

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS COM O REMODELAMENTO CARDÍACO EM MODELO DE *COR
PULMONALE***

RAFAEL COLOMBO

Porto Alegre

2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS COM O REMODELAMENTO CARDÍACO EM MODELO DE *COR
PULMONALE***

Rafael Colombo

Orientadora: Professora Doutora Adriane Belló-Klein

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas –
Fisiologia-

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

É impossível não relacionar toda a felicidade que sentimos ao principal bem que podemos ter: a família. Agradeço a eles por serem pessoas incansáveis em dar amor sem a expectativa de receber algum tipo de retorno.

Aos verdadeiros amigos: Gustavo, Jonas, Maurício e Rafael que da mesma forma olham para nós com o olhar do respeito, confiança e companheirismo. Aqueles que estiveram sempre ao meu lado, vibrando e tendo orgulho da relação criada com o passar dos tempos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, um grupo de excelência profissional e ao mesmo tempo pessoas que fazem do ambiente de trabalho um local de convivência harmoniosa. Um agradecimento especial aos colegas e amigos Bruno, Cristiano, Francisca, Luciana e Paulo, pelo auxílio pessoal e profissional dedicado nesses anos.

Com grande destaque nessa caminhada, não poderia deixar de citar as pessoas que realmente tiveram um grande peso no reinício e na continuidade do meu caminho. Com toda certeza, são pessoas inesquecíveis, pois são eternos responsáveis por aqueles que se formam. Um agradecimento eterno à Professora Adriane Belló-Klein, à professora Maristela Padilha de Souza Rabbo, à Tânia Regina Gatelli Fernandes e ao “Mestre dos Magos” Alexander da Rosa Araújo.

Não poderia deixar de comentar e agradecer a grande parceria realizada com o Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer do Instituto de Ciências

Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Agradeço especialmente a oportunidade de aprendizado oferecida pelo Professor Samuel dos Santos Valença, ao companheirismo e suporte científico da amiga Karla Maria Pires e Renata Tiscoski Nesi nesse período.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a grande parceira que tem acompanhado e estado ao meu lado em todos os momentos por todos esses anos. A minha namorada Rafaela, por ser uma pessoa especial e que demonstra o mesmo amor, pela vida e pelo trabalho.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.

Dalai Lama

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

O *Cor pulmonale* induzido pela administração intraperitoneal de monocrotalina é um dos modelos mais utilizados para estudar os efeitos dessa síndrome sobre o sistema cardiovascular. Essa síndrome é caracterizada por um desequilíbrio no estado redox celular e uma consequente alteração no imunconteúdo de proteínas sinalizadoras para a hipertrofia e insuficiência cardíaca. Normalmente, o peróxido de hidrogênio caracteriza-se como a espécie reativa do oxigênio mais estável, e por isso, a molécula mais envolvida com a modulação dessa sinalização. O exercício físico aeróbio tem sido extensamente estudado devido ao fato de ser uma prática que altera o estado redox celular e, consequentemente, a sinalização nos cardiomiócitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o exercício físico poderia modular o estado redox no ventrículo direito em animais tratados com monocrotalina e, ao mesmo tempo, provocar alterações na sinalização celular, estrutura e função cardíaca. Ratos Wistar machos com aproximadamente 180 gramas de massa corporal foram treinados por quatro semanas após a injeção de monocrotalina ou solução salina. Os grupos experimentais (n=6-9 animais/grupo) foram: controle sedentário (CS) – ratos sedentários que receberam uma dose única de solução salina (i.p), monocrotalina sedentário (MS) – ratos sedentários que receberam uma dose única de monocrotalina (i.p), controle treinado (CT) - ratos treinados que receberam uma dose única de solução salina (i.p) e monocrotalina treinado (MT) - ratos treinados que receberam uma dose única de monocrotalina (i.p). As medidas hemodinâmicas foram realizadas após 24 horas da última sessão de exercício físico aeróbio. Os dados de pressão diastólica final do ventrículo direito

(PDFVD), pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), derivada pressão/tempo máxima (dP/dt_{max}) e derivada pressão/tempo mínima (dP/dt_{min}) foram analisados. Após a análise hemodinâmica, os ratos foram mortos por deslocamento cervical e seus órgãos (coração, pulmão e fígado) foram coletados para análises morfométricas, bioquímicas e moleculares. As concentrações de peróxido de hidrogênio e a relação GSH/GSSG foram medidas obtidas com o objetivo de verificar o estado redox nos diferentes grupos experimentais. A massa dos órgãos foi utilizada para analisar a hipertrofia cardíaca, congestão pulmonar e hepática. A massa ventricular direita foi utilizada em cortes histológicos e para a análise de proteínas relacionadas com o remodelamento cardíaco pela técnica de Western Blot. A administração de monocrotalina provocou hipertrofia do ventrículo direito, congestão pulmonar, aumento da PDFVD, da PSVD, da dP/dt_{max} e da dP/dt_{min} nos animais MS e MT. Além disso, nos animais MS e CT, notamos uma redução nas concentrações de peróxido de hidrogênio, sugerindo uma modificação do sistema de defesa antioxidante provocada pela monocrotalina e pelo exercício físico. Já quanto ao volume de vasos, no grupo MS tivemos uma diminuição dessa variável em relação ao seu controle (CS), sendo que, o exercício físico preveniu este efeito nos animais MT em relação ao grupo MS. O exercício físico aeróbio promoveu uma redução no volume intersticial e na espessura da túnica média da artéria pulmonar nos animais MT. A monocrotalina provocou uma redução na relação p-GSK-3 β /GSK-3 β no grupo MT, sendo que que o exercício físico foi capaz de provocar um aumento nessa relação. Dessa forma, acreditamos que o exercício físico aeróbio possa alterar a função de proteínas redox-sensíveis e, dessa forma, modular a hipertrofia cardíaca nos animais que receberam a monocrotalina.

Palavras-chave: exercício físico, monocrotalina, *Cor pulmonale*, sinalização redox, hipertrofia cardíaca.

ABSTRACT

The *Cor pulmonale* induced by monocrotaline intraperitoneal administration is one of the most widely used models to study the effects of this syndrome on the cardiovascular system. This syndrome is characterized by an imbalance in cellular redox state and a consequent change in immunocomponent of signaling proteins for hypertrophy and heart failure. Mostly, hydrogen peroxide is characterized as the most stable reactive oxygen species, and therefore the most involved molecule in the modulation of these signaling pathways. Aerobic exercise has been extensively studied due to the fact that it is a practice that alters the cellular redox state and thus signaling in cardiomyocytes. Thus, the aim of this study was to test the hypothesis that exercise could modulate the redox state of the right ventricle in animals treated with monocrotaline and, at the same time, cause changes in cell signaling, structure and cardiac function. Male Wistar rats approximately 180 grams of body mass were trained for four weeks after injection of monocrotaline or saline. The experimental groups (n = 6-9 animals / group) were: sedentary control (SC) - sedentary rats that received a single dose of saline (ip), sedentary monocrotaline (SM) - sedentary rats that received a single dose of monocrotaline (ip), trained control (TC) - trained rats that received a single dose of saline (ip) and trained monocrotaline (TM) - trained rats that received a single dose of monocrotaline (ip). Hemodynamic measurements were performed 24 hours after the last session of aerobic exercise. Data for end-diastolic pressure of the right ventricle (EDPRV), right ventricular systolic pressure (RVSP), maximum derived from pressure/time (dP/dt_{max}) and minimum derived pressure/time (dP/dt_{min}) were analyzed. After hemodynamic analysis, mice were killed by cervical

dislocation and their organs (heart, lung and liver) were collected. The hydrogen peroxide concentrations and GSH/GSSG are measurements with the aim of verifying the redox state in different experimental groups. The organ weights was used to analyze cardiac hypertrophy, pulmonary and hepatic congestion. A portion of the right ventricular mass was utilized for histological examination and other part for analyze proteins related to cardiac remodeling, by Western blot. Morphometric analysis were performed after the removal of organs. Administration of monocrotaline caused right ventricular hypertrophy, pulmonary congestion, increased EDPRV, RVSP, dP/dt_{\max} and dP/dt_{\min} in SM and TM animals. Furthermore, in animals and SM and TC, we visualized a reduction in the concentrations of hydrogen peroxide, suggesting a change in the antioxidant defense system caused by monocrotaline and by exercise. Already for the volume of vessels in the SM group, we note a decrease of this variable in relation to its control (SC). At the same time, TM animals had an increase in the volume of vessels in relation to the SM group, showing that exercise promotes an increase in this item. The aerobic exercise promoted a decrease in interstitial volume and thickness of the muscle layer of the pulmonary artery in animals TM. The monocrotaline caused a decrease in the p-GSK-3 β /GSK-3 β in the TM group, showed that exercise was able to cause an increase in this ratio. Thus, we believe that aerobic exercise can alter the function of signaling proteins and thereby modulate cardiac hypertrophy in animals that received monocrotaline.

Keywords: exercise, monocrotaline, *Cor pulmonale*, redox signaling, heart hypertrophy.

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

Akt/PKB – proteína cinase B

Ang II – angiotensina II

ANP – peptídeo atrial natriurético

Bcl-2 - linfoma de células B 2

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

eNOS – óxido nítrico endotelial

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ERK1/2 – cinase regulada por sinal extracelular

ERO – espécies reativas de oxigênio

ET-1 – endotelina 1

GR - glutatona redutase

GSH – glutatona reduzida

GSK-3 β – cinase da glicogênio sintase

GSSG – glutatona oxidada

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HAP – hipertensão arterial pulmonar

HC – hipertrofia cardíaca

HF – hipertrofia fisiológica

HP – hipertrofia patológica

IAM – infarto agudo do miocárdio

IC – insuficiência cardíaca

ICC – insuficiência cardíaca congestiva

IGF-1 – fator de crescimento semelhante a insulina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MAPKs – proteínas cinases ativadas por mitógenos

MCL-1 - proteína de diferenciação celular induzida pela leucemia mielóide

MCT – monocrotalina

MHC- α – α -miosina

MHC- β – β -miosina

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

O₂⁻ - ânion superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – pressão arterial

PAN – peptídeo atrial natriurético

PCN – peptídeo cerebral natriurético

PI3K – cinase do fosfoinositol 3

PKC – proteína cinase C

Trx – tiorredoxina

VD – ventrículo direito

VD – ventrículo direito

VDF – volume diastólico final

VE – ventrículo esquerdo

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da Hipertensão Pulmonar Baseada no Simpósio Mundial de 2003 (Pulmonary Arterial Hypertension).

Tabela 2. Protocolo de treinamento físico. Frequência: 5 x por semana

Tabela 3. Parâmetros morfométricos (índices de hipertrofia do coração) dos diferentes grupos experimentais

Tabela 4. Parâmetros morfométricos (pulmões e fígado) dos diferentes grupos experimentais

Tabela 5. Parâmetros hemodinâmicos dos diferentes grupos experimentais

Tabela 6. Medidas Bioquímicas – Estresse Oxidativo Cardíaco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos mostrando a hipertrofia da túnica média de animais após 28 dias da injeção de MCT (L) em comparação a animais controle após 28 dias que receberam veículo (K). Coloração realizada com hematoxilina e eosina (Characterization of a murine model monocrotaline pyrrole induced)

Figura 2. Análise histológica de um corte transversal no músculo cardíaco utilizando tricrômico de Masson mostrando um aumento na fibrose somente no grupo HP (B) (Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy).

Figura 3. Corte histológico transversal de coração. Coloração realizada com tricrômico de Masson para analisar presença de colágeno em três grupos distintos: controle, expressão aumentada de proteínas upstreams (MKK3bE e MKK6bE) para a p38-MAPK (The in vivo role of p38 MAP kinases).

Figura 4. Massa Corporal Total

Figura 5. Massa Corporal Final

Figura 6. Volume de vasos no ventrículo direito

Figura 7. Volume do interstício no ventrículo direito

Figura 8. Volume dos cardiomiócitos no ventrículo direito

Figura 9. Área transversal média dos cardiomiócitos no ventrículo direito

Figura 10. Monocrotalina e exercício físico aeróbio provocam alterações estruturais nos cardiomiócitos de ratos Wistar

Figura 11. Espessura da Túnica Média da Artéria Pulmonar

Figura 12. Análise da proteína Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 13. Análise da proteína p-Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 14. Análise da relação p-Akt/Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 15. Análise da proteína GSK-3 β total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 16. Análise da proteína p-GSK-3 β no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 17. Análise da relação p-GSK-3 β /GSK-3 β no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 18. Análise da proteína tioredoxina (Trx) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

Figura 19. Análise da proteína tiorredoxina (Trx) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E <i>COR PULMONALE</i> | 20 |
| 1.2 HIPERTROFIA CARDÍACA | 29 |
| 1.3 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PARA HIPERTROFIA PATOLÓGICA E FISIOLÓGICA | 35 |
| 1.4 O PAPEL MODULADOR DO ESTADO REDOX CELULAR NA HIPERTROFIA CARDÍACA | 43 |
| 2. HIPÓTESE | 55 |
| 3. OBJETIVOS | 57 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 57 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 57 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 59 |
| 4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL | 59 |
| 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS NA VIVISSECÇÃO DOS ANIMAIS | 60 |
| 4.3 MANUSEIO DE REAGENTES E ANIMAIS | 60 |
| 4.4 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR | 62 |
| 4.7 DESENHO EXPERIMENTAL | 63 |
| 4.8 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO | 64 |
| 4.9 REGISTROS HEMODINÂMICOS | 65 |
| 4.10) ANÁLISE DA DERIVADA DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO | 66 |
| 4.11 MEDIDAS MORFOMÉTRICAS E PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS | 66 |
| 4.12 ANÁLISE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO | 67 |
| 4.13 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A GLUTATIONA REDUZIDA E GLUTATIONA OXIDADA (GSH/GSSG) | 68 |
| 4.14 ANÁLISE POR “WESTERN BLOT” | 68 |
| 4.15 HISTOLOGIA E ESTEREOLOGIA | 70 |
| 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 71 |
| 5. RESULTADOS | 72 |
| 5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL DURANTE O PROTOCOLO EXPERIMENTAL | 73 |
| 5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E HEMODINÂMICA | 75 |
| 5.2.1 Avaliação Morfométrica – Hipertrofia Cardíaca | 75 |
| 5.2.2 Avaliação Morfométrica do Pulmão – Congestão Pulmonar | 77 |
| 5.2.3 Avaliação Morfométrica do Fígado – Congestão Hepática | 78 |
| 5.2.4 Avaliação da Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito (PDFVD) | 79 |
| 5.2.5 Avaliação da Pressão Sistólica do Ventrículo Direito (PSVD) | 80 |
| 5.2.6 Avaliação das Derivadas Máxima e Mínima do Ventrículo Direito (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) | 80 |
| 5.3 MEDIDAS BIOQUÍMICAS – ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO | 81 |
| 5.3.1 Avaliação das Concentrações de Peróxido de Hidrogênio no Tecido Cardíaco (VD e VE) | 81 |
| 5.3.2 Avaliação do Estado Redox Celular através da Relação entre a Glutaciona Reduzida e Glutaciona Oxidada (GSH/GSSG – VD e VE) | 82 |
| 5.4 HISTOLOGIA E ESTEREOLOGIA | 83 |

| | |
|--|------------|
| 5.4.1 <i>Histologia e Estereologia dos Cardiomiócitos</i> | 83 |
| 5.5 IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS ANALISADAS POR WESTERN BLOT | 89 |
| 6. DISCUSSÃO | 95 |
| 7. CONCLUSÃO | 105 |
| 8. PERSPECTIVAS | 106 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 106 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar e *Cor pulmonale*

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome caracterizada pela diminuição da capacidade de bombeamento de sangue pelo coração. A causa geralmente está associada à redução da capacidade contrátil do músculo cardíaco, lesões valvares, aumento na pressão externa em torno do coração, aumento de pré e/ou pós-carga imposta ao ventrículo, hipertensão pulmonar ou por qualquer anormalidade que torne o coração uma bomba disfuncional (Mann and Bristow 2005).

Essa síndrome é caracterizada pela sua complexidade, etiologia diversificada, elevada prevalência e alto impacto econômico. Por essas razões, a IC tem recebido grande atenção, e a descoberta de novos tratamentos tornou-se o foco da maioria desses estudos.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença rara ou um grupo de doenças com etiologia obscura, geralmente progressiva e fatal e que pode levar à insuficiência cardíaca direita. A doença está associada ao aumento na pressão média na artéria pulmonar (>25 mmHg), em repouso, ou ao aumento na pressão média na artéria pulmonar durante o exercício (>30 mmHg) (Lehrman, Romano et al. 2002). A injúria vascular pulmonar pode ocorrer de uma forma idiopática, em associação a outras doenças e estar associada à susceptibilidade genética.

A doença é caracterizada por ser comum em adultos jovens, com sua maior incidência entre mulheres na terceira década e em homens na quarta década de

vida, mesmo assim a HAP também tem sido relatada em crianças e idosos acima dos 60 anos. Estima-se que após o diagnóstico da HAP, o tempo de sobrevida médio gira em torno de 2,8 anos, com uma mortalidade de 40% do total de diagnósticos até esse período (Lehrman, Romano et al. 2002; Bogaard, Abe et al. 2009). A maioria dos pacientes com a síndrome completa um ano após o diagnóstico (68%), 48% sobrevivem por três anos e 34% chegam a uma sobrevida de cinco anos. Em um levantamento sobre as dez maiores causas de morte no mundo, publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2008, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) aparece em quarto lugar, sendo responsável por 5,1% do total de mortes, somando mais de três milhões de mortes no ano de 2004.

Devido aos diferentes fatores que podem levar ao surgimento da HAP, a doença têm sido classificada com base nas similaridades patofisiológicas e com relação às respostas individuais ao tratamento. Assim, em 2003, cinco categorias principais de HAP foram reconhecidas (Chin and Rubin 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da Hipertensão Pulmonar Baseada no Simpósio Mundial de 2003 (Pulmonary Arterial Hypertension).

Classificação da Hipertensão Pulmonar Baseada no Simpósio Mundial de 2003

Grupo 1: Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)

Idiopática

Familiar

Associada com:

Doença de Colágeno Vascular

Hipertensão Portal

HIV

Drogas e Toxinas

Outros: Desordens da tireóide, deficiência no armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, telangiectasia hemorrágica hereditária, hemoglobinopatias, doenças mieloproliferativas, esplenectomia.

Associada com envolvimento venoso ou capilar significativa

Doença pulmonar veno-oclusiva

Hemangiomas capilar pulmonar

Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

Grupo 2: Hipertensão pulmonar com doença cardiovascular esquerda

Doença ventricular ou atrial esquerda

Doença Valvar esquerda

Grupo 3: Hipertensão pulmonar associada com doença pulmonar e/ou hipoxemia

Doença pulmonar crônica obstrutiva

Doença pulmonar intersticial

Distúrbios respiratórios do sono

Distúrbios da hipoventilação alveolar

Exposição crônica à altitude

Anomalias do desenvolvimento

Grupo 4: Hipertensão pulmonar devido à trombose crônica ou embolismo

Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares proximais

Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares distais

Grupo 5: Diversas

Sarcoidose, histiocitose X, limfangiomatose, compressão dos vasos pulmonares (adenopatia, tumor, fibrose do mediastino)

O grupo 1 é composto por doenças em que a anormalidade primária é localizada nas arteríolas pulmonares. Isso inclui a forma idiopática da HAP, e formas associadas a outras condições restritivas como doenças do tecido conjuntivo e deformações congênitas. As alterações patológicas das pequenas artérias pulmonares se estendem por todas as camadas do vaso (túnica íntima, média e adventícia). Essas mudanças vão desde a injúria endotelial e o consequente desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina) e vasoconstritoras (endotelina-1, tromboxana A₂ e serotonina), liberadas pelo endotélio vascular, até o aumento da espessura das camadas dos vasos, principalmente a camada muscular lisa (túnica média). Ambas alterações levam a um aumento na resistência vascular pulmonar e definem a HAP como uma doença vasoproliferativa invocada por estímulos mitogênicos (Lehrman, Romano et al. 2002; Bogaard, Abe et al. 2009; Yildiz 2009).

Essas alterações vasculares características da doença podem levar a uma sobrecarga de pressão imposta ao ventrículo direito (VD) e ao aparecimento de uma síndrome conhecida como *Cor pulmonale*. Essa síndrome é caracterizada pela dilatação e, em seguida, pela disfunção do ventrículo direito devido a uma doença pulmonar (Lehrman, Romano et al. 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o *Cor pulmonale* como uma alteração na estrutura ou função do ventrículo direito resultante de doenças que afetam a estrutura e a função do pulmão (WHO, 1963; Lehrman, Romano et al. 2002).

Quando a HAP está associada ao surgimento do *Cor pulmonale*, o prognóstico piora acentuadamente. A insuficiência cardíaca de origem pulmonar, gerada pelo aumento de pós-carga imposta ao VD, acomete cerca de 20% do

total de casos de IC e de 7 a 10% de todos os casos de qualquer doença cardiovascular (Lehrman, Romano et al. 2002). O *Cor pulmonale* é responsável por 80 mil mortes por ano nos Estados Unidos, o que a torna uma doença com alta prevalência, pois é um dos desfechos comuns para os pacientes que apresentam DPOCs.

A experiência com o uso de vasodilatadores tornou-se um dos grandes investimentos atuais no tratamento para a HAP e para o *Cor pulmonale*. O uso de óxido nítrico (NO) e outros vasodilatadores, como os antagonistas das endotelinas, as prostaciclina e inibidores da fosfodiesterase do tipo 5 (Sildenafil), em pacientes que são responsivos ao tratamento, pode retardar o desenvolvimento ou diminuir a gravidade da doença (Chaouat, Naeije et al. 2008). Em alguns casos, a terapia com vasodilatadores pode ser perigosa por levar ao quadro de hipotensão sistêmica. Esse fato pode desencadear uma isquemia ventricular direita, resultando em insuficiência cardíaca direita aguda e acréscimo na pressão atrial direita, ambos os fatos acentuando a piora funcional do ventrículo direito nesta doença. Tradicionalmente, pacientes com HAP são aconselhados a restringir sua participação em programas de exercícios físicos devido ao risco de comprometimento cardiovascular fatal (Galie, Torbicki et al. 2004).

Existem muitas controvérsias sobre a eficácia e a real contribuição do treinamento físico como terapia para a HAP. É comum acreditar que em muitos casos, principalmente naqueles mais graves, o exercício físico pode exercer um impacto negativo, aumentando o risco de morte súbita, o estresse de cisalhamento e o remodelamento pulmonar ocasionado por esse aumento e

podendo causar o agravamento da insuficiência cardíaca (Badesch, Abman et al. 2007). Entretanto, diversos estudos recentes mostram que, com a introdução de novas perspectivas medicamentosas, o prognóstico da doença tem melhorado. Além disso, essas pesquisas demonstram efeitos benéficos provocados pelo treinamento físico em pacientes com DPOC e insuficiência cardíaca congestiva (ICC), tendo um papel importante até mesmo para aqueles pacientes mais gravemente afetados (Handoko, de Man et al. 2009). O exercício físico mostrou ser capaz de melhorar a função endotelial, reduzir o estresse oxidativo vascular, em parte pelo aumento da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), respostas que podem levar a um efeito vascular benéfico (Kojda, Cheng et al. 2001; Mereles, Ehlken et al. 2006). Outro estudo de 2006 mostrou que pacientes com HAP e insuficiência cardíaca direita que participaram de um programa de exercícios físicos que era constituído por atividades em bicicleta ergométrica (30 segundos com carga baixa e 90 segundos a uma intensidade de 60 a 80% da encontrada durante o teste inicial de consumo máximo de oxigênio), sessenta minutos de caminhadas leves em cinco dias da semana além de trinta minutos de treinamento respiratório por dia, melhoraram significativamente a capacidade funcional, mensurada através do teste de caminhada de seis minutos e o consumo máximo de oxigênio. O treinamento físico foi capaz de melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Em relação às medidas cardiorrespiratórias, os pacientes que participaram do protocolo tiveram uma melhora no consumo máximo de oxigênio, uma eficácia das trocas gasosas e do metabolismo muscular, uma melhor eficiência ventilatória, atenuação da atrofia muscular e da

disfunção endotelial e diminuição de mediadores inflamatórios, características presentes na fisiopatologia da doença (Mereles, Ehlken et al. 2006).

Por esses motivos, os mecanismos envolvidos na progressão da HAP e da síndrome *Cor pulmonale* e as intervenções não farmacológicas, como o exercício físico, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida, aumentar a capacidade funcional e a sobrevida dos pacientes nessas doenças têm recebido grande atenção do mundo científico e ganham espaço como uma alternativa extremamente viável nessas doenças.

Para estudar o efeito de diferentes terapias que poderiam melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com HAP e que, conseqüentemente, poderiam desenvolver a *Cor pulmonale*, diversos modelos animais têm sido criados e se tornaram importantes ferramentas para o estudo dos mecanismos patogênicos dessas duas doenças.

Dois modelos estabelecidos para o estudo dessas doenças incluem a exposição crônica à hipóxia e a administração de uma única dose intraperitoneal ou subcutânea de monocrotalina (MCT), um alcalóide pirrolizidina encontrado na planta *Crotalaria spectabilis*, que desencadeia a forma mais agressiva de HAP em qualquer modelo animal, reproduzindo os mesmos sintomas de pacientes com HAP e insuficiência cardíaca direita (Farahmand, Hill et al. 2004; Dumitrascu, Koebrich et al. 2008).

O alcalóide pirrolizidina é uma substância química produzida e derivada de determinadas plantas tóxicas que, segundo descrição de Mclean de 1970, quando ingeridas pelos homens ou por animais têm sido responsáveis por uma grande variedade de lesões hepáticas, incluindo a oclusão de pequenas veias

hepáticas e necrose centrolobular (McLean 1970; Chesney, Allen et al. 1974). Os efeitos da MCT sobre a vasculatura pulmonar foram primeiramente descritos por Lalich e Merkow, em 1961. Eles relataram a presença de vasculite em vasos pequenos e médios, hemorragia pulmonar, aumento na permeabilidade capilar e subsequentemente, o desenvolvimento de *Cor pulmonale* nos animais, fato que foi atribuído às lesões vasculares pulmonares e ao aumento de pós-carga imposta ao VD (Lalich and Merkow 1961).

A MCT é bioativada pelos microssomos hepáticos pelo citocromo P-450 a metabólitos pirrólicos (dehidromonocrotalina), composto causador da injúria nos vasos pulmonares. Esses compostos pirrólicos são mais estáveis que seus precursores e demonstram uma alta seletividade pelo endotélio vascular do pulmão, onde irão promover rapidamente um acúmulo de macrófagos, mediadores inflamatórios que podem ser responsáveis pela resposta hipertrófica da túnica média dos vasos pulmonares (Figura 1) (Wilson, Segall et al. 1992; Hessel, Steendijk et al. 2006).

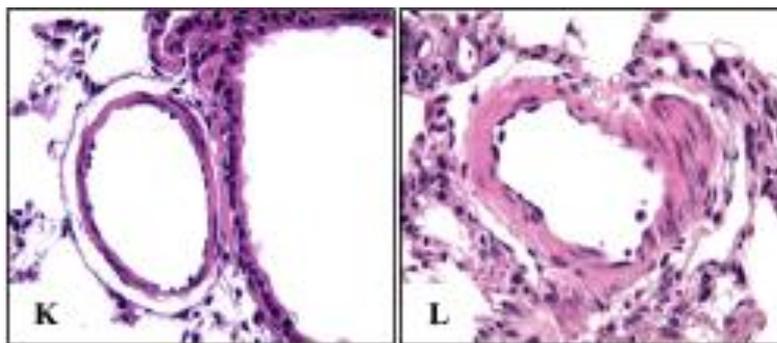


Figura 1. Fotos mostrando a hipertrofia da túnica média de animais após 28 dias da injeção de MCT (L) em comparação a animais controle após 28 dias que receberam veículo (K). Coloração realizada com hematoxilina e eosina, barra de escala = 50µm (Dumitrascu, Koebrich et al. 2008)

A indução de HAP pela MCT é associada ao desenvolvimento de hipertrofia de ventrículo direito que, dentro de algumas semanas, dependendo da dose e da idade dos animais, pode progredir para a IC (Hessel, Steendijk et al. 2006). Um estudo de Buermans et al mostrou que, dependendo da dose de MCT, baixa (30mg/kg) ou alta (80mg/kg), o animal pode desenvolver HC compensada ou IC em 4 semanas, respectivamente, após a injeção única da droga. Assim, tem se utilizado uma dose de 60mg/kg de massa corporal de MCT para a indução de HAP e conseqüentemente promover o aparecimento de sintomas característicos da insuficiência cardíaca direita (Buermans, Redout et al. 2005; Jasmin, Cernacek et al. 2003; Farahmand, Hill et al. 2004; Souza-Rabbo, Silva et al. 2008)

1.2 Hipertrofia Cardíaca

O remodelamento cardíaco está diretamente ligado à perda de *performance* do coração e a uma diminuição na perspectiva de sobrevida para pacientes com insuficiência cardíaca (Mann and Bristow 2005). Entretanto, muitos pesquisadores definem a HC como uma resposta final do órgão a uma exposição crônica a estímulos que poderiam levar a essa adaptação; outros têm sugerido que o remodelamento pode contribuir independentemente para a progressão para IC.

No contexto dessa discussão, o termo hipertrofia cardíaca refere-se às alterações geométricas e funcionais que são provenientes de modificações intersticiais, celulares, moleculares e metabólicas, que conseqüentemente podem causar uma alteração na função cardíaca após um evento agudo ou sobrecarga crônica imposta aos ventrículos.

O coração é composto por diferentes tipos celulares. Dentre esses, estão as células funcionais do coração, ou seja, os cardiomiócitos, que perfazem um total de 70-80% da massa total do coração; fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares e matriz extracelular. Quando os cardiomiócitos são expostos a uma condição de sobrecarga funcional, conseqüentemente há um estiramento da membrana plasmática e a sensibilização de proteínas integrais, especialmente proteínas conhecidas como conexinas, e de canais iônicos, provocando a ativação de vias de sinalização intracelulares, mudanças na expressão de genes, modificações na taxa de síntese proteica e na organização das proteínas contráteis dos sarcômeros (Iemitsu, Miyauchi et al. 2001)

O coração responde normalmente a uma elevação transitória na carga de trabalho imposta. Um importante indicador de demanda cardíaca é a força de estiramento, que pode ser modificada tanto por um aumento na pressão arterial (PA) ou no volume diastólico final (VDF). Quando a sobrecarga é de característica aguda, o coração responde rapidamente e consegue reverter um estímulo que pode ser de origem nervosa (sistema neurovegetativo), ou de origem circulatória (humoral e hormonal). Além disso, o músculo cardíaco tem uma propriedade intrínseca de resposta a esses aumentos transitórios de carga funcional, através do mecanismo de Frank-Starling. Em oposição, o coração responde modificando lentamente a sua estrutura a uma elevação crônica na demanda, processo que geralmente é irreversível.

Dependendo das características dessas alterações, a HC pode ser denominada de hipertrofia fisiológica (HF) ou hipertrofia patológica (HP). O crescimento fisiológico inclui o crescimento cardíaco pós-natal, o crescimento cardíaco induzido pela gravidez e pelo exercício físico. Em oposição a esse modelo, a hipertrofia patológica ocorre em resposta a um aumento crônico na sobrecarga de pressão ou de volume ocasionados por uma doença (hipertensão arterial, doença valvar, infarto agudo do miocárdio (IAM) e hipertensão pulmonar) (Iemitsu, Miyauchi et al. 2001).

Os dois tipos de hipertrofia (HF e HP) estão relacionados ao aumento no tamanho cardíaco, ou seja, no acréscimo de massa cardíaca. Entretanto, a HP está tipicamente associada com perda de cardiomiócitos e sua substituição por fibroblastos, perda da capacidade contrátil e um aumento no risco de morte súbita (Cohn 1997). Em oposição a essas alterações, a HF não provoca uma

alteração na estrutura cardíaca, mantendo uma função cardíaca normal. Além disso, a HF é caracterizada por ser uma hipertrofia reversível (Fagard 1997).

O caminho para a HF ou para a HP depende exclusivamente dos mecanismos de sinalização celular ou do estiramento do músculo cardíaco, que parecem ter uma determinada especificidade para o tipo de estímulo que é recebido pelo coração (Wakatsuki, Schlessinger et al. 2004).

A HF e a HP, ainda podem ser subdivididas em dois tipos: excêntrica e concêntrica. Essa classificação é baseada na forma geométrica que os ventrículos assumem após o remodelamento, fato extremamente ligado ao tipo de estímulo inicial dado ao cardiomiócito. A hipertrofia concêntrica refere-se ao aumento na espessura da parede ventricular e da massa cardíaca, com pequena ou nenhuma redução no volume da câmara. Além disso, a hipertrofia concêntrica é caracterizada por uma adição de sarcômeros em paralelo, fato que causa o aumento na largura dos cardiomiócitos. A hipertrofia excêntrica tem como padrão um aumento na massa ventricular e no tamanho da cavidade. A espessura da parede pode estar diminuída, normal ou aumentada. Na hipertrofia excêntrica a deposição dos sarcômeros é realizada em série, o que leva ao aumento no comprimento dos sarcômeros (McMullen and Jennings 2007).

Um estímulo fisiológico pode levar ao surgimento de ambos os subtipos de hipertrofia: concêntrica ou excêntrica. O exercício aeróbio, também conhecido como exercício de *endurance*, isotônico ou exercício dinâmico, causa um aumento no retorno venoso, que conseqüentemente leva a uma sobrecarga de volume e, se o estímulo for suficientemente satisfatório para gerar alguma adaptação cardíaca, o subtipo de hipertrofia que será detectada é a excêntrica.

Essa hipertrofia excêntrica geralmente está associada a um aumento na cavidade com um aumento proporcional na espessura da parede. Já o treinamento de força resulta em uma sobrecarga de pressão imposta ao ventrículo e conseqüentemente um aumento na espessura da parede ventricular, uma manutenção ou proporcional diminuição no diâmetro cavitário (Barry, Davidson et al. 2008).

A longo prazo, o exercício físico de *endurance* está associado a alterações na função e na morfologia cardíacas que são conhecidas como HF ou coração de atleta. Esse termo é utilizado pois a prática contínua de exercícios físicos de *endurance* promove uma série de alterações benéficas ao coração, como: bradicardia em repouso, diminuição da frequência cardíaca máxima, maior tempo de enchimento diastólico, retorno venoso aumentado, aumento nas dimensões (diâmetro) da cavidade de ambos os ventrículos e aumento ou manutenção da parede ventricular e massa cardíaca (Cappelli, Toncelli et al.). Juntas, essas adaptações podem auxiliar o coração a manter as necessidades metabólicas durante a prática de exercícios físicos, mantendo ou aumentando a capacidade contrátil do músculo cardíaco. A melhora funcional que é ocasionada pelo exercício pode estar intimamente ligada ao aumento na sobrecarga mecânica causada pelo maior retorno venoso e também pela liberação de agonistas liberados especificamente durante o exercício (Iemitsu, Miyauchi et al. 2001).

O estímulo patológico causado pela sobrecarga de pressão (estenose aórtica, hipertensão arterial e HAP), produz um aumento no estresse de parede sistólico e esse fator, conseqüentemente, resulta numa hipertrofia concêntrica. As características dessa hipertrofia são: diminuição do diâmetro cavitário e aumento

da espessura da parede ventricular pela deposição de sarcômeros em paralelo. Em contrapartida, um estímulo causado por sobrecarga de volume, pode levar ao aparecimento de uma hipertrofia patológica excêntrica, subtipo com um maior risco à vida do que a hipertrofia concêntrica, com aumento da cavidade ventricular e na maioria das vezes uma diminuição na espessura da parede ventricular (Barry, Davidson et al. 2008).

O *Cor pulmonale* induzido por injeção intraperitoneal de MCT se estabelece como um modelo de aumento de pós-carga ao VD. O VD tem uma estrutura diferente do VE; sua parede é mais fina, pois precisa exercer sua função de bomba contra uma pressão menor (pressão na artéria pulmonar) e responde melhor a alterações na pré-carga quando comparado ao VE. No entanto, o aumento de pós-carga ao VD produz alterações pronunciadas em relação ao VE, demonstrando um aumento na síntese proteica, tamanho celular e deposição de sarcômeros em paralelo, com o objetivo de manter a função cardíaca (Bogaard, Abe et al. 2009).

Como citado anteriormente, a HC gera uma série de alterações metabólicas, estruturais, funcionais, bioquímicas e moleculares. A HP está associada com a morte celular (apoptose ou necrose), com a diminuição do número de células funcionais cardíacas (cardiomiócitos) e com a deposição excessiva de colágeno na matriz extracelular (Figura 2B). O colágeno está disposto como uma rede intrincada de fibras que conecta os cardiomiócitos. Essa deposição excessiva de colágeno entre os cardiomiócitos é a modificação responsável pelo enrijecimento cardíaco, causador da diminuição no lusitropismo e inotropismo cardíacos. Isto também pode ocasionar redução do acoplamento elétrico cardíaco, realizado

pelas conexinas, pois o excesso de colágeno aumenta a distância entre os cardiomiócitos pelo aumento na área total de matriz extracelular. Além disso, a HP também está relacionada a uma diminuição na densidade capilar, fato que, juntamente com o aumento na área da matriz extracelular, aumenta desproporcionalmente a distância de difusão do oxigênio, contribuindo para a transição da HC para a IC (McMullen and Jennings 2007). Já a HF ocasionada pelo exercício físico é caracterizada pela manutenção ou redução da porcentagem total de área ocupada por colágeno, aumento no número de cardiomiócitos e um acréscimo considerável no número de vasos por área (Figura 2C) (Bogaard, Abe et al. 2009).

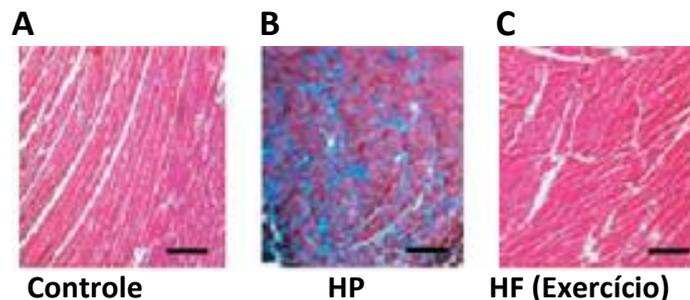


Figura 2. Análise histológica de um corte transversal no músculo cardíaco utilizando tricrômico de Masson, uma técnica que cora o colágeno em azul, mostrando um aumento na fibrose somente no grupo HP (B) (McMullen and Jennings 2007).

1.3 Sinalização Intracelular para Hipertrofia Patológica e Fisiológica

Desde o final dos anos 70 e início dos anos 80, com o avanço das técnicas e aparelhagem para detecção de expressão e imunocontéudo proteico, tem sido demonstrado que a HP e a HF estão associadas com uma especificidade molecular e bioquímica.

Muitas pesquisas têm destacado as alterações na expressão gênica e síntese proteica nesses dois modelos de HC. A HP está relacionada a alterações distintas na maquinaria contrátil, tais como: diminuição na expressão e imunocontéudo de miosina de cadeia pesada α (MHC- α) e expressão de proteínas fundamentais para manutenção da função cardíaca como a SERCA2a e aumento na expressão e imunocontéudo de miosina de cadeia pesada β (MHC- β) e de genes fetais (peptídeo atrial natriurético (PAN), peptídeo cerebral natriurético (PCN), α -actinina esquelética) (McMullen and Jennings 2007). A partir desses dados, diversos modelos experimentais com animais knockout têm sido desenvolvidos com o objetivo de estudar exclusivamente o papel de determinadas vias de sinalização celular que podem levar à HP e à HF.

A cascata de sinalização envolvida diretamente com a HF é a via do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)-cinase do fosfoinositol 3 (PI3K)-proteína cinase B(Akt/PKB). Essa via tem recebido muita atenção e tem sido caracterizada como principal no desenvolvimento da HF, demonstrando que sua ativação e, conseqüentemente, a da Akt/PKB leva à fosforilação de uma variedade enorme de outros substratos que promovem a regulação do metabolismo, angiogênese, crescimento e sobrevivência celular (DeBosch,

Treskov et al. 2006; Benito and Nattel 2009). Para corroborar esses dados, muitos experimentos utilizando ratos *knockout* ou com uma expressão aumentada para essas proteínas foram realizados, e com isso a função específica destas foi melhor caracterizada. O IGF-1, em muitos estudos, tem sido caracterizado como uma molécula com funções específicas para a sobrevivência celular. O IGF-1 exerce seu papel de molécula sinalizadora sobre a PI3K, que a partir da ação do IGF-1, libera produtos lipídicos da membrana plasmática, fosforilando-os na posição D3, que por sua vez, agem como novas proteínas sinalizadoras. Esses subprodutos liberados pela fosforilação dos fosfolípidios da membrana agem sobre a Akt/PKB, proteína sinalizadora crítica e uma das mais versáteis, pois se acredita que ela possa atuar em mais de 100 substratos intracelulares (Bernardo, Weeks et al.; DeBosch, Treskov et al. 2006; Manning and Cantley 2007).

Alguns estudos relacionam a ativação da Akt/PKB com a modulação de vias de sinalização para a HP. Isso pode ser devido às diferentes isoformas que essa proteína apresenta e claramente ao estímulo inicial para que o processo de sinalização inicie, já que pode ser ativada tanto por agonistas que agem sobre receptores de membrana relacionados à HP, quanto por agonistas que atuam sobre receptores relacionados com a HF (McMullen and Jennings 2007).

Em um estudo de De Bosch et al, em 2006, foram utilizados ratos *knockout* para Akt e observou-se que esses animais tiveram uma hipertrofia atenuada quando participaram de um programa de exercícios aeróbios. Essa diminuição não foi observada nos animais submetidos à sobrecarga de pressão por

coarctação aórtica, caracterizando a Akt como uma proteína relacionada à sinalização intracelular direcionadora para a HF (DeBosch, Treskov et al. 2006).

McMullen et al, em 2007, demonstraram que os animais com uma expressão diminuída para a PI3K desenvolviam sinais de ICC após um procedimento de constrição da aorta ascendente, que causaria uma sobrecarga de pressão ao coração. Esse estudo demonstrou que animais com uma expressão aumentada da PI3K tiveram um impacto benéfico sobre a HP, prevenindo a dilatação ventricular, o acréscimo de volume ventricular, o crescimento cardíaco excessivo, o aparecimento de fibrose e a queda na expressão gênica da SERCA2a (McMullen, Amirahmadi et al. 2007).

O conceito de que a via de sinalização dependente da PI3K-Akt/PKB está intimamente relacionada ao aparecimento da HF e também a uma diminuição das características relacionadas à HP é confirmado pelos resultados citados acima. Esse mecanismo de regulação negativa para a HP, causado pela ativação da via PI3K-Akt/PKB, ainda permanece obscuro; entretanto, diversos pesquisadores têm demonstrado efeitos inibitórios dessa via sobre a sinalização das MAPKs (p38, JNK), vias extremamente relacionadas ao surgimento da HP e com a ativação da via de sinalização para a sobrevivência dependente do NFκB (Kim, Khursigara et al. 2001; DeBosch, Treskov et al. 2006; Manning and Cantley 2007).

Outro mecanismo de ação anti-apoptótico exercido pela Akt/PKB é devido à fosforilação da Bad. A fosforilação dessa proteína, que faz parte da família das Bcl-2 (linfoma das células B 2), pode reduzir a apoptose celular pela inibição da

atividade da Caspase-9. Essas respostas, em conjunto, fornecem grande parte da ação anti-apoptótica da Akt/PKB (Zhang, Liu et al. 2007).

Uma das principais proteínas intracelulares que sofre ação da via de sinalização IGF-1-PI3K-Akt/PKB é a cinase da glicogênio sintase (GSK-3 β). A GSK-3 β primeiramente foi identificada como uma serina/treonina cinase que fosforila e inibe a enzima glicogênio sintase (Markou, Cullingford et al. 2008). Ela é uma cinase reguladora fundamental com um grande número de alvos celulares, incluindo proteínas do citoesqueleto e fatores de transcrição, ou seja, se ativada ela sofrerá translocação para o núcleo celular e ativará fatores de transcrição que poderão modular a síntese de determinadas proteínas.

Atualmente, sabe-se que essa cinase tem ação sobre muitos substratos celulares que podem exercer um papel pró-apoptótico. A GSK-3 β encontra-se na sua forma ativa (desfosforilada) e é fosforilada e inativada pela Akt/PKB. Assim, quando a Akt age sobre essa cinase, a fosforilação do seu sítio N-terminal inativa essa proteína, causando uma diminuição na modulação de proteínas responsivas à GSK-3 β . Evidências recentes mostram que a GSK-3 β é um regulador negativo da HC. Um aumento na atividade da GSK-3 β , por uma expressão aumentada dessa enzima, inibe o processo hipertrófico, diminuindo a taxa de síntese proteica e a expressão de genes hipertróficos. A estimulação β -adrenérgica atuará sobre receptores acoplados à proteína G, e dessa forma, causará uma inativação da GSK-3 β , principalmente através da via de sinalização da PI3K-Akt/PKB. Esse fato diminui a ação anti-hipertrófica dessa enzima e causará um aumento nos processos que levarão à HC (Markou, Cullingford et al. 2008).

Um estudo realizado por Antos et al, em 2002, mostrou que ratos com uma expressão cardíaca aumentada de uma forma mutante de GSK-3 β permanentemente ativa, que sofreram coarctação da aorta e estímulo β -adrenérgico com isoproterenol, tiveram uma prevenção parcial da HC em relação aos animais controle (Antos, McKinsey et al. 2002).

Assim, um aumento da fosforilação (inativação) da GSK-3 β parece exercer função pró-apoptótica, sendo que o equilíbrio entre os dois estados (ativa e inativa) é fundamental para determinar o tipo de sinalização e quais os alvos intracelulares estão sendo modulados, podendo exercer um papel fundamental no manuseio dos distintos tipos de hipertrofia.

A Akt/PKB, como discutido anteriormente, tem diferentes alvos intracelulares. Dentre esses alvos, destacam-se aqueles que estão caracterizados como sinalizadores para uma hipertrofia cardíaca compensada. Entretanto, a proteína Akt/PKB não opera em via única, havendo redes de vias de sinalização totalmente integradas e complexas. Assim, uma das funções da proteína Akt/PKB para a modulação da HP é exercer uma atividade cruzada, ou seja, ela bloqueia um estímulo pró-apoptótico ocasionado pela ASK1 (também conhecida como MAPKKK5), fosforilando o seu resíduo s83. Essa proteína (ASK1) é uma cinase que ativa tanto a JNK quanto a p38, proteínas associadas à hipertrofia mal-adaptativa (Manning and Cantley 2007).

Apesar do conhecimento sobre os mecanismos específicos das vias de sinalização que vão promover a HP estarem ainda obscuros, uma das principais vias relacionada ao desenvolvimento de hipertrofia em resposta a estímulos gerados por receptores acoplados a proteína G (responsivos à angiotensina II

(Ang II), endotelina-1 (ET-1), por estresse de parede, mais especificamente por sobrecarga de pressão, é a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs foram identificadas como reguladores de vias de sinalização para o crescimento cardíaco, em meados dos anos 90. As MAPKs fosforilam uma série de outras proteínas intracelulares como fatores de transcrição, que, assim, modificam a sua ação. Elas estão divididas em três subfamílias, baseadas na cinase terminal da via de sinalização. Uma dessas famílias é a família da p38-MAPK.

A p38-MAPK é uma importante mediadora de diversas funções biológicas, dentre elas destacam-se: crescimento, proliferação e morte celular. Essa proteína é considerada um componente crítico das vias de sinalização mediadas pelo estresse. No coração, a p38-MAPK é conhecida por estar ativada em pacientes com doença cardíaca isquêmica (Cook, Sugden et al. 1999).

Acredita-se que essa proteína esteja extremamente associada à perda de função contrátil do coração e o aparecimento de fibrose. Em muitos estudos que utilizaram ratos transgênicos com uma inibição no gene responsável pela síntese da p38-MAPK, há uma controvérsia sobre a real ação dessa molécula sinalizadora, ou seja, parece que sua função pró-apoptótica ou anti-apoptótica pode ser dependente de qual isoforma encontra-se mais ativa (McMullen and Jennings 2007).

Em 2006, Tenhunen et al utilizaram um adenovírus que aumentou a expressão da p38-MAPK α . No terceiro dia após a inserção do adenovírus, a expressão gênica de determinadas proteínas foi alterada, principalmente aquelas que regulam a progressão do ciclo celular e aquelas envolvidas com inflamação.

No sétimo dia, os corações estavam notavelmente fibróticos e contendo muitas células inflamatórias, apesar de não existir demonstração de HC (Figura 3E e F). Isso demonstra a relevância da p38-MAPK α na promoção dos processos inflamatórios. A síntese e a liberação de proteínas relacionadas ao surgimento de inflamação no coração (citocinas e outros mediadores inflamatórios) são responsáveis pelo surgimento da fibrose no músculo cardíaco. A inibição seletiva da p38-MAPK bloqueou a secreção tanto de interleucina-6 (IL-6) quanto do fator de necrose tumoral α (TNF α), duas moléculas inflamatórias, além de diminuir a fibrose cardíaca (Kamaraju and Roberts 2005; Li, Georgakopoulos et al. 2005). Em outro estudo, após três dias da injeção do adenovírus, houve um aumento na expressão de fatores de transcrição específicos como o GATA4 e o NFAT (Clerk and Sugden 2006).

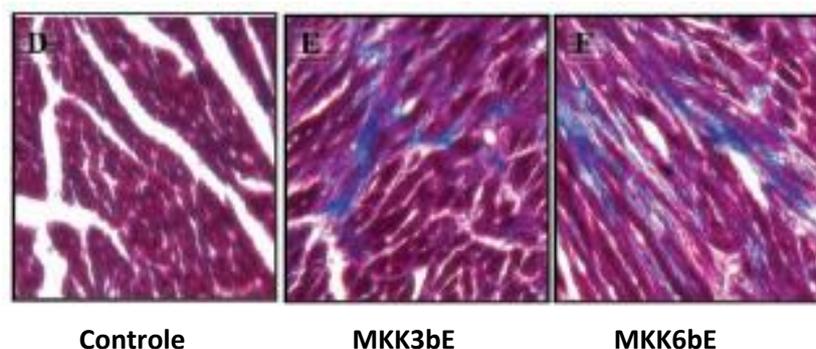


Figura 3. Corte histológico transversal de coração. Coloração realizada com tricrômico de Masson para analisar presença de colágeno em três grupos distintos: controle, expressão aumentada de proteínas upstreams (MKK3bE e MKK6bE) para a p38-MAPK (Liao, Georgakopoulos et al. 2001).

A proteína ASK1, que é ativada no coração por uma série de estímulos estressores como sobrecarga de pressão e estimulação neuroendócrina, é conhecida por ser uma cinase que ativa a proteína p38-MAPK e parece exercer um papel fundamental na sinalização para a apoptose e para o remodelamento cardíaco patológico. Em um estudo publicado em 2008, Taniike et al indicaram que a via da ASK1/p38-MAPK regula negativamente a hipertrofia cardíaca fisiológica. A informação foi confirmada nesse mesmo estudo quando em cultura celular, foi utilizado um inibidor para a p38-MAPK e observou-se um aumento na hipertrofia dos cardiomiócitos dependente do IGF-1 (Taniike, Yamaguchi et al. 2008).

Embora o papel da p38-MAPK deva ser esclarecido, existem muitas evidências de que a ativação da sua via de sinalização, dependente da ASK1, ativada por estímulos patológicos, pode levar ao remodelamento cardíaco mal-adaptativo e ao mesmo tempo pode exercer uma ação atenuante sobre a sinalização para a HF dependente da Akt/PKB. Assim, no estudo de Taniike et al, os animais *knockouts* para a ASK1, que fizeram exercício físico de natação (2 vezes/dia, 7 dias/semana, 90 minutos/sessão por 8 semanas), mostraram um aumento na fosforilação da Akt em relação aos controles. Além disso, esses ratos desenvolveram HC Fisiológica quando comparados aos animais controle, fato que corrobora a informação obtida em outros estudos.

Assim, uma relação entre as vias anti-apoptóticas PI3K-Akt/PKB e pró-apoptóticas JNK/p38 pode ser estabelecida através dessa comunicação entre as duas vias de sinalização e servir como uma boa relação moduladora do seu envolvimento na modulação da HC (fisiológica ou patológica).

1.4 O Papel Modulador do Estado Redox Celular na Hipertrofia Cardíaca

Com o passar dos anos, o estado redox celular passou a ser visto não só como uma série de reações metabólicas, mas também como reações importantes para outros sistemas, como a sinalização celular e a defesa do organismo contra xenobióticos (Hancock 2009).

Essa nova teoria determina que as alterações ocasionadas pelo estresse oxidativo provocadas por oxidantes não-radicalares são maiores que as provocadas pelos radicais livres, pois o aumento na formação dos radicais livres é balanceado pela sua alta taxa de degradação do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Já as moléculas não radicalares como o H_2O_2 , hidroperóxidos lipídicos, aldeídos, quinonas e dissulfetos, apresentam uma meia-vida maior e podem assim influenciar a oxidação de outras proteínas contendo grupamentos tióis que conseqüentemente participam da sinalização celular para a síntese de receptores de membrana, regulação da transcrição gênica, proliferação celular, angiogênese e apoptose (Jones 2008).

A redefinição contemporânea propõe que este fenômeno não está somente associado aos danos macromoleculares a lipídios, proteínas e ácido nucleicos, mediados pela ação dos radicais livres, e ao desequilíbrio em favor da geração de ERO quando relacionado ao aumento das defesas antioxidantes. Estas espécies químicas têm sido reconhecidas como importantes segundos mensageiros celulares devido a sua ação oxidante, principalmente sobre proteínas intracelulares, amplamente reconhecidas como sensores moleculares. Esse sinal desencadeado pela oxidação proteica leva a uma regulação de

eventos redox-sensíveis, como a proliferação, adesão e sobrevivência celular (Chiarugi 2009). Com isso, o quadro de estresse oxidativo, por uma visão contemporânea, diz respeito a uma perturbação no controle de vias de sinalização redox, promovida por essas espécies químicas, provocado por um aumento na concentração de ERO ou por uma diminuição na atividade de um ou mais sistemas de defesa antioxidante (Droge 2002; Jones 2006).

Muitas evidências sugerem que os processos oxidativos metabólicos podem contribuir para o desencadeamento de diversas doenças. Diversos estudos foram realizados com o objetivo de determinar quais as possíveis intervenções que seriam eficientes para prevenir o estresse oxidativo. Após isso, os dados inconsistentes sobre a real importância da utilização de antioxidantes no manuseio do estresse oxidativo mostram que o estado redox da GSH/GSSG e cisteína/cistina, juntamente com a análise do balanço entre os agentes oxidantes e antioxidantes, parecem ser ferramentas fundamentais para quantificar o estresse oxidativo. A GSH é reconhecida como o mais importante tampão redox intracelular, sendo assim um importante indicador sobre o ambiente redox celular. Sua principal função na prevenção do dano causado pelas ERO é formar ligações dissulfeto com os resíduos de cisteínas e, dessa forma, bloquear os grupamentos tíois desses aminoácidos, prevenindo e inibindo a formação dos produtos derivados da oxidação dessas moléculas. Mesmo assim, em muitos estudos com modelos caracterizados pelo aumento no estresse oxidativo não foi observado um acréscimo na oxidação da GSH e da cisteína ao mesmo tempo, sugerindo que diversos outros mecanismos podem estar envolvidos no controle

da sinalização redox para o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo (Jones 2006).

Durante a sinalização oxidativa, os oxidantes intracelulares produzidos por diferentes fontes, dentre eles, o ânion radical superóxido, são rapidamente convertidos a peróxido de hidrogênio que, por sua vez, reagem com grupamentos tióis de proteínas, moléculas que se comportam como verdadeiros sensores químicos. A mitocôndria, uma fonte importante de ERO, aparece com um papel oxidativo importante. Esses processos de oxidação exercidos pela mitocôndria são rigidamente controlados por sinais extracelulares e intracelulares, e são fundamentais para a regulação de diversos processos, como a sobrevivência celular (Murphy 2009).

Como discutido anteriormente, a sinalização celular influencia uma diversidade enorme de processos celulares. Essa comunicação celular e alteração do seu comportamento frente a uma alteração do meio onde está inserida é uma das principais funções celulares. Dessa forma, o principal composto estudado como molécula envolvida na sinalização redox é o H_2O_2 .

As principais características que fazem do peróxido de hidrogênio a principal espécie reativa que exerce um papel de segundo mensageiro são: a sua produção e degradação enzimática e a sua química interessante, que fornece especificidade para a oxidação de tióis.

Em organismos unicelulares, uma alteração importante frente aos altos níveis de peróxido de hidrogênio é um aumento na produção de antioxidantes, provocado por um aumento na expressão gênica desses compostos, e no reparo de proteínas danificadas por essa espécie, ações que permitem uma adaptação

às condições oxidativas (An and Blackwell 2003). Entretanto, em organismos pluricelulares, o H_2O_2 pode ativar vias de sinalização que estimulam a proliferação, diferenciação, migração ou apoptose celular, além de vias relacionadas à sobrevivência (Veal, Day et al. 2007).

Existem grandes diferenças quanto à concentração necessária de peróxido para iniciar um determinado estímulo, e essa diferença é dependente da célula que estamos analisando. Em mamíferos, um estudo recente de Sablina et al, de 2005, mostrou que a síntese de antioxidantes foi aumentada em concentrações celulares baixas de H_2O_2 , protegendo contra o dano celular e permitindo a sobrevivência da célula, enquanto em concentrações altas houve um estímulo para um aumento na expressão de agentes pró-oxidantes envolvidos na apoptose celular (Sablina, Budanov et al. 2005).

Apesar do peróxido de hidrogênio ser uma molécula apolar, acredita-se que seu poder de difusão seja pequeno, conferindo um poder como sinalizadora a essa molécula apenas no seu sítio de geração. Isso é devido ao alto poder catalítico e à abundância de enzimas como a catalase, a glutathione peroxidase e a tioredoxina peroxidase, que degradam o peróxido de hidrogênio no seu local de produção. Dessa forma, as diferentes concentrações de antioxidantes, nos diversos compartimentos celulares, também podem influenciar a sinalização redox exercida por essa molécula.

Certas características de algumas proteínas as tornam suscetíveis à oxidação por peróxido de hidrogênio. Por exemplo, qualquer proteína que tenha uma cisteína desprotonada é suscetível a essa oxidação reversível. Os resíduos

cisteínas da maioria das proteínas intracelulares são protonados, portanto incapazes de reagir com o peróxido de hidrogênio. Entre os aminoácidos, a cisteína é a única que apresenta um grupamento tiol na sua cadeia lateral (-SH), essa molécula parece exercer um efeito catalítico sobre ela, ou seja, a ação do H_2O_2 sobre essas moléculas pode levar à oxidação dos grupamentos tíois de resíduos de cisteína e, com essa alteração, irão sofrer uma modificação conformacional, alterando amplamente suas funções celulares, exercendo um papel como sinalizadoras.

A oxidação dos grupamentos tíois da cisteína é um dos principais mecanismos pelo qual as ERO agem sobre o estado redox celular. A oxidação de uma molécula de tiol de uma molécula de cisteína leva à formação de uma ponte dissulfeto (-S-S-), que pode causar uma grande alteração na função dessa proteína. Quanto mais oxidadas essas moléculas, menor é a chance do sistema enzimático reduzir esses compostos, e assim terem suas funções normalizadas.

Essa oxidação leva à formação de ácido sulfênico, molécula que reage rapidamente com os grupamentos tíois da glutathione, formando pontes dissulfeto e, com isso, modificando a estrutura molecular desse composto. Essa alteração na estrutura da glutathione, que pode ser revertida pelo sistema glutathione/glutarredoxina, leva à inativação de uma série de enzimas intracelulares. Assim, devido a sua ação sobre a atividade enzimática e a sua característica reversível, a glutathione pode também ser considerada uma molécula com função sinalizadora redox -sensível.

As proteínas fosfatases exercem um papel central no controle da sinalização intracelular . Os resíduos de cisteína oxidados exercem papel fundamental na ativação de diversas fosfatases, agindo como moléculas sinalizadoras em resposta a estímulos como fatores de crescimento e citocinas. Essas proteínas agem desfosforilando uma série de moléculas intracelulares, como as MAPKs, inativando-as. O uso de resíduos de cisteína desprotonados, suscetíveis ao H_2O_2 , na desfosforilação catalítica de substratos celulares leva à inativação das fosfatases pelo H_2O_2 , ocasionando uma ativação nas MAPKs (Veal, Day et al. 2007).

Um importante mecanismo para a ativação das MAPKs pelo H_2O_2 é exercido pela enzima tioredoxina. A enzima tioredoxina é oxidada quando interage com o H_2O_2 e, assim, perde sua capacidade de se ligar à região N-terminal da ASK-1, ligação que inativaria essa proteína. Dessa forma, a falta da inibição da ASK-1 pela tioredoxina provoca um aumento na ativação da p38-MAPK e da JNK (Hayakawa, Matsuzawa et al. 2006; Veal, Day et al. 2007).

Um estudo realizado em 1998 por Zhang et al, mostrou que o H_2O_2 exerce um papel importante na ativação das MAPKs em cultura de células de tecido muscular liso da artéria pulmonar. O H_2O_2 foi capaz de ativar a p38-MAPK nesse modelo, mostrando ser um sinalizador importante na modulação do crescimento e proliferação celular da artéria pulmonar na HAP (Zhang, Jin et al. 1998). Choi et al, em 2005, demonstraram que a inibição da enzima peroxirredoxina aumenta as concentrações de H_2O_2 e a ativação de proteínas sinalizadoras como a p38-MAPK e a JNK (Choi, Lee et al. 2005).

O estresse oxidativo e as possíveis alterações quanto à sinalização redox, desempenham um papel central na fisiologia e patofisiologia cardíacas. A formação de ERO está associada ao surgimento de diversas doenças como aterosclerose e cardiomiopatia. Existem muitas evidências de que essas vias de sinalização influenciadas pelo estado redox celular desempenham um papel importante no desenvolvimento de HC e da IC. Por outro lado, a exposição crônica às ERO e um possível desequilíbrio redox, pode levar ao processo de apoptose dos cardiomiócitos. Tem sido sugerido que as alterações no metabolismo oxidativo que podem levar à apoptose celular, gerada pelo desequilíbrio na sinalização redox, é o principal evento para o desfecho da IC. Esse desequilíbrio no estado redox dos cardiomiócitos pode estar envolvido na indução ou ativação de muitas proteínas miocárdicas que regulam a condição estrutural da matriz extracelular, e dessa forma, a função cardíaca (MacCarthy and Shah 2003).

Sabemos que, diversas vias redox-sensíveis são estimuladas por fatores neuro-humorais ou por sobrecarga mecânica crônica imposta ao coração. Em estudos utilizando células cardíacas em cultura, mostrou-se uma relação positiva entre a HC desenvolvida e o aumento de ERO quando essas células foram estimuladas por Ang II, ET-1, noradrenalina ou por estiramento mecânico (Seddon, Looi et al. 2007).

Atualmente, existem muitos estudos demonstrando que, nos modelos animais de IC, a alta produção de ERO está intimamente associada à ativação das MAPKs. Em um estudo de 2002, Li et al, mostraram que, em um modelo experimental de sobrecarga de pressão, os aumentos na atividade da NADPH

oxidase, importante fonte de ERO, aconteceram paralelamente aos aumentos na formação de ERO e na ativação das MAPKs (Li, Gall et al. 2002). A apoptose ocorre durante a HC e a isquemia miocárdica, e possivelmente contribui para o desenvolvimento e progressão da disfunção cardíaca e IC. Muitas evidências experimentais sugerem que as ERO podem mediar a apoptose por uma série de mecanismos, e esses mecanismos dependem das concentrações dessas espécies nos diferentes compartimentos subcelulares. Um trabalho associou as baixas concentrações de peróxido de hidrogênio à ativação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), já concentrações aumentadas de peróxido sinalizariam para a ativação da p38-MAPK e a JNK, vias relacionadas com a apoptose celular. Portanto, concentrações baixas de ERO parecem estar envolvidas com a promoção ou supressão da HC e altas concentrações envolvidas com a apoptose e/ou necrose celular (Sabri, Hughie et al. 2003).

Essa ativação da p38-MAPK através de um quadro que favoreça o desequilíbrio redox parece ser dependente de outra proteína, a ASK-1 que, quando ativada, promoverá a HC. A depleção dessa proteína causa uma atenuação na ativação da p38-MAPK e da HC em resposta à infusão de Ang II. Animais com uma downregulation de genes que são responsáveis por expressar a ASK-1 mostram uma diminuição na ativação de NFκB e da HC em resposta aos aumentos na concentração de ERO por estimulação de receptores ATII (Giordano 2005). Em um estudo de Yamaguchi et al, em 2003, uma expressão aumentada de ASK-1, e conseqüentemente de p38-MAPK induziu apoptose dos cardiomiócitos. Já ratos *knockout* para o gene responsável pela transcrição dessa proteína mostraram uma atenuação do remodelamento ventricular em

resposta à sobrecarga de pressão, fato atribuído à redução da apoptose nesse modelo (Yamaguchi, Higuchi et al. 2003).

Um dos mecanismos que estão associados com a ativação das MAPKs pelas ERO é a dissociação da subunidade α e β de uma proteína G_i pelo H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio ativa essa proteína G pela modificação de duas cisteínas em sua estrutura. Essa modificação permite a dissociação das suas subunidades e a ativação de vias de sinalização dependentes de enzimas intracelulares que serão ativadas. A Ang II é outro agonista que é liberado em situações de remodelamento cardíaco. A maioria das ações da Ang II está envolvida com a ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares como as MAPKs, a proteína cinase C (PKC), ambas reguladas pela interação da Ang II com um receptor acoplado à proteína G_q . Um estudo de 1998 sugere que a maioria dos efeitos hipertróficos da Ang II é mediada pela produção de ERO. Nakamura et al. primeiramente demonstraram que a infusão de Ang II em meio de cultura provoca um aumento na produção de ERO e que o uso de antioxidantes levou a uma diminuição da hipertrofia induzida pela Ang II (Nakamura, Fushimi et al. 1998). Outras moléculas que são capazes de aumentar a produção de ERO, quando administradas, são a endotelina-1 e as catecolaminas, liberadas pela ativação do sistema neurovegetativo (Laskowski, Woodman et al. 2006).

Outro papel importante das ERO no remodelamento cardíaco diz respeito a sua capacidade de modificar a estrutura da matriz extracelular. As ERO parecem estar envolvidas na proliferação de fibroblastos, na ativação de metaloproteinases de matriz, ativação de NF κ B, no aumento de infiltrado inflamatório e alterações fundamentais para o surgimento de fibrose. As

metaloproteinases geralmente são secretadas na sua forma inativa. Após a reação das ERO com o aminoácido cisteína dessas proteínas, elas são ativadas. O fator de transcrição NFκB também está presente na sua forma inativa no citosol. A atuação das ERO promove a degradação do sítio inibitório dessa molécula, podendo modular dessa forma os processos inflamatórios.

O remodelamento cardíaco causado pelas alterações estruturais provocadas por um desequilíbrio redox promove um aumento no consumo de oxigênio do coração. O consumo de oxigênio cardíaco é proporcional à tensão exercida sobre a parede ventricular, e pela lei de La Place, a tensão (ou estresse) de parede ventricular é proporcional a $P \times r/2\pi$ (onde P = pressão, r = raio de curvatura do ventrículo e π = espessura da parede ventricular). Assim, sobre qualquer pressão e espessura de parede, um ventrículo dilatado consome mais oxigênio por grama do que um coração com uma câmara normal. Essa alteração na geometria cavitária e no consumo de oxigênio, aumenta a produção de ERO e leva a alterações na expressão gênica (Giordano 2005).

A HP, como descrito anteriormente, está associada ao aumento da matriz extracelular, e com o aumento dessa área notamos um aumento na síntese de colágeno, diminuição no número de vasos e, dessa forma, uma diminuição do aporte e difusão tecidual de oxigênio. Essas características não estão presentes na HF induzida pelo exercício físico (McMullen and Jennings 2007).

Há muito, o envolvimento do treinamento físico na modulação do estresse oxidativo tem sido estudado. Os efeitos clássicos do exercício físico agudo sobre esse quadro são: aumento na produção de ERO, devido ao aumento no consumo de oxigênio durante a sessão de exercícios aeróbios. Já a prática

repetitiva, ou seja, a participação em um programa de treinamento físico provoca uma adaptação antioxidante enzimática, devido à síntese dessas proteínas, ocasionada por uma sinalização dependente das concentrações das ERO. Acredita-se que o papel modulador do exercício físico no estresse oxidativo deve-se a uma elevação moderada na produção de ERO, que é contrabalanceada pelo aumento na atividade de enzimas que catalisam as reações de degradação dessas moléculas químicas. Esse processo de adaptação provocado pelo exercício físico pode acabar modulando a transcrição gênica que é regulada pelo estado redox celular. Além disso, Traverse et al. em 2006, mostraram que a produção de ERO no coração é bem menor em relação a outros órgãos como, músculo esquelético e fígado (Traverse, Nesmelov et al. 2006).

A simples análise das substâncias pró-oxidantes e antioxidantes parece não demonstrar claramente se o exercício é capaz de modular o estresse oxidativo. A partir da nova concepção de estresse oxidativo proposta por Jones et al, em 2006, uma análise do estado redox celular e as possíveis influências da relação GSH/GSSG e da tiorredoxina na modulação da sinalização celular para o dano celular deve ser descrita (Jones 2006).

Em um estudo de Elodka et al, de 2005, foi verificado que o exercício agudo leva a uma diminuição da razão GSH/GSSG (Elokda, Shields et al. 2005). Já Somani et al, demonstraram que o treinamento físico aeróbio foi capaz de aumentar a quantidade de GSH e diminuir a de GSSG no coração, fígado e rins (Elokda and Nielsen 2007). Assim, evidências sugerem que o treinamento físico provoca uma adaptação desse sistema, protegendo o organismo de eventuais

quadros de estresse oxidativo provocado por estímulos agudos. Mesmo assim, poucos estudos analisam a relação entre a participação de um programa de treinamento físico, as alterações no estado redox nos cardiomiócitos e sua possível influência sobre a sinalização celular para a hipertrofia cardíaca do ventrículo direito.

2. HIPÓTESE

A cinase serina/treonina (Akt) está envolvida como um mediador crítico para o tamanho celular, sobrevivência de vários tipos celulares e para a inibição de várias moléculas pró-apoptóticas. Seu papel está extremamente ligado às adaptações fisiológicas no tecido cardíaco. Esse papel pode ser determinado pelas concentrações e pela compartimentalização dessa proteína, visto que sua atividade está relacionada com mais de cem proteínas intracelulares. Essa relação intracelular é o fator principal para as diferentes ações da Akt. Em contrapartida, as proteínas ativadas por mitógeno (MAPKs), mais especificamente a proteína p38-MAPK, uma das sub-famílias das MAPKs está relacionada com os processos de crescimento, diferenciação, inflamação e apoptose celular em muitos tecidos, inclusive nos cardiomiócitos. A alteração estrutural patológica promovida por um aumento na ativação da p38-MAPK pode estar relacionada também com um aumento na atividade da NADPH oxidase, definindo a p38-MAPK como uma molécula-chave para o remodelamento cardíaco mal-adaptado pós-evento cardiovascular.

O exercício físico crônico tem sido extremamente utilizado como terapia cardiovascular. Essa utilização deve-se aos efeitos benéficos promovidos tanto em termos de remodelamento estrutural dos cardiomiócitos quanto das melhoras hemodinâmicas. Ao mesmo tempo que resultados significativos na melhora da sobrevivência em ratos tratados com monocrotalina, que participaram de um programa de exercícios físicos aeróbios já estão bem descritos (Souza-Rabbo, Silva et al. 2008), as alterações moleculares atuantes no sistema cardiovascular precisam ser melhor elucidadas.

Assim, a hipótese desse trabalho foi verificar se o treinamento físico aeróbio é capaz de melhorar as alterações funcionais, estruturais e morfométricas produzidas pela monocrotalina através da modulação redox-sensível de proteínas envolvidas com o remodelamento cardíaco.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse estudo teve como objetivo analisar os efeitos de um protocolo de exercícios físicos aeróbios sobre a função, a morfometria e a estrutura cardíaca. Além desses parâmetros, foram avaliadas as proteínas Akt e GSK-3B no coração de ratos com insuficiência cardíaca direita induzida por administração de monocrotalina.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o papel do treinamento físico aeróbio em esteira rolante na modulação do estado redox e das alterações funcionais, morfométricas e estruturais promovidas pela monocrotalina.
- Realizar análise hemodinâmica, através das medidas de pressão arterial sistólica e diastólica intraventricular direita, com o objetivo de verificar parâmetros relacionados à função cardíaca.
- Quantificar o grau de hipertrofia ventricular direita, esquerda e cardíaca.
- Analisar a congestão pulmonar e hepática.
- Avaliar as alterações estruturais nos cardiomiócitos (hipertrofia, volume intersticial e volume de vasos) através da análise histológica e estereológica.

- Avaliar a massa corporal dos animais submetidos ao protocolo.
- Avaliar o papel do peróxido de hidrogênio assim como o estado redox através da GSH/GSSG e suas particularidades quanto à ativação de proteínas relacionadas ao remodelamento cardíaco
- Avaliar o imunoconteúdo da p-Akt/Akt, da p-GSK-3 β /GSK-3 β , tiorredoxina (Trx1), peptídeo atrial natriurético (ANP) e suas inter-relações com as alterações funcionais, morfométricas e estruturais dos cardiomiócitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Protocolo Experimental

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar, com peso médio de 139 ± 15 gramas. O tamanho da amostra foi calculado *a priori*. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0, considerando-se um $\alpha=0,05$ e poder estatístico de 80% ($\beta=0,20$). Os animais provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS foram agrupados em caixas plásticas 270 x 260 x 310 mm, e receberam água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura (20-25C°) e umidade (70%) controlada e com ciclo claro escuro de 12 horas. Esses animais foram separados, sendo colocados quatro em cada caixa. O número total de ratos utilizados para todos os experimentos foi de 60 animais, sendo 24 para as análises histológicas e o restante para as demais técnicas desenvolvidas nesse estudo.

Os procedimentos experimentais realizados foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, projeto número 2008030, obedecendo às normas estabelecidas pela própria instituição que foi criada em 1997 (Goldym & Raimundo, 1997).

4.2 Considerações Éticas na Vivissecção dos Animais

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (Goldim, 1997)

4.3 Manuseio de Reagentes e Animais

Após a morte, os animais foram congelados em freezer -20°C e levados ao biotério da Universidade e foram recolhidos pela empresa Aborgama. Os materiais tóxicos foram manuseados na capela e, após sua utilização, encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para sua correta eliminação.

Todos os procedimentos com animais e reagentes foram realizados com o uso de avental, luva cirúrgica e máscara, levando em consideração os devidos cuidados necessários para proteção e segurança dos animais e dos pesquisadores envolvidos.

4.5 Grupos Experimentais

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais:

CONTROLE SEDENTÁRIO (CS) → que não recebeu monocrotalina e não participou do protocolo de exercícios físicos aeróbios.

CONTROLE TREINADO (CT) → que não recebeu monocrotalina e participou do protocolo de exercícios físicos aeróbios.

MONOCROTALINA SEDENTÁRIO (MS) → que recebeu monocrotalina e não participou do protocolo de exercícios físicos aeróbios.

MONOCROTALINA TREINADO (MT) → que recebeu monocrotalina e participou do protocolo de exercícios físicos aeróbios.

4.6 Sequência Experimental

- 1) Os animais iniciaram o período de adaptação em esteira (2 semanas).
- 2) Após o período de adaptação os animais receberam a injeção intraperitoneal única de monocrotalina (60mg/kg) ou o mesmo volume de solução salina.
- 3) Após o período de adaptação e a injeção de MCT ou salina, os animais realizaram o teste de velocidade máxima e iniciaram o protocolo de exercício físico aeróbio (4 semanas).
- 4) Após o término da segunda semana do protocolo de exercício físico, os animais realizaram o teste de velocidade máxima com o objetivo de reajustar a carga de trabalho imposta pelo treinamento.

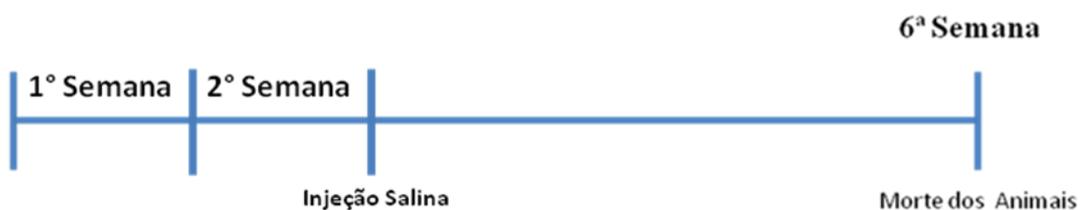
5) Após seis semanas do início do protocolo de exercício físico aeróbio, os animais foram mortos por deslocamento da coluna cervical e tiveram seus órgãos retirados (coração, pulmão, fígado, tíbia e artéria pulmonar) para a realização das análises que foram feitas posteriormente à morte dos animais.

4.4 Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar

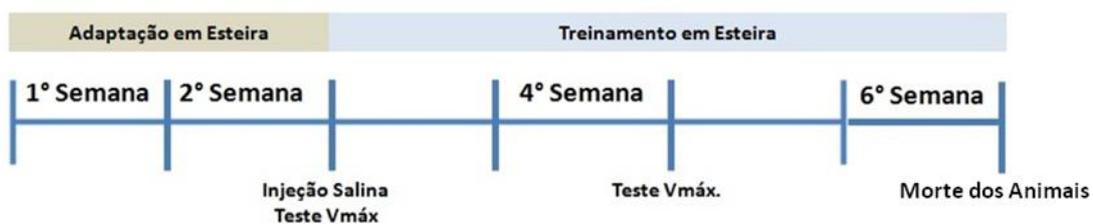
A indução da HAP foi realizada após os animais alcançarem a massa corporal de 180 gramas e terminarem o protocolo de adaptação em esteira. Nesse período, os animais que participaram dos grupos monocrotalina sedentário e monocrotalina treinado receberam uma única injeção intraperitoneal de monocrotalina (60 mg/kg), preparada de acordo com Singal (Singal, Khaper et al. 2000). Os ratos dos grupos controle receberam dose única de solução salina na mesma concentração dos grupos experimentais. Após a indução da HAP, os animais foram pesados e acompanhados semanalmente para identificarmos os sinais característicos da insuficiência cardíaca direita (cianose, letargia, redução no ganho de massa corporal).

4.7 Desenho Experimental

GRUPO CS



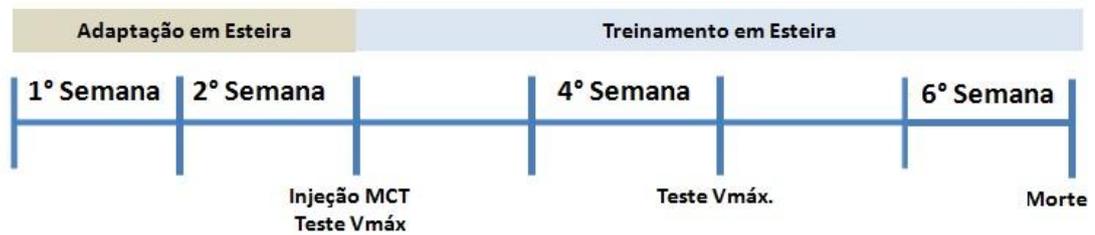
GRUPO CT



GRUPO MS



GRUPO MT



4.8 Protocolo de Exercício Físico Aeróbio

Os animais dos grupos CT e MT foram submetidos ao protocolo de exercícios aeróbios que constava de cinco sessões semanais, realizadas durante seis semanas. As sessões foram realizadas em esteira adaptada para ratos e camundongos Imbramed TK-01. A duração da sessão, bem como a intensidade, aumentaram gradativamente até atingir a duração de 60 minutos e 60% do VO_2 máximo, respectivamente. A intensidade de 60% do VO_2 máximo foi estabelecida segundo Rodrigues et al, após a realização de um teste de velocidade máxima na terceira e no início da quinta semana de treinamento (Tabela 2) (Rodrigues, Figueroa et al. 2007). Os animais foram mortos individualmente por deslocamento da cervical, 24 horas após a última sessão de exercício físico em esteira.

Tabela 2. Protocolo de treinamento físico. Frequência: 5 x por semana

| Semana | Período de Adaptação | | Período de Treinamento | |
|----------|----------------------|-----------------|------------------------|---------------------|
| | Tempo (Min.) | Velocidade Máx. | Tempo (Min.) | Velocidade |
| Primeira | 45 | 0,6 | ----- | ----- |
| Segunda | 60 | 0,9 | ----- | ----- |
| Terceira | ----- | ----- | 60 | 60% VO ₂ |
| Quarta | ----- | ----- | 50 | 60% VO ₂ |
| Quinta | ----- | ----- | 50 | 60% VO ₂ |
| Sexta | ----- | ----- | 50 | 60% VO ₂ |

4.9 Registros Hemodinâmicos

Para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) administradas intraperitonealmente. Os animais tiveram a veia jugular exposta e um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (0,9% de NaCl) foi implantado e introduzido até o átrio e ventrículo direito. A pressão ventricular sistólica direita (PVSD) e a pressão ventricular diastólica final direita (PCDFD) e suas respectivas derivadas foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas – EUA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais analógicos de pressão intraventricular foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 1000 Hz, expressos em mmHg. A partir da derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco, foram obtidos os valores da derivada de contração (dP/dt_{max}) e da derivada de relaxamento (dP/dt_{min}), respectivamente, sendo estes resultados expressos em mmHg/s.

4.10) Análise da Derivada de Contração e Relaxamento do Ventrículo

Direito

A análise foi realizada utilizando-se um programa comercial (Windaq) associado ao sistema de aquisição. Esse programa permite a derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco, fornecendo valores positivos da derivada de contração (dP/dt_{max}) e negativos da derivada de relaxamento (dP/dt_{min}). Os resultados foram expressos em mmHg/s.

4.11 Medidas Morfométricas e Preparação dos Homogeneizados

Após a anestesia com quetamina e xilasina, os animais sofreram a cirurgia para registro hemodinâmico e após o procedimento, ainda anestesiados, foram mortos por deslocamento da coluna cervical. O tórax foi aberto, o coração foi rapidamente retirado, os átrios foram separados e, após isso, os ventrículos foram pesados. O ventrículo direito foi separado do septo para avaliação da hipertrofia ventricular direita. A hipertrofia cardíaca direita foi avaliada pelas relações: massa ventricular direita/massa corporal (mg/g), massa ventricular direita/comprimento da tíbia (mg/mm), massa ventricular direita/massa ventricular esquerda (mg/mg). O fígado e o pulmão foram retirados imediatamente após a morte dos animais, pesados e acondicionados em estufa a uma temperatura de 65 graus Celsius. Esses órgãos foram pesados diariamente até que obtivéssemos um peso constante. Esse método é descrito como peso úmido/ peso seco e foi utilizado para analisar a congestão

hepática e pulmonar, de acordo com estudo realizado por Singal, em 2000 (Singal, Khaper et al. 2000).

Os corações foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e homogeneizados antes de cada procedimento bioquímico. A homogeneização foi realizada por trinta segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), na concentração de 100 mmol/L. O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não ocorresse degradação protéica. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 10000 g em centrifuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotos SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer -80 graus celsius para dosagens posteriores.

4.12 Análise do Peróxido de Hidrogênio

O método foi baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. Fatias do tecido cardíaco foram incubadas por 60 minutos em tampão fosfato 10mM (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em picomoles de H₂O₂ por mg de proteína (Pick and Keisari 1980).

4.13 Análise da Relação entre a Glutathiona Reduzida e Glutathiona Oxidada (GSH/GSSG)

Para determinar a glutathiona total, um fragmento do tecido cardíaco foi retirado do coração e desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação foi contido com tampão fosfato 100mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L e foi lido no espectrofotômetro a 420nm (Akerboom and Sies 1989).

4.14 Análise por “Western Blot”

Após o fim dos experimentos, as amostras de coração a serem analisadas foram imersas imediatamente após a extração em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, enquanto a proteína foi isolada.

Para o isolamento das proteínas, as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mM, EDTA 5mM, ph=7,4) e homogeneizadas com a utilização do homogeneizador Politron em dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos. Foram adicionados ao tampão aprotinina

(10·g/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (20 μ M), para prevenir degeneração protéica. As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis.

Foram expostas 40 μ g de proteína a eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15%(P/V) de gel separados e 5% (P/V) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membrana usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20% (V/V), SDS 0,02% (P/V) (pH=8,3) em uma cuba de transferência resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1 hora de 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 imunodeteção usando os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal “anti-rabbit” IgG para Akt total, e Anticorpo primário policlonal “anti-rabbit” IgG para Akt fosforilada. Foi utilizado o anticorpo p38 MAP kinase para detecção dos níveis endógenos da proteína MAPK p38 Alfa, Gama e Beta, e Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) (3D7) Rabbit para detectar os níveis endógenos da proteína p38 MAPK fosforilada. Para análise da GSK3 total foi utilizado o anticorpo GSK-3 β (27C10) Rabbit e Phospho-GSK-3 β (Ser9) (5B3) Rabbit para analisar a expressão da GSK-3 β fosforilada. O imunconteúdo da tiorredoxina foi realizada utilizando-se o anticorpo Trx (D4) mouse monoclonal. Para a detecção do ANP foi utilizado o anticorpo primário (23/1) mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

Os anticorpos primários foram detectados usando os seguintes anticorpos secundários: “rabbit anti-sheep ou goat anti-rabbit horseradish peroxidase” e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana receberam a normalização pelo método de Ponceau (KLEIN et al, 1995).

4.15 Histologia e Estereologia

As análises histológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Após a morte dos animais, os corações e as artérias pulmonares foram dissecados. Os órgãos foram imersos em solução fixadora de 10% formaldeído preparada com por 48 horas em temperatura ambiente. Após este período, os órgãos foram processados em concentrações crescentes de álcoois e xilol e foram incluídos em in Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), seccionados em 5µm de espessura e corados em Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson. Cinquenta campos aleatórios e não-consecutivos foram analisados pro grupo.

Coração

O miocárdio foi analisado considerando-se ser composto de vasos

intramiocárdicos (ve) e cardiomiócitos (cmy) utilizando um sistema-teste composto por 42 pontos-teste (Weibel, Kistler et al. 1966).

A área transversal média de cmy foi determinada por:

$$A[\text{cmy}] := \frac{V_v[\text{cmy}]}{2 \cdot Q_A[\text{cmy}]} (\mu\text{m}^2)$$

Onde $Q_A[\text{estrutura}] := N[\text{estrutura}] / A_T$ ($1/\text{mm}^2$), N é o número de perfis vistos na área-teste A_T , considerando as linhas proibidas. As densidades de volume das estruturas analisadas seguiram a expressão $V_v[\text{estrutura}] := \frac{P_p[\text{estrutura}]}{P_T}$, onde P_p é o número de pontos que tocaram a estrutura analisada; P_T é o total de pontos dentro do sistema-teste.

4.16 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados, com o tamanho amostral (n), de cada grupo, mostrado na legenda de cada um dos gráficos.

Foi utilizado, para a realização da análise estatística, o software SigmaPlot, versão 11.0. Como os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via complementado pelo teste de Student-Newmann-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando a análise apresentou o nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). O nível de

significância para cada análise estatística está representada na legenda das figuras e tabelas.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da Massa Corporal durante o Protocolo Experimental

A massa corporal total foi mensurada semanalmente, com o objetivo de verificar as diferenças quanto as suas modificações, que por sua vez, são moduladas pela insuficiência cardíaca direita.

A figura 4 mostra a massa corporal total dos animais de todos os grupos durante o desenvolvimento do programa de exercícios físicos. Os pontos são referentes as médias da massa corporal de cada grupo, desde a primeira até a última semana de tratamento, término do protocolo experimental.

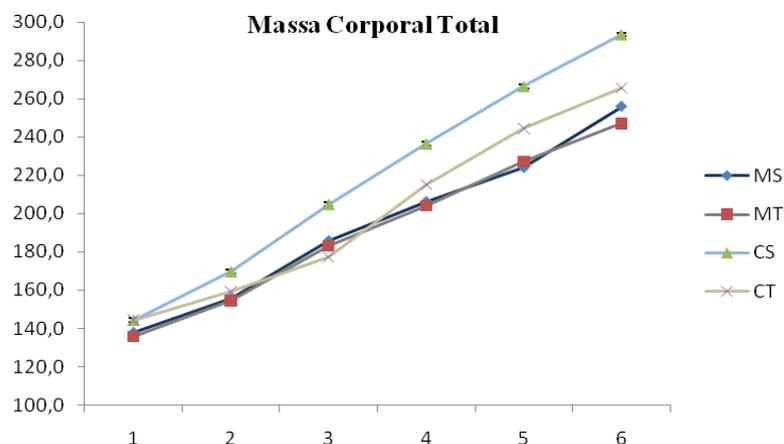


Figura 4. Massa Corporal Total

A massa corporal final (após 6 semanas do início do protocolo experimental) mostrou-se alterada nos diferentes grupos. Os grupos MS e MT tiveram uma redução no ganho de massa corporal, e isso foi evidenciado pela redução na massa

corporal final desses grupos quando comparados ao grupo CS. O aumento da massa corporal no grupo CS foi de 103% e de 84% no grupo CT, quando analisamos a massa corporal dos animais nesses grupos na primeira e sexta semana. Já nos grupos MS e MT, esse aumento foi de 86% e 82%, respectivamente, quando comparamos a primeira e sexta semana de tratamento. A figura 5 mostra que os animais que receberam a dose única de monocrotalina (MS e MT) tiveram uma redução estatisticamente significativa na massa corporal total na sexta semana de tratamento quando comparados ao grupo CS.

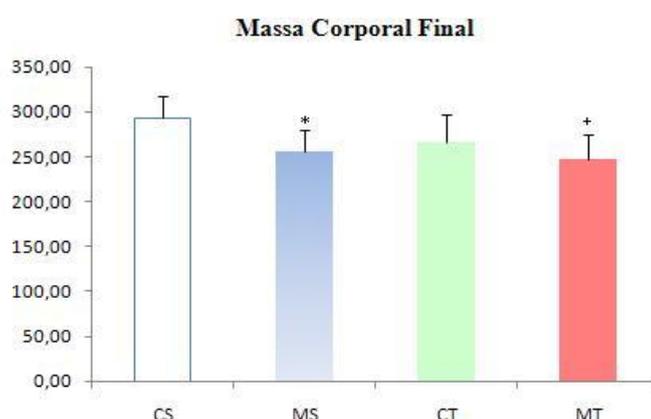


Figura 5. Massa Corporal Final. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 6-9 animais em cada grupo (n=6-9). CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS ($P < 0,05$), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CS ($P < 0,05$).

5.2 Avaliação Morfométrica e Hemodinâmica

5.2.1 Avaliação Morfométrica – Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca foi mensurada através de diferentes índices:

- massa cardíaca total (mg) / massa corporal (g)
- massa do VD (mg) / massa corporal (g)
- massa do VD (mg) / comprimento da tíbia (mm)
- massa do VD (mg) / massa do VE (mg)
- massa do VE (mg) / massa corporal (g)
- massa do VE (mg) / comprimento da tíbia (mm)

Os grupos MS e MT demonstraram hipertrofia cardíaca. Essa hipertrofia não foi constatada no VE, nos diferentes índices. Assim, como foi demonstrado pelos índices relacionados ao VD, nesse modelo, a hipertrofia cardíaca foi exclusivamente nessa câmara cardíaca (confirmada pelos três índices no VD).

Quando analisamos o índice de hipertrofia do VD, massa do VD / massa corporal total, apresentou um aumento significativo nos grupos monocrotalina em relação aos seus respectivos grupos controle. Nesse parâmetro, notamos que há um aumento de 2,3 vezes no grupo MT quando comparado ao grupo CT. Já nos animais MS, esse aumento foi de 2 vezes, quando relacionados ao grupo CS.

Para confirmar a alteração observada por esse índice, analisamos a hipertrofia ventricular direita pela razão da massa do VD em mg pelo comprimento da tíbia em mm, visto que no modelo de *Cor pulmonale* os animais mostraram uma redução na massa corporal total e isso pode ter exercido influência sobre o parâmetro anterior. Com relação a esse índice, observamos o mesmo padrão de hipertrofia já comentado anteriormente. Ficou evidente uma hipertrofia no VD, visto que os animais MS e MT mostraram um aumento estatisticamente significativo nesse índice. Os animais do grupo MS mostraram um aumento de 62% quando relacionados ao seu respectivo controle. Já os animais MT tiveram um aumento de 79% em relação ao grupos CT. Quando comparamos o grupo MS e MT não notamos uma diferença significativa quanto ao grau de hipertrofia ventricular direita.

Analisando os índices para detecção de hipertrofia cardíaca no ventrículo esquerdo, não notamos nenhuma alteração morfométrica significativa nessa câmara cardíaca. Essa relação foi mensurada através dos índices VE (mg)/comprimento da tíbia (mm) e VE (mg)/massa corporal (g).

Tabela 3. Parâmetros morfométricos (índices de hipertrofia do coração) dos diferentes grupos experimentais. Resultados medidos após o final do protocolo experimental.

| Parâmetros | CS | MS | CT | MT |
|--------------------|------------|-------------------------|------------|------------------------|
| Massa Corporal (g) | 328±26,3 | 250,1±36,2 | 328±26,3 | 293±34,2 |
| Coração(mg)/MC(g) | 2,5±0,1 | 3,4±0,5 | 2,6±0,1 | 3,7±0,5 |
| VD(mg)/MC(g) | 0,6±0,1 | 1,2±0,4 [*] | 0,6±0,1 | 1,4±0,3 ⁺ |
| VD(mg)/Tíbia(mm) | 0,6±0,1 | 1,2±0,4 [*] | 0,6±0,1 | 1,4±0,3 ⁺ |
| VD(mg)/VE (mg) | 0,31±0,04 | 0,58±0,2 [*] | 0,32±0,05 | 0,57±0,05 ⁺ |
| VE(mg)/MC(g) | 1,9±0,1 | 2,12±0,21 | 1,94±0,11 | 2,38±0,29 |
| VE(mg)/Tíbia(mm) | 17,06±1,79 | 14,82±1,26 [*] | 15,77±1,21 | 15,78±0,98 |

Valores expressos como média ± desvio padrão de 6-9 animais em cada grupo (n=6-9), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado; MC = massa corporal; VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS (P<0,05), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CS (P<0,05).

5.2.2 Avaliação Morfométrica do Pulmão – Congestão Pulmonar

Essa análise foi obtida através da razão entre a massa do pulmão logo após a morte do animal (peso úmido do pulmão) e a menor massa obtida por pesagens consecutivas desse órgão (peso seco do pulmão). Esse índice nos indica o grau de congestão pulmonar, podendo ser considerado um fator associado ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita.

Quando analisamos a congestão pulmonar utilizando como referência a relação entre o peso úmido do pulmão e a massa corporal total, notamos que há um aumento significativo nos animais que receberam a monocrotalina quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Os animais MS mostraram um aumento de 14% nesse índice quando comparados com os animais CS. Nos animais MT, esse aumento foi de 17% em relação ao grupo CT. Já entre os grupos que receberam a monocrotalina (MS e MT) não foi verificada alteração na congestão pulmonar.

5.2.3 Avaliação Morfométrica do Fígado – Congestão Hepática

Esse índice foi obtido através da relação entre a massa do fígado imediatamente após a morte do animal (peso úmido) e a massa do fígado após a sua estabilização de acordo com pesagens diárias (peso seco). Nesse parâmetro não foi identificado nenhuma alteração entre os diferentes grupos experimentais.

Tabela 4. Parâmetros morfométricos (pulmões e fígado) dos diferentes grupos experimentais. Resultados medidos após o final do protocolo experimental.

| Parâmetros | CS | MS | CT | MT |
|----------------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| Pulmão - P úmido/seco (g) | 1,4±0,3 | 1,8±0,7 | 1,2±0,1 | 1,7±0,9 |
| Fígado - P úmido/seco (g) | 8,6±1 | 6,7±2,4 | 7,7±1,1 | 5,8±3,1 |
| Pulmão - P úmido/MC (mg/g) | 26,1±1,8 | 29,7±1,7 [*] | 26,4±1,9 | 30,8±2,9 ⁺ |

Valores expressos como média ± desvio padrão de 6-9 animais em cada grupo (n=6-9), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS (P<0,05), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CS (P<0,05).

5.2.4 Avaliação da Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito (PDFVD)

A pressão diastólica final do ventrículo direito mostrou um aumento estatisticamente significativo nos animais MCT. Nos animais MS esse aumento foi de 2,3 vezes em comparação aos animais do grupo CS. No grupo MT o aumento na pressão diastólica no ventrículo direito foi de 3,3 vezes em relação ao grupo CT. A pressão diastólica final do ventrículo direito não mostrou diferença estatisticamente significativa nos grupos que receberam a injeção de monocrotalina.

5.2.5 Avaliação da Pressão Sistólica do Ventrículo Direito (PSVD)

Quando a quantificação dos registros de pressão ventricular direita foi realizada, notamos o mesmo perfil demonstrado na PDFVD: aumento significativo desse parâmetro nos animais que receberam a monocrotalina. Os animais MS tiveram um aumento de 2,7 vezes em comparação aos CS. O grupo MT mostrou um aumento de 2,6 quando relacionamos esse grupo ao CT. A comparação entre os grupos MS e MT foi realizada e não observamos nenhuma alteração estatisticamente significativa.

5.2.6 Avaliação das Derivadas Máxima e Mínima do Ventrículo Direito (dP/dt_{\max} , dP/dt_{\min})

As derivadas, máxima e mínima, estavam modificadas nos animais que receberam a monocrotalina. No grupo MS, tivemos um aumento de 2,17 e 2,37 vezes em comparação aos animais CS, na dP/dt_{\max} e dP/dt_{\min} , respectivamente. Da mesma forma, os animais MT demonstraram um aumento de 2 e 2,25 vezes, quando relacionados aos animais CT, na dP/dt_{\max} e dP/dt_{\min} , respectivamente. Essas variáveis não demonstraram alteração significativa quando confrontamos os resultados dos grupos MS e MT.

Tabela 5. Parâmetros hemodinâmicos dos diferentes grupos experimentais. Resultados medidos após o final do protocolo experimental.

| Parâmetros | CS | MS | CT | MT |
|----------------------|------------|--------------|-----------|--------------------------|
| PDFVD (mmHg) | 1,93±1,11 | 7,22±2,62* | 2,01±0,64 | 5,01±2,16 ⁺ |
| PSVD (mmHg) | 23,53±1,97 | 63,53±18,62* | 25,18±2,4 | 65,13±13,14 ⁺ |
| dP/dt _{máx} | 1143±238 | 2491±778* | 1257±803 | 2536±553 ⁺ |
| dP/dt _{min} | 754±88 | 1790±608* | 781±114 | 1760±193 ⁺ |
| FC | 263±31 | 244±13 | 257±28 | 249±61 |

Valores expressos como média ± desvio padrão de 6 animais em cada grupo (n=6), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado, FC = frequência cardíaca. *Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS (P<0,05), ⁺ grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CS (P<0,05).

5.3 Medidas Bioquímicas – Estresse Oxidativo Cardíaco

5.3.1 Avaliação das Concentrações de Peróxido de Hidrogênio no Tecido Cardíaco (VD e VE)

As concentrações de peróxido de hidrogênio em picomoles/miligramma de tecido cardíaco do VD foram mensuradas através da técnica de Pick e Keisari, 1980. Após o protocolo experimental notamos que houve uma redução estatisticamente significativa nessa medida quando comparamos os grupos MS (39%) e CT (31%) ao

grupo CS. No VE, essa medida não apresentou diferença significativa entre todos os grupos experimentais.

5.3.2 Avaliação do Estado Redox Celular através da Relação entre a Glutathiona Reduzida e Glutathiona Oxidada (GSH/GSSG – VD e VE)

Analizamos o estado redox celular através da relação entre a glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG). Nessa medida não notamos alteração significativa nos diferentes grupos quando analisamos o tecido ventricular direito. Já no VE, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa no grupo MS (26%) quando comparado ao grupo CS.

Tabela 6. Medidas Bioquímicas – Estresse Oxidativo Cardíaco

| Parâmetros Bioquímicos | CS | MS | CT | MT |
|--|-------------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| H ₂ O ₂ - VD (pmol/mg) | 0,483±0,088 | 0,297±0,08 [*] | 0,337±0,111 [†] | 0,362±0,081 |
| H ₂ O ₂ - VE (pmol/mg) | 0,242±0,08 | 0,224±0,087 | 0,287±0,077 | 0,218±0,071 |
| GSH/GSSG - VD | 4,13±0,71 | 4,54±0,65 | 3,69±0,53 | 4,44±0,57 |
| GSH/GSSG - VE | 5,6±0,96 | 4,16±0,85 [*] | 5,28±0,9 | 4,69±0,61 |

Valores expressos como média ± desvio padrão de 6-9 animais em cada grupo (n=6-9), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado, H₂O₂ = peróxido de hidrogênio. ^{*} Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS (P<0,05), [†] grupo CT difere significativamente em relação ao grupo CS (P<0,05).

5.4 Histologia e Estereologia

5.4.1 Histologia e Estereologia dos Cardiomiócitos

A estereologia dos cortes histológicos cardíacos mostrou diferença significativa nos parâmetros analisados utilizando-se o sistema teste M-42. Os dados são apresentados como volume em mm^3 ocupadas por vasos, cardiomiócitos e interstício de cortes transversais e longitudinais analisados e mostrados nas figuras abaixo. Nos animais MS notamos uma redução de 45% no volume total de vasos, corrigidos pela massa cardíaca total, quando comparados ao grupo CS. Já os animais do grupo monocrotalina treinado, demonstraram um aumento estatisticamente significativo de 86% em relação ao grupo monocrotalina sedentário (Figura 6).

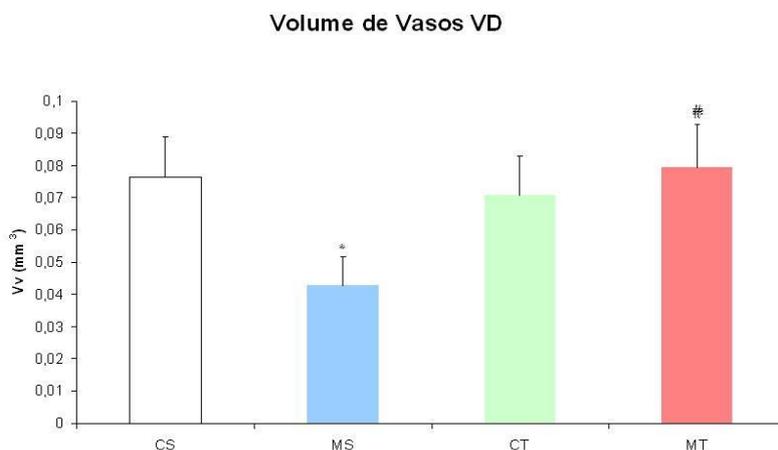


Figura 6. Volume de vasos no ventrículo direito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 5 animais em cada grupo ($n=5$), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT =

monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS ($P < 0,05$), # grupo MT difere significativamente do grupo MS ($P < 0,05$).

Quanto ao volume verificado em mm^3 do interstício no ventrículo direito, foi notado um aumento no grupo MS de 2 vezes o volume encontrado no seu respectivo grupo controle (CS). Quando comparamos o grupo CT ao grupo CS, encontramos uma redução de 60% nessa variável. Em contrapartida, os animais do grupo MT apresentaram um aumento de 2,10 vezes no volume do interstício encontrado no grupo CT. Os dois grupos que receberam a monocrotalina (MS e MT) também apresentaram diferença estatística nessa análise. O grupo treinado (MT) teve uma redução de 63% no volume intersticial quando comparado ao grupo sedentário (MS) (Figura 7).

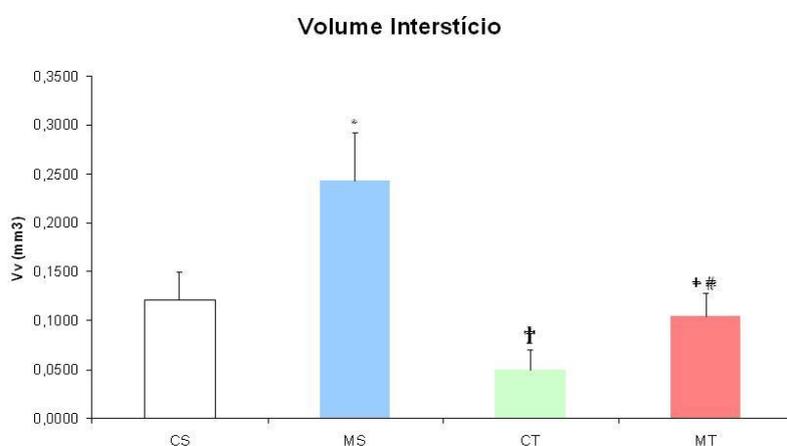


Figura 7. Volume do interstício no ventrículo direito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 5 animais em cada grupo ($n=5$), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS ($P < 0,05$), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT ($P < 0,05$),

grupo MT difere significativamente do grupo MS ($P < 0,05$), † grupo CT difere significativamente em relação ao grupo CS ($P < 0,05$).

Nenhuma alteração estatisticamente significativa quanto ao volume em mm^3 dos cardiomiócitos no ventrículo direito foi observada (Figura 8).

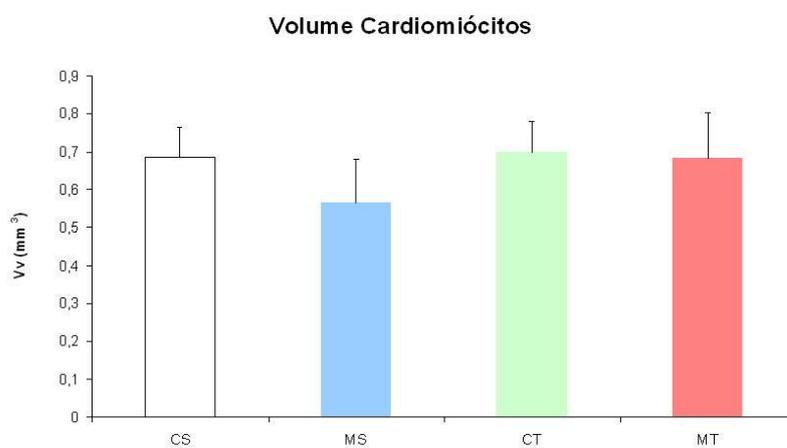


Figura 8. Volume dos cardiomiócitos no ventrículo direito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 5 animais em cada grupo ($n=5$), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado.

A área transversal média dos cardiomiócitos do ventrículo direito nos diferentes grupos experimentais mostrou estar alterada significativamente nos diferentes grupos experimentais. O grupo controle treinado (CT) mostrou uma redução significativa de 46% em relação ao grupo controle sedentário (CS) nesse parâmetro. Entretanto, o grupo monocrotalina treinado (MT) teve a área transversal

média dos cardiomiócitos no ventrículo direito aumentada em 96%, em comparação ao grupo controle treinado (CT) (Figura 9).

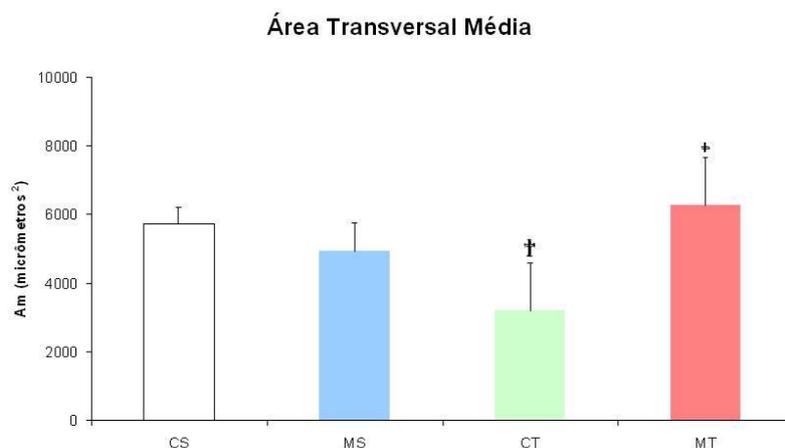


Figura 9. Área transversal média dos cardiomiócitos no ventrículo direito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 5 animais em cada grupo (n=5), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT ($P < 0,05$), † grupo CT difere significativamente em relação ao grupo CS ($P < 0,05$)

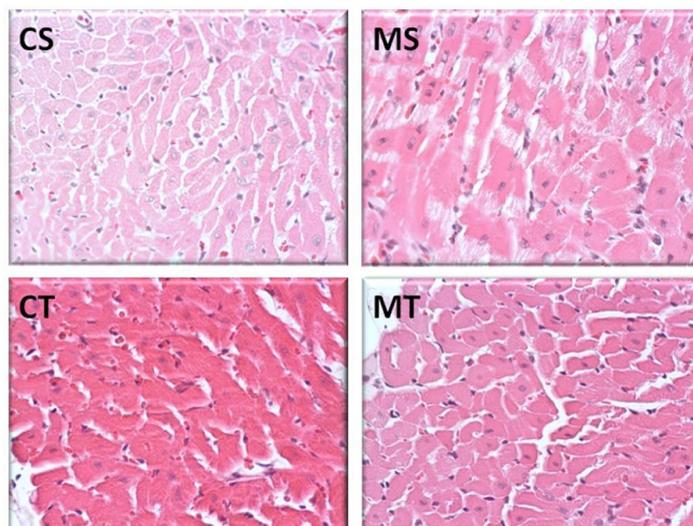


Figura 10. Monocrotalina e exercício físico aeróbio provocam alterações estruturais nos cardiomiócitos de ratos Wistar. Cortes histológicos representativos correspondentes a ratos Wistar que receberam uma injeção intraperitoneal de solução salina (0,9%) (CS e CT) e uma dose intraperitoneal de monocrotalina (60mg/kg) (MS e MT). As imagens foram acessadas após 28 dias do início do protocolo experimental. Coloração realizada com Hematoxilina-Eosina.

5.4.2 Espessura da Túnica Média da Artéria Pulmonar

A espessura da túnica média da artéria pulmonar foi mensurada através da análise de 50 campos utilizando-se o programa Image Pro-Plus (versão 4.5). Estes dados foram analisados e os resultados estão expressos na figura 11.

A espessura da túnica média da artéria pulmonar mostrou estar aumentada nos animais que receberam a dose de 60 mg/kg de monocrotalina e não participaram do programa de exercício físico aeróbio (MS). Esse aumento foi de 2,14 vezes quando comparamos esses animais ao grupo CS. Já os animais que receberam a mesma dose da droga e participaram do programa de exercício físico aeróbio (MT) mostraram um aumento de 1,54 vezes em comparação ao grupo CT mas nenhuma alteração foi verificada quando comparamos o grupo MT ao MS.

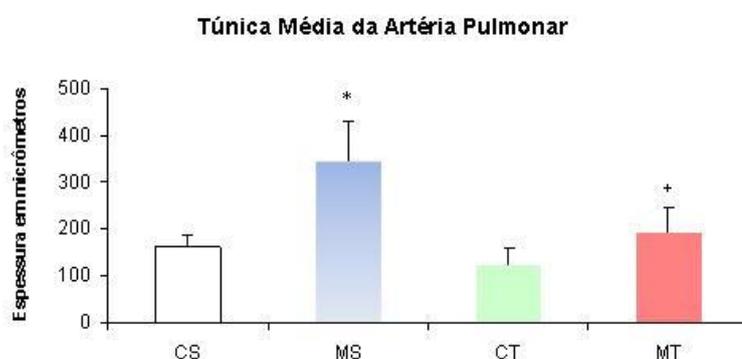


Figura 11. Espessura da Túnica Média da Artéria Pulmonar. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 4 animais em cada grupo (n=4).. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS ($P < 0,05$), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT ($P < 0,05$).

5.5 Imunoconteúdo de Proteínas Analisadas por Western Blot

Para examinar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia de ventrículo direito causada pela monocrotalina e o papel do estado redox sobre essa modulação, o imunoconteúdo de diferentes proteínas foi mensurado após as 4 semanas de protocolo experimental, utilizando-se a técnica de Western Blot.

A proteína Akt demonstra uma diminuição significativa (47,5%) nos animais do grupo monocrotalina sedentário quando comparados ao seu grupo controle (CS). Essa mesma proteína mostra uma redução de 27,5% nos animais CT em relação ao grupo CS. Já nos animais pertencentes ao grupo MT, notamos um aumento significativo (93% e 40%) no imunoconteúdo dessa proteína quando relacionamos esse grupo aos grupos MS e CS, respectivamente (Figura 12)

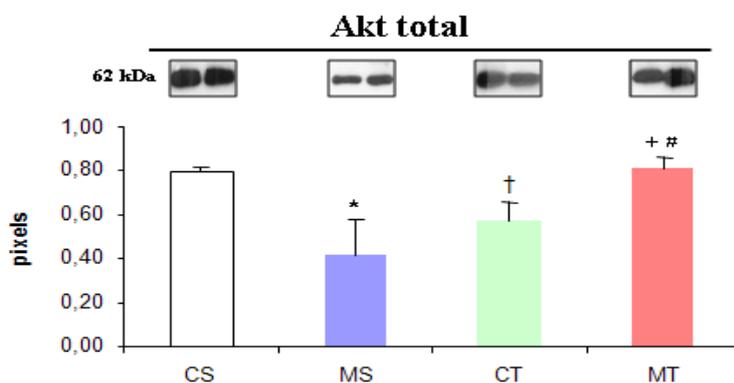


Figura 12. Análise da proteína Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere

significativamente em relação do grupo CS ($P < 0,05$), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT ($P < 0,05$), # grupo MT difere significativamente do grupo MS ($P < 0,05$), † grupo CT difere significativamente em relação ao grupo CS ($P < 0,05$).

A isoforma fosforilada da proteína Akt (p-Akt) mostrou uma redução (35%) estatisticamente significativa no grupo CT quando comparado ao grupo CS. Ao mesmo tempo, nos animais do grupo que receberam a monocrotalina e participaram do programa de exercício físico aeróbio, essa proteína está aumentada (73%) em relação ao seu grupo controle (CT) (Figura 13)

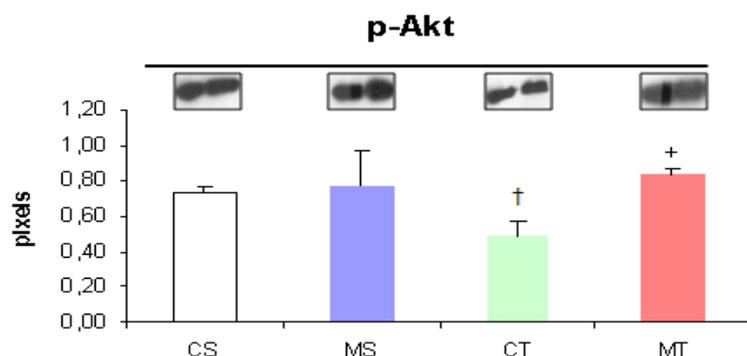


Figura 13. Análise da proteína p-Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo ($n=3-4$), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. + Grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT ($P < 0,05$), † grupo CT difere significativamente em relação ao grupo CS ($P < 0,05$).

Quando analisamos a relação entre essas duas proteínas (p-Akt/Akt-total), verificamos que essa não demonstra alteração estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (Figura 14).

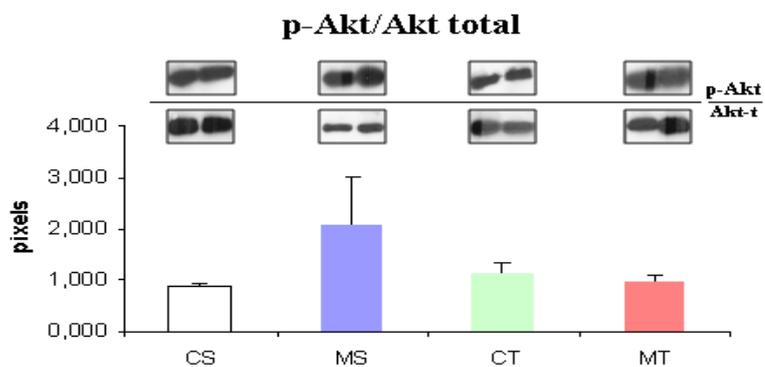


Figura 14. Análise da relação p-Akt/Akt total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4).

Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi verificada na cinase da glicogênio sintase (GSK-3 β) nos animais dos grupos CS, MS, CT e MT após as quatro semanas de protocolo experimental (Figura 15).

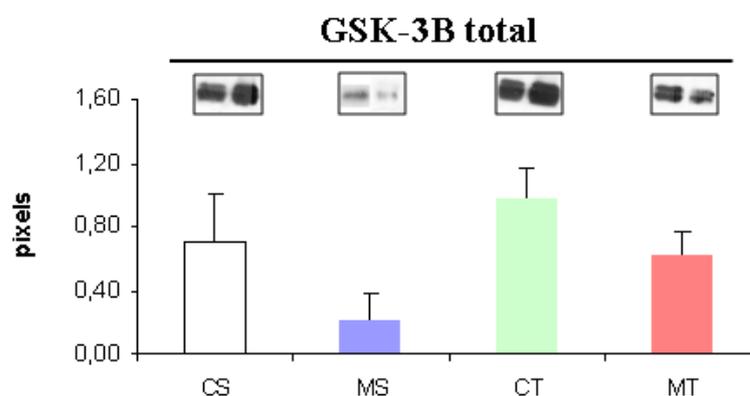


Figura 15. Análise da proteína GSK-3 β total no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4).

A isoforma fosforilada da GSK-3 β também não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos nessa janela temporal (Figura 16).

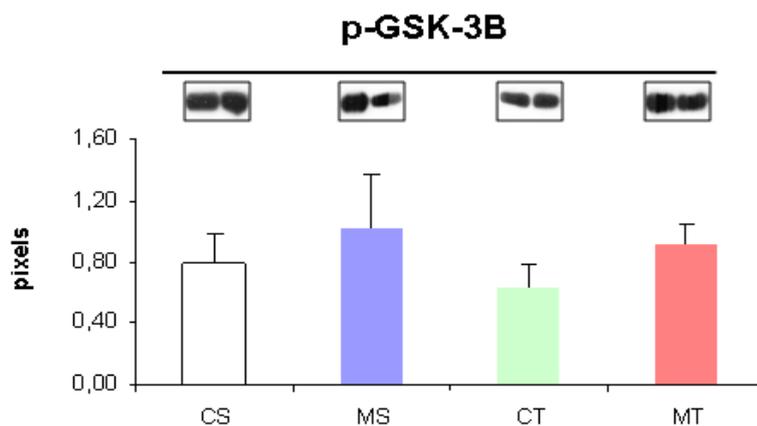


Figura 16. Análise da proteína p-GSK-3 β no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4).

Já a relação entre essas duas proteínas (p-GSK-3 β /GSK-3 β) está modificada entre os grupos. No grupo MS, esta relação está aumentada 1,73 vezes o grupo controle sedentário (CS). Nos animais pertencentes ao grupo monocrotalina treinado, tivemos um aumento significativo nessa relação (52%) quando comparamos esse grupo ao grupo CT, mas quando o relacionamos ao grupo MS, notamos uma redução acentuada (25%) na relação indicada por essas duas proteínas (Figura 17).

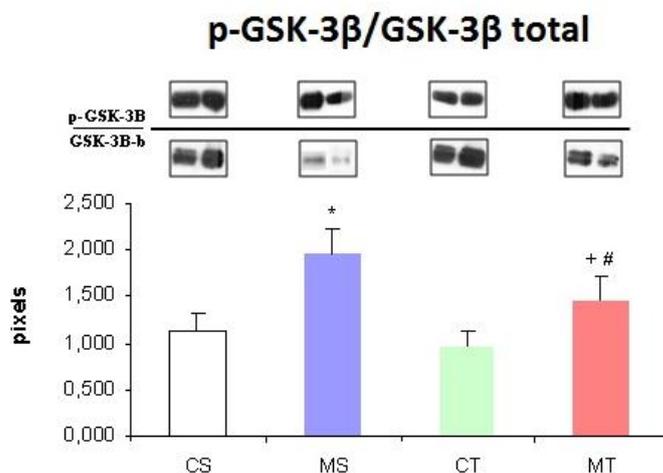


Figura 17. Análise da relação p-GSK-3 β /GSK-3 β no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4), CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * Grupo MS difere significativamente em relação do grupo CS (P<0,05), + grupo MT difere significativamente em relação ao grupo CT (P<0,05), # grupo MT difere significativamente do grupo MS (P<0,05).

No imunocontéudo das proteínas tioredoxina (Trx) e do peptídeo atrial natriurético (ANP), nenhuma alteração estatisticamente significativa foi verificada (Figura 18 e 19).

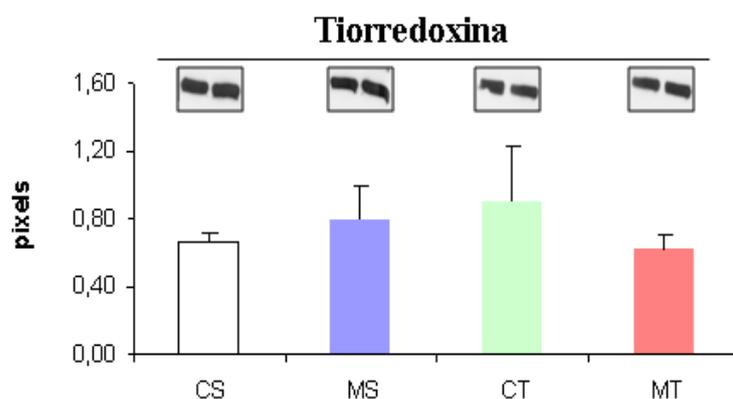


Figura 18. Análise da proteína tioredoxina (Trx) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4).

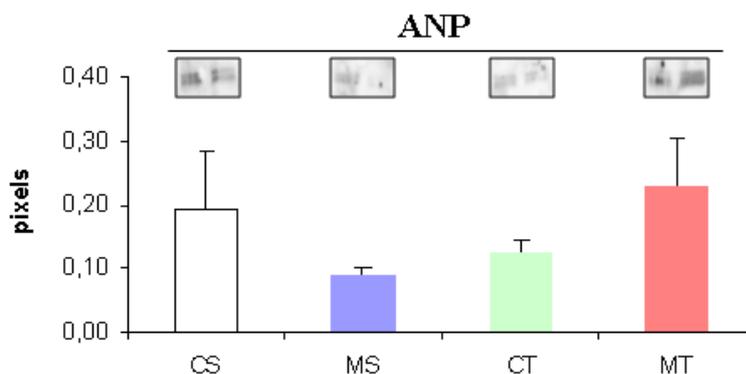


Figura 19. Análise da proteína tioredoxina (Trx) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de 3-4 animais em cada grupo (n=3-4).

6. DISCUSSÃO

De acordo com os nossos levantamentos, esse é um dos primeiros estudos que relaciona o estado redox celular com a sinalização provocada por proteínas envolvidas em modificações estruturais e funcionais no VD.

A HAP é uma doença caracterizada pela alta mortalidade, etiologia diversificada e por uma alta prevalência. Uma série de alterações morfofuncionais são observadas durante a progressão da doença, e essas modificações são fundamentais para confirmar que o modelo de insuficiência cardíaca direita gerado por monocrotalina está bem estabelecido.

Uma das características desse modelo é uma diminuição significativa no ganho de massa corporal nos animais que receberam a droga e desenvolveram o modelo de *Cor pulmonale*. Segundo Hessel (2006), nos animais que receberam uma dose de 80 mg/kg de monocrotalina houve uma redução significativa na massa corporal final quando comparados aos animais controle e ao grupo que recebeu uma dose de 30 mg/kg desse alcalóide (Hessel, Steendijk et al. 2006). Em outro estudo publicado pelo nosso laboratório, Lüdke, em 2010, verificou uma redução na massa corporal final dos animais que receberam, a droga (Ludke, Mosele et al.). Nos nossos estudos, observamos que essa redução no ganho de massa corporal, juntamente com o aparecimento de outros sintomas como: letargia, cianose, dispnéia, alterações hemodinâmicas e congestão pulmonar, confirmam o estabelecimento do modelo de *Cor pulmonale*.

Juntamente com os dados já descritos acima, observamos em nossas análises que após as quatro semanas da injeção de monocrotalina, os animais dos grupos MS e MT apresentaram hipertrofia ventricular direita e congestão pulmonar. A hipertrofia dessa câmara e a congestão pulmonar não mostraram diminuição quando comparamos o grupo MT ao MS, sugerindo que o exercício físico aeróbio não seja capaz de atenuar essas variáveis, nessa janela temporal. Em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso laboratório, verificamos o mesmo padrão de hipertrofia e congestão pulmonar, e ao mesmo tempo, ausência de modificações nesse parâmetro quando comparamos os animais desses mesmos grupos (Souza-Rabbo, Silva et al. 2008). As alterações morfométricas analisadas não foram observadas na câmara esquerda, fortalecendo a hipótese de que estas alterações nesse período de tempo sejam exclusivas no VD.

Além das alterações morfométricas, notamos outra modificação importante e que nos mostra o grau de comprometimento funcional do VD: o aumento na PDFVD, na PSVD, na dP/dt_{\max} e na dP/dt_{\min} nos animais dos grupos MS e MT. Essas alterações hemodinâmicas provocadas pela HAP, são mostradas na maioria dos estudos que utilizam esse modelo experimental. Em 2009, Falcão-Pires, mostraram que a monocrotalina (60mg/kg), provocou aumento da PSVD, dP/dt_{\max} , dP/dt_{\min} e do τ (constante de tempo em contração isovolumétrica) (Falcao-Pires, Goncalves et al. 2009). Todas as alterações citadas anteriormente (morfométricas e hemodinâmicas) são uma resposta às alterações estruturais da vasculatura pulmonar e do conseqüente aumento da pós-carga imposta ao VD.

Frente à demanda aumentada de energia imposta pela carga ao VD, uma série de modificações bioquímicas são provocadas. A maioria delas influenciando de

alguma forma as modificações estruturais e funcionais cardíacas. Essa sobrecarga de pressão, induzida pelo espessamento da túnica média dos vasos pulmonares, provoca um aumento no estresse de cisalhamento tanto da vasculatura pulmonar quanto dos cardiomiócitos do VD. Esse aumento de tensão sobre as células endoteliais do vaso e dos cardiomiócitos no VD, provocam modificações no metabolismo celular e na sinalização intracelular (Bogaard, Abe et al. 2009).

Essas alterações do metabolismo celular e da sinalização intracelular podem levar essas estruturas às alterações morfométricas e funcionais já discutidas anteriormente. Apesar de pouco conhecido e discutido, alguns mecanismos surgem como prováveis condutores da hipertrofia e disfunção cardíaca. Apesar de bem descrito para o ventrículo esquerdo (VE), em outros modelos de disfunção ventricular, a sinalização intracelular dependente do estado redox ainda não foi estudada no VD. Apesar disso, acreditamos que essa influência seja importante, visto que o ventrículo direito atua sobre baixas pressões impostas pela artéria pulmonar. No momento que essa pressão é aumentada, a fina parede do VD é exposta a um aumento no estresse de parede e na demanda metabólica de oxigênio, fato que pode provocar uma alteração no estado redox nos cardiomiócitos. A principal ERO envolvida nesse processo é o H_2O_2 . Essa molécula exerce sua função sinalizadora devido à sua alta estabilidade e ao seu papel na oxidação de grupamentos tióis de proteínas intracelulares, que quando modificadas por esse processo, podem alterar suas funções e agir fosforilando ou desfosforilando outras proteínas nesse ambiente.

Em estudos do nosso laboratório, a associação entre alterações no estado redox, concentrações de H_2O_2 e sinalização intracelular para a HC foram

detectadas. Araújo, em 2008, mostrou que a HC e o imunocónteuódo da proteína Akt estavam aumentados no mesmo grupo de animais onde as concentrações de peróxido de hidrogênio mostravam uma elevação. As nossas análises mostraram que as concentrações de H₂O₂, após quatro semanas do início do protocolo experimental, estava diminuída nos animais MS. Ao mesmo tempo, os animais MT não mostraram essa diminuição, quando comparados ao seu grupo controle (CT). Nesse caso, sugerimos que no período de análise, a monocrotalina provocou uma queda nas concentrações de peróxido de hidrogênio, fato que não foi obtido no grupo MT. Acreditamos que essa diminuição no H₂O₂ do grupo MS seja devido a uma adaptação no sistema de defesa antioxidante enzimático dos cardiomiócitos, nessa janela temporal. Para confirmar essa hipótese, verificamos o imunocónteuódo da proteína tioredoxina por “Western Blot”. Não visualizamos nenhuma alteração nessa variável após as quatro semanas do início do protocolo experimental. Em contrapartida, em estudo desenvolvido no nosso laboratório, explorando períodos precoces do remodelamento cardíaco, o imunocónteuódo da tioredoxina mostrou-se aumentado 48 horas após o procedimento cirúrgico de infarto agudo do miocárdio (Schenkel et al. 2010).

Dessa forma, como a monocrotalina provocou mudanças nas concentrações de H₂O₂ nesse período de observação, acreditamos que ela pode ter exercido um papel importante sobre alterações na sinalização intracelular, responsáveis por modificações estruturais e funcionais demonstradas nesse trabalho.

A histologia de vasos pulmonares e dos próprios cardiomiócitos normalmente sofrem alterações, dependentes de modificações no imunocónteuódo de proteínas intracelulares. Uma das proteínas relacionadas a esse processo é a GSK-3 β . Essa

proteína pode ser desativada por fosforilação ou manter-se ativada por uma série de outras proteínas intracelulares (McMullen and Jennings 2007). Uma dessas proteínas, a Akt, não mostrou diferenças significativas na relação p-Akt/Akt nos diferentes grupos. Ao mesmo tempo, o grupo MS mostra uma tendência ao aumento dessa mesma variável. A relação p-GSK-3 β /GSK-3 β está aumentada nos animais que receberam a monocrotalina quando comparados aos seus respectivos controles (MS e MT).

Acreditamos que a modificação na relação da p-GSK-3 β /GSK-3 β , possa estar influenciando a HC. Nesse modelo, a HC patológica é caracterizada por um aumento na sinalização para esse evento, conseqüentemente, o aumento na relação dessas proteínas fortalece os indicativos que a HC demonstrada nos grupos MS e MT tenha características de uma hipertrofia patológica (Hardt and Sadoshima 2002; Sudgen et al. 2008). Para auxiliar no fortalecimento dessa hipótese, podemos demonstrar que a monocrotalina provocou alterações na estrutura dos cardiomiócitos. Analisando os cortes histológicos, mostramos que nos animais que receberam a droga, houve um aumento no volume intersticial do VD, quando comparados aos seus respectivos controles (CS e CT). Além disso, nos animais que receberam a monocrotalina e participaram do programa de exercício físico, notamos uma diminuição no volume do interstício, quando comparados aos animais MS. Com isso, podemos sugerir que a monocrotalina provoca um aumento no volume intersticial, e ao mesmo tempo, o treinamento pode influenciar a diminuição desse volume nos animais MT quando comparados aos MS. Utilizando amostras de VE, dados observados no estudo desenvolvido por McMullen e colaboradores, os animais apresentaram um aumento no volume intersticial, e ao mesmo tempo, um aumento excessivo na rede de

colágeno presente na matriz extracelular, na hipertrofia patológica gerada por coartação da aorta abdominal, (McMullen and Jennings 2007). Acreditamos que devido ao aumento do volume intersticial, o acoplamento cardíaco pode estar prejudicado, e isso, conseqüentemente pode ter induzido a piora funcional discutida anteriormente.

Segundo Hardt & Sadoshima (2002), a inibição da GSK-3 β , provocada por sua fosforilação devido a estímulos hipertróficos, afeta os microtúbulos e outras proteínas do citoesqueleto (Hardt and Sadoshima 2002). Além disso, Sudgen e colaboradores mostraram que essa enzima, quando na sua forma inativa, está relacionada com o surgimento da hipertrofia cardíaca (Sudgen et al. 2008). Assim, podemos relacionar a diminuição da relação p-GSK-3 β /GSK-3 β nos animais MT em comparação aos MS, com a diminuição no volume intersticial observada na estereologia do VD. Dessa forma, sugerimos que o exercício capaz seja um mecanismo importante para a diminuição do volume intersticial nesse modelo experimental.

Outra resposta observada no nosso estudo foi a diminuição no volume de vasos quando comparamos os animais MS aos CS. Já quando relacionamos os resultados obtidos no grupo MT aos do grupo MS, notamos que o treinamento teve um papel fundamental para o aumento no volume total de vasos no VD. Como o *Cor pulmonale* é uma síndrome caracterizada por um aumento na espessura da parede ventricular e também uma diminuição na irrigação coronariana, a angiogênese coronariana surge como uma possível alteração benéfica provocada pelo exercício. Em estudos no VE, na doença isquêmica do coração, ratos espontaneamente hipertensos tiveram um aumento de 40% na capilarização, quando comparados aos

ratos sedentários (Ziada AM). Em outro estudo de 2009, Handoko visualizou a mesma resposta: animais que receberam uma dose de monocrotalina e realizaram exercício físico aeróbio aumentaram a densidade capilar quando comparados aos sedentários (Handoko, de Man et al. 2009).

Ao mesmo tempo em que notamos uma alteração estrutural no VD, verificamos uma redução da túnica média da artéria pulmonar nos animais MT quando comparados aos MS. A monocrotalina foi eficiente em induzir uma hipertrofia da túnica média da artéria pulmonar, assim, levando ao acréscimo de pós-carga imposta ao VD. Esse aumento de pós-carga demonstra ser o principal fator para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, observada anteriormente. Entretanto, quando analisamos a espessura da túnica média nos animais MT, notamos que esse valor retornou aos mesmos níveis dos seus animais controle (CT), sugerindo um envolvimento do exercício físico no remodelamento da artéria pulmonar, nesse modelo. Handoko, em 2009, verificou que, quando comparamos os animais que receberam a monocrotalina e praticaram exercício físico (C) com os animais que receberam a droga e são sedentários (D), notamos uma diminuição na espessura da parede da artéria pulmonar nos animais treinados, reforçando a ideia de que o exercício exerce um papel fundamental no remodelamento da artéria pulmonar (Handoko, de Man et al. 2009) (Figura 20).

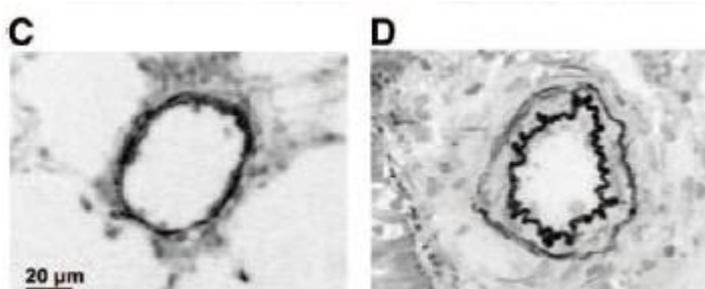


Figura 20. Corte histológico demonstrando um aumento na espessura da túnica média da artéria pulmonar em ratos controle (C) e ratos que receberam a monocrotalina (D) (Handoko, de Man et al. 2009).

Esse aumento na espessura da túnica média nos animais MCT deve-se ao efeito da droga sobre sua estrutura e desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, mecanismo já discutido anteriormente.

Em estudo de Dumitrasco (2008), verificou-se uma alteração estrutural na artéria pulmonar dos animais que receberam a monocrotalina. Nesse estudo, foi observado um aumento no edema intersticial e de infiltrados inflamatórios, reforçando a hipótese de que a monocrotalina provoca uma alteração estrutural e funcional negativa na vasculatura pulmonar, e que o exercício, pode de alguma forma reverter esse quadro (Dumitrascu, Koebrich et al. 2008).

De certa forma, não temos informações suficientes para concluir que essas alterações na vasculatura pulmonar e no VD são dependentes de alterações do estado redox. Evidências afirmam que o remodelamento cardíaco e vascular são influenciados por alterações no estado redox celular e que essas são dependentes de uma concentração ideal de pró-oxidantes. Como já discutido anteriormente, elevações críticas de H_2O_2 podem levar à oxidação de grupamentos tióis de muitas proteínas, o que pode alterar a estrutura de um determinado tecido. Rocic et al (2007) demonstraram que altas ou baixas concentrações de ERO podem exercer efeitos diferentes sobre a formação do endotélio vascular, mecanismo que parece ser idêntico para a angiogênese e para o crescimento colateral das coronárias (Rocic, Kolz et al. 2007). Acredita-se que as diferentes concentrações de ERO

podem influenciar fatores de crescimento, como o VEGF, e assim provocar alterações na estrutura vascular pulmonar e cardíaca.

Ao mesmo tempo que existem diversos estudos mostrando a real importância do estado redox sobre a sinalização celular para a hipertrofia cardíaca e vascular, não podemos concluir que nessa janela temporal um desequilíbrio redox esteja influenciando esses processos. Acreditamos que de alguma forma o sistema de sinalização intracelular no tecido muscular estriado cardíaco seja regulado por pequenas alterações no estado redox, visto que, atuando geralmente com baixas concentrações de H_2O_2 , as alterações nesse quadro podem ser dependentes dessas pequenas modificações na sua concentração. De certa forma sugerimos que, as principais alterações no estado redox do VD, tenham acontecido anteriormente às análises realizadas. Por ser um dos modelos mais agressivos de HAP, acreditamos que as alterações no estado redox tenham acontecido nas primeiras semanas após a injeção de monocrotalina. Essas alterações nas reações de oxidação e redução do oxigênio e nas concentrações das ERO, podem ter influenciado, de certa forma, uma resposta antioxidante enzimática para diminuir o dano potencial que essas moléculas exercem quando em altas concentrações. Rabbo, em 2008, mostrou em estudos no nosso laboratório, que as enzimas catalase e glutathione peroxidase estavam com a sua atividade aumentada na terceira e quarta semana, consecutivamente (Souza-Rabbo, Silva et al. 2008). De acordo com esses dados, não somente o sistema das glutathionas está envolvido com a modicação no estado redox. Outros sistemas de defesa antioxidante podem modular as concentrações do H_2O_2 e assim provocar a diminuição observada dessa variável no grupo MS.

Para relacionar somente o papel do exercício físico sobre as alterações produzidas na morfometria, hemodinâmica e estrutura cardíaca e vascular, montamos o seguinte esquema mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Comparativo Geral entre os Animais MS e MT.

| | |
|---|---------|
| Massa Corporal Final (g) | MS = MT |
| VD/Tíbia (mg/mm) | MS = MT |
| Pulmão P. Úmido/MC (mg/g) | MS = MT |
| PDFVD | MS = MT |
| PSVD | MS = MT |
| dP/dt_{max} | MS = MT |
| dP/dt_{min} | MS = MT |
| H ₂ O ₂ - VD (pmol/mg) | MS = MT |
| GSH/GSSG - VD | MS = MT |
| Volume de Vasos | MS < MT |
| Volume Intersticial | MS > MT |
| Área Transversal Média | MS = MT |
| Espessura da Túnica Média da Artéria Pulmonar | MS > MT |
| p-Akt/Akt-total | MS = MT |
| p-GSK-3 β /GSK-3 β | MS > MT |

Assim, da mesma maneira que não notamos alterações significativas no estado redox nesse período, acreditamos que possíveis modificações anteriores ao momento estudado, possam ter influenciado a resposta observada na relação p-GSK-3 β /GSK-3 β , e conseqüentemente, modular a hipertrofia do VD e as alterações histológicas já discutidas.

7. CONCLUSÃO

Dessa forma, concluímos que existe uma relação direta entre o protocolo de exercício físico utilizado e alterações na estrutura do VD e na artéria pulmonar. O exercício físico foi capaz de modular as alterações promovidas pela monocrotalina, modificando a estrutura cardíaca (volume de vasos, volume intersticial) e diminuindo a espessura da túnica média da artéria pulmonar. Acreditamos que esse remodelamento possa ser modulado por proteínas sinalizadoras influenciadas pelo exercício e pelo estado redox, como foi demonstrado analisando a relação da p-GSK-3 β /GSK-3 β . No entanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na sinalização redox neste modelo de hipertensão arterial pulmonar e o papel do exercício físico neste processo necessitam ser elucidados em estudos subsequentes.

8. PERSPECTIVAS

Para que explorar os mecanismos dos resultados obtidos neste estudo, seria interessante uma análise em diferentes tempos de tratamento, das mesmas variáveis já analisadas. Além disso, pensamos que, uma abordagem de outras proteínas relacionadas à hipertrofia cardíaca e influenciadas pelo estado redox poderia ajudar a diferenciar os tipos de hipertrofia causadas pelo exercício e pela monocrotalina. Assim, proteínas como a ERK1/2 e outras relacionadas a fosforilação da GSK-3 β surgem como uma boa opção de análise.

Ao mesmo tempo, acreditamos que uma verificação mais aprofundada da vasculatura pulmonar pode nos dar subsídios para discutir com maior eficácia a melhora visualizada com o exercício físico. Uma análise do imunoconteúdo das proteínas HIF-1 e VEGF nos vasos pulmonares e no VD poderia explicar o papel do exercício físico sobre o remodelamento nessas estruturas.

A coloração dos cortes histológicos com tricrômico de Masson seria de extrema importância, sendo utilizado como referência como mais um caracterizador de diferenças estruturais nos vasos pulmonares e no VD no modelo de *Cor pulmonale*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerboom, T. P. and H. Sies. Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. **Methods Enzymol** 173: 523-34.1989.

An, J. H. and T. K. Blackwell. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes Dev** 17(15): 1882-93.2003.

Antos, C. L., T. A. McKinsey, et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(2): 907-12.2002.

Badesch, D. B., S. H. Abman, et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest** 131(6): 1917-28.2007.

Barry, S. P., S. M. Davidson, et al. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. **Int J Biochem Cell Biol** 40(10): 2023-39.2008.

Benito, B. and S. Nattel. Exercise training as a treatment for heart failure: potential mechanisms and clinical implications. **J Physiol** 587(Pt 21): 5011-3.2009.

- Bernardo, B. C., K. L. Weeks, et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther** 128(1): 191-227
- Bogaard, H. J., K. Abe, et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest** 135(3): 794-804.2009.
- Buermans, H. P., E. M. Redout, et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. **Physiol Genomics** 21(3): 314-23.2005.
- Cappelli, F., L. Toncelli, et al. Adaptative or maladaptative hypertrophy, different spatial distribution of myocardial contraction. **Clin Physiol Funct Imaging** 30(1): 6-12
- Chaouat, A., R. Naeije, et al. Pulmonary hypertension in COPD. **Eur Respir J** 32(5): 1371-85.2008.
- Chesney, C. F., J. R. Allen, et al. Right ventricular hypertrophy in monocrotaline pyrrole treated rats. **Exp Mol Pathol** 20(2): 257-68.1974.
- Chiarugi, P. Survival or death: the redox paradox. **Antioxid Redox Signal** 11(11): 2651-4.2009.

- Chin, K. M. and L. J. Rubin. Pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol** 51(16): 1527-38.2008.
- Choi, M. H., I. K. Lee, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. **Nature** 435(7040): 347-53.2005.
- Clerk, A. and P. H. Sugden. Inflammation my heart (by p38-MAPK). **Circ Res** 99(5): 455-8.2006.
- Cohn, J. N. Overview of the treatment of heart failure. **Am J Cardiol** 80(11A): 2L-6L.1997.
- Cook, S. A., P. H. Sugden, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. **J Mol Cell Cardiol** 31(8): 1429-34.1999.
- DeBosch, B., I. Treskov, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. **Circulation** 113(17): 2097-104.2006.
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82(1): 47-95.2002.
- Dumitrescu, R., S. Koebrich, et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **BMC Pulm Med** 8: 25.2008.

- Elokda, A. S. and D. H. Nielsen. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil** 14(5): 630-7.2007.
- Elokda, A. S., R. K. Shields, et al. Effects of a maximal graded exercise test on glutathione as a marker of acute oxidative stress. **J Cardiopulm Rehabil** 25(4): 215-9.2005.
- Enright, P. L. The six-minute walk test. **Respir Care** 48(8): 783-5.2003.
- Fagard, R. H. Effect of training on left ventricular structure and functioning of the normotensive and the hypertensive subject. **Blood Press Monit** 2(5): 241-245.1997.
- Falcao-Pires, I., N. Goncalves, et al. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 296(6): H2007-14.2009.
- Farahmand, F., M. F. Hill, et al. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Mol Cell Biochem** 260(1-2): 21-9.2004.
- Galie, N., A. Torbicki, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of

Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. **Eur Heart J** 25(24): 2243-78.2004.

Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest** 115(3): 500-8.2005.

Goldim, J. R., Raimundo, M. M. Pesquisa em saúde e direito dos animais 2° ed. HCPA, Porto Alegre, 2007.

Hancock, J. T. The role of redox mechanisms in cell signalling. **Mol Biotechnol** 43(2): 162-6.2009.

Handoko, M. L., F. S. de Man, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Circulation** 120(1): 42-9.2009.

Hardt, S. E. and J. Sadoshima. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. **Circ Res** 90(10): 1055-63.2002.

Hayakawa, T., A. Matsuzawa, et al. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. **Microbes Infect** 8(4): 1098-107.2006.

Hessel, M. H., P. Steendijk, et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 291(5): H2424-30.2006.

- 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** 281(6): R2029-36.2001.
- Jasmin, J. F., P. Cernacek, et al. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. **Clin Sci (Lond)** 105(6): 647-53.2003.
- Jones, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal** 8(9-10): 1865-79.2006.
- Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **Am J Physiol Cell Physiol** 295(4): C849-68.2008.
- Kamaraju, A. K. and A. B. Roberts. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. **J Biol Chem** 280(2): 1024-36.2005.
- Kim, A. H., G. Khursigara, et al. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. **Mol Cell Biol** 21(3): 893-901.2001.
- Kojda, G., Y. C. Cheng, et al. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. **Circulation** 103(23): 2839-44.2001.

Lalich, J. J. and L. Merkow. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. **Lab Invest** 10: 744-50.1961.

Laskowski, A., O. L. Woodman, et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. **Cardiovasc Res** 72(1): 112-23.2006.

Lehrman, S., P. Romano, et al. Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiol Rev** 10(5): 265-78.2002.

Li, J. M., N. P. Gall, et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension** 40(4): 477-84.2002.

Li, M., D. Georgakopoulos, et al. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. **Circulation** 111(19): 2494-502.2005.

Liao, P., D. Georgakopoulos, et al. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(21): 12283-8.2001.

Ludke, A. R., F. Mosele, et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **J Cardiovasc Pharmacol** 55(1): 89-95

- MacCarthy, P. A. and A. M. Shah. Oxidative stress and heart failure. **Coron Artery Dis** 14(2): 109-13.2003.
- Mann, D. L. and M. R. Bristow. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. **Circulation** 111(21): 2837-49.2005.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell** 129(7): 1261-74.2007.
- Markou, T., T. E. Cullingford, et al. Glycogen synthase kinases 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition. **Cell Signal** 20(1): 206-18.2008.
- McLean, E. K. The toxic actions of pyrrolizidine (senecio) alkaloids. **Pharmacol Rev** 22(4): 429-83.1970.
- McMullen, J. R., F. Amirahmadi, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(2): 612-7.2007.
- McMullen, J. R. and G. L. Jennings. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 34(4): 255-62.2007.

Mereles, D., N. Ehlken, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation** 114(14): 1482-9.2006.

Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J** 417(1): 1-13.2009.

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** 98(8): 794-9.1998.

Pick, E. and Y. Keisari. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods** 38(1-2): 161-70.1980.

Rocic, P., C. Kolz, et al. Optimal reactive oxygen species concentration and p38 MAP kinase are required for coronary collateral growth. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 292(6): H2729-36.2007.

Rodrigues, B., D. M. Figueroa, et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol** 6: 38.2007.

Sablina, A. A., A. V. Budanov, et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nat Med** 11(12): 1306-13.2005.

Sabri, A., H. H. Hughie, et al. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. **Antioxid Redox Signal** 5(6): 731-40.2003.

Schenkel, P. C (2010). Papel do estresse oxidativo na sinalização intracelular durante o remodelamento cardíaco precoce e tardia pós-infarto agudo do miocárdio. Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Seddon, M., Y. H. Looi, et al. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart** 93(8): 903-7.2007.

Singal, P. K., N. Khaper, et al. Oxidative stress in congestive heart failure. **Curr Cardiol Rep** 2(3): 206-11.2000.

Souza-Rabbo, M. P., L. F. Silva, et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 35(8): 944-8.2008.

- Sudgen, P. H. et al. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signaling and a therapeutic target? A critical analysis. **British Journal of Pharmacology** (153): 137-153. 2008.
- Taniike, M., O. Yamaguchi, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. **Circulation** 117(4): 545-52.2008.
- Traverse, J. H., Y. E. Nesmelov, et al. Measurement of myocardial free radical production during exercise using EPR spectroscopy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 290(6): H2453-8.2006.
- Veal, E. A., A. M. Day, et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Mol Cell** 26(1): 1-14.2007.
- Wakatsuki, T., J. Schlessinger, et al. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. **Trends Biochem Sci** 29(11): 609-17.2004.
- Weibel, E. R., G. S. Kistler, et al. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol** 30(1): 23-38.1966.
- Wilson, D. W., H. J. Segall, et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Crit Rev Toxicol** 22(5-6): 307-25.1992.

Yamaguchi, O., Y. Higuchi, et al. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(26): 15883-8.2003.

Yildiz, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clin Chim Acta** 403(1-2): 9-16.2009.

Zhang, J., N. Jin, et al. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 19(2): 324-32.1998.

Zhang, K. R., H. T. Liu, et al. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. **Apoptosis** 12(9): 1579-88.2007.

Ziada AM, H. M., Tahlilkar KI, Inuwa IM. Long-term exercise training and angiotensin-converting enzyme inhibition differentially.