nicholson, D. e N. Thornberry. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci, v.22, n.8, Aug, p.299-306. 1997.
- Nishida, E. e Y. Gotoh. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. Trends Biochem Sci, v.18, n.4, Apr, p.128-31. 1993.

- Oh, H., Y. Fujio, *et al.* Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. J Biol Chem, v.273, n.16, Apr, p.9703-10. 1998.
- Okamoto, K. e K. Aoki. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J, v.27, Mar, p.282-93. 1963.
- Opie, L., P. Commerford, *et al.* Controversies in ventricular remodelling. Lancet, v.367, n.9507, Jan, p.356-67. 2006.
- Pelliccia, A., B. Maron, *et al.* The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. N Engl J Med, v.324, n.5, Jan, p.295-301. 1991.
- Pick, E. e Y. Keisari. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol Methods, v.38, n.1-2, p.161-70. 1980.
- Proud, C. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res, v.63, n.3, Aug, p.403-13. 2004.
- Raskoff, W., S. Goldman, *et al.* The "athletic heart". Prevalence and physiological significance of left ventricular enlargement in distance runners. JAMA, v.236, n.2, Jul, p.158-62. 1976.
- Ravassa, S., M. Fortuño, *et al.* Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.36, n.6, Dec, p.1065-71. 2000.
- Reznick, A. e L. Packer. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol, v.233, p.357-63. 1994.
- Richey, P. e S. Brown. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. J Sports Sci, v.16, n.2, 1998 Feb, p.129-41. 1998.
- Sanchez-Prieto, R., J. Rojas, *et al.* A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. Cancer Res, v.60, n.9, May, p.2464-72. 2000.
- Schröder, D., J. Heger, *et al.* Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. J Mol Med, v.84, n.11, Nov, p.975-83. 2006.
- See, F., W. Thomas, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. J Am Coll Cardiol, v.44, n.8, Oct, p.1679-89. 2004.

- Shah, B. e K. Catt. A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II -induced cardiac hypertrophy. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.5, May, p.239-44. 2003.
- Siwik, D., J. Tzortzis, *et al.* Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. Circ Res, v.85, n.2, Jul, p.147-53. 1999.
- Sugden, P. Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. Ann Med, v.33, n.9, Dec, p.611-22. 2001.
- Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev, v.79, n.1, Jan, p.215-62. 1999.
- Tibbles, L. e J. Woodgett. The stress-activated protein kinase pathways. Cell Mol Life Sci, v.55, n.10, Aug, p.1230-54. 1999.
- Touyz, R. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension, v.44, n.3, Sep, p.248-52. 2004.
- Watson, P., J. Reusch, *et al.* Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.1, Jul, p.H246-59. 2007.
- Wenzel, S., G. Taimor, *et al.* Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. FASEB J, v.15, n.12, Oct, p.2291-3. 2001.
- Xiao, L., D. Pimentel, *et al.* Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. Am J Physiol Cell Physiol, v.282, n.4, 2002 Apr, p.C926-34. 2002.
- Yoshizumi, M., J. Abe, *et al.* Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. J Biol Chem, v.275, n.16, Apr, p.11706-12. 2000.
- Yu, W., M. Akishita, *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. Clin Chim Acta, v.364, n.1-2, Feb, p.328-34. 2006.
- Zhuang, S., J. Demirs, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. J Biol Chem, v.275, n.34, Aug, p.25939-48. 2000.

