



LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA ROCHA

EFEITOS DO EXERCÍCIO SOBRE O PROTEOMA E ESTRUTURA DE
CARDIOMIÓCITOS DE RATOS HIPERTENSOS E OBESOS.

Brasília, Dezembro de 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA DA UnB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA ROCHA

EFEITOS DO EXERCÍCIO SOBRE O PROTEOMA E ESTRUTURA DE CARDIOMIÓCITOS DE
RATOS HIPERTENSOS E OBESOS.

Orientador: Prof. Dr Octávio Luiz Franco

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Doutor em
Medicina pelo Programa de Pós-
Graduação em Patologia Molecular
da Universidade de Brasília.

Brasília, Dezembro de 2014.

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma, em algum momento de minha vida contribuíram para a realização deste, em especial a minha família: Aline, Júlia, Maria Luiza e Maria Antonia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, esta força suprema que tem muitos nomes em diferentes religiões mas que simboliza uma única ação: amor e respeito a todos.

A meus pais, Francisco e Tereza que com sua verdade, dedicação e apoio incondicional sempre me serviram e servirão de exemplo.

A Aline Candiota, minha esposa, companheira e "grande amor da minha vida", por sua paciência e perseverança, mesmos nos momentos em que eu mesmo duvidava do caminho a ser seguido, sempre soube se fazer, silenciosamente, presente.

A minhas filhas Júlia, Maria Luiza e Maria Antonia, por materializarem o verdadeiro motivo de viver.

A Ruth Candiota por estar presente em todos os momentos que precisamos.

Ao meu orientador, Octávio Luiz Franco, que no sentido estrito da palavra me orientou pelos caminhos, as vezes tortuosos, do saber e hoje (aliás, há muito tempo) é mais que um grande amigo.

Aos amigos e parceiros Dr. Ludovico Migliolo e Kleber Oliveira pela inestimável ajuda na cromatografia e espectrometria de massa.

Aos amigos Raul, Glauce, Marcelo, Dani, Flávio, Dardânia, Erick, Ana, Vladmir, Daniela, Jorge, Virgínia, Hélio, Gabi, Manuel, Patrícia, Amilcar, Ana Cláudia e tantos outros, pelos momentos de alegria e lazer que serviram de fuga das preocupações, atrasos e "quebras de equipamentos" pelo caminho.

A todo o pessoal do CAPB pelos momentos inesquecíveis de ciência e grandes risadas

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica.

EPÍGRAFE

Invictus

*Out of the night that covers me,
Black as the Pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance,
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeoning of chance,
my head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds, and shall find, me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll.
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.*

William Ernest Henley

RESUMO

O exercício regular apresenta-se como um importante fator de implemento de saúde. A implementação de protocolos de avaliação e consequente prescrição do exercício mais eficiente é fundamental para seu uso como tratamento não medicamentoso. Neste escopo identificamos a MFEL em animais Zucker obesos, 12,5 m.min⁻¹ a uma concentração de lactato de 3,9 (± 0.3 mmol.L⁻¹). Este resultado é significativamente menor do que o encontrado em modelos não obesos, 20 m.min⁻¹ com idêntica concentração de lactato 3.9 (± 0.2 mmol.L⁻¹). Outro aspecto relevante à saúde consiste na implementação de uma maior capacidade circulatória. Esta melhoria deve-se a inúmeros fatores incluindo a hipertrofia do miócito cardíaco, considerada como o processo adaptativo mais importante para o coração em decorrência do exercício físico por estar diretamente relacionada ao desenvolvimento da força contrátil no miócito cardíaco e o aumento da capacidade oxidativa de síntese de ATP. Aqui foram descritas, utilizando eletroforese bidimensional, adaptações significativas em decorrência do exercício de alta intensidade , incluindo um aumento de 1,2 vezes na expressão de cadeia pesada de α -miosina cardíaca nos animais que foram submetidos a exercício quando comparados ao controle sedentário. Com o intuito de comprovar este aumento, foi realizada uma PCR em tempo real que demonstrou um aumento de 8,48 vezes para este mesmo grupo. Adicionalmente foram encontradas modificações na expressão de outras proteínas de alta massa molecular como a troponina bem como MRS2 e NADH desidrogenase, ambas envolvidas em vias metabólicas mitocondriais. Apesar disto, há muito se sabe que o papel mitocondrial não se resume somente a esta capacidade, podendo estar também associado a diversas respostas tais como a apoptose celular. Com este objetivo o extrato

mitocondrial do ventrículo esquerdo foi preparado foi analisado utilizando LC-MS/MS levando a identificação de 143 proteínas em todos os grupos. Posteriores análises mostraram uma considerável diminuição na expressão de proteínas do complexo I e VDAC1 acompanhada de um concomitante aumento na expressão da e ATP sintase, citocromo c oxidase, álcool desidrogenase e NADH-ubiquinona desidrogenase em grupos exercitados. Este fato sugere que o exercício induz uma adaptação benéfica em mitocôndrias do ventrículo esquerdo a fim de atenuar os efeitos deletérios da hipertensão arterial.

Palavras Chave: Exercício, Hipertensão arterial; mitocôndrias; MFEL; Proteômica

ABSTRACT

Regular exercise is presented as an important factor of health improvement. The implementation of assessment protocols and consequent prescription of more efficient exercise is essential for exercise utilization as a non-pharmacological treatment. With this aim, the MLSS was identified in obese Zucker animals at $12.5 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ with a lactate concentration of $3.9 (\pm 0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$. This result was significantly lower than found in non-obese models, $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ with the same lactate concentration $3.9 (\pm 0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$. Another important aspect of health improvement consist in circulatory capability enhancement. This increase can occur by many factors including cardiac myocyte hypertrophy, being considered the most important heart adaptive process resulted from exercise, since it was directly related cardiac cells contractile force development and on ATP synthesis oxidative capacity increase. Here were described, by using two-dimensional electrophoresis, significant adjustments resulting from high-intensity exercise, including a 1.2-fold expression increase of cardiac α -myosin heavy chain compared to sedentary control. In order to confirm this increase, a real-time PCR was performed demonstrating an increase of 8.48 times. Additionally the detection of modification in expression of others high molecular mass proteins were observed such as troponin as well MRS2 and NADH dehydrogenase, being both involved in mitochondrial metabolic pathways. In spite of this fact, is it known that the mitochondrial role is not limited only by such ability being also associated to various cellular responses such as apoptosis. With this aim, mitochondria from left ventricle heart were prepared and further analyzed by using LC-MS / MS leading to identification of 143

proteins in all groups. Further analysis showed a significant decrease in complex I and VDAC1 expression and an increase ATP synthase of cytochrome c oxidase, alcohol dehydrogenase and NADH-ubiquinone dehydrogenase expression in both exercise groups. Those data suggest that exercise may induce a beneficial adaptation in left ventricular mitochondria in order to mitigate the deleterious hypertension effects.

Key words: Exercise; Hypertension; mitochondria MSSL; Proteomics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Organização esquemática dos tipos de hipertrofia cardíaca.	26
Figura 02. Animal apresentando síndrome metabólica Zucker (fa/fa).	30
Figura 03. Animal SHR (<i>Spontaneous Hypertensive Rat</i>)	32
Figura 04. Figura esquemática de uma mitocôndria.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV – Doenças cardiovasculares
HA – Hipertensão arterial
SUS – Sistema Único de Saúde
ERO's – Espécies reativas de oxigênio
PA – Pressão arterial
IC – Insuficiência cardíaca
AP – Aldosteronismo primário
ADN - Ácido desoxirribonucléico
ARN - Ácido ribonucléico
VE – Ventrículo esquerdo
HEVE – Hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo
HCVE - Hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo
SM – Síndrome metabólica
DM2 – Diabetes melito tipo 2
SHR – *Spontaneous hypertensive rats*
SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona
ECA – Enzima de conversão da angiotensina
ON – Óxido nítrico
VDAC – *Voltage-dependent anion channel*
RE – Reticulo endoplasmático
PTM – Poros de transição de membrana
PMF – *Peptide Mass Fingerprint*
BN-PAGE – *Blue Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis*
TCA – Tricarboxilic cycle
CASQ2 – Calsequestrina 2
CPVT – Taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica
SOD – Superóxido desmutase
GSHP – Glutadiona peroxidase
SSM – Subsarcolemais
IMF – Inframiofibrilares
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
MHC - *Myosin Heavy Chain*
MLC - *Myosin Light Chain*
ZDF – Ratos Zucker
MFEL – Máxima fase estável de lactate
DAC – Doença arterial coronariana
OA – Osteoartrose
Lan – Limiar anaeróbico
FMN – Mononucleotídeo de flavina
Fe-S - Ferro enxofre
CTE – Cadeia de transporte de elétrons
PTPM ou PTM - Poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

Capa	i
Folha de rosto	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Epígrafe	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de ilustrações	x
Lista de abreviaturas	xi
Sumário	xii
Introdução	15
Revisão da literatura	19
Hipertensão Arterial	19
Obesidade	25
Hipertrofia do miocárdio	27
Hipertensão arterial e insuficiência cardíaca em modelos animais	31
Ratos Zucker	31
Ratos SHR	33
A mitocôndria e sua influência no desenvolvimento da HA.	37
Proteômica mitocondrial	43
Intervenção do exercício no tratamento não medicamentoso da HA.	50
Efeitos do exercício sobre mitocôndrias do miócito cardíaco	55
Justificativa	59
Objetivo Geral	60
Objetivos específicos	62

Discussão	62
Conclusões	81
Bibliografia	83
Anexos	100

Artigo # 1 Determination of the Maximal Lactate Steady State in Obese Zucker Rats

Artigo # 2 High molecular mass proteomics analyses of left ventricle from rats subjected to differential swimming training.

Artigo # 3 Effect of moderate exercise on mitochondrial proteome in heart tissue of hypertensive models

Artigo #4 Proteomics Applied to Exercise Physiology: A Cutting-Edge Technology

Artigo #5 Mitochondrial Proteomics: From Structure to Function
Carta de aprovação do CEUA

Apesar dos impressionantes avanços na área da terapêutica, as doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser uma das principais causas de morte ainda no século 21 e a hipertensão pode ser considerada o principal fator de risco isolado a DCV (Go et al., 2014). Com uma prevalência de cerca de 30% em todo o mundo, a hipertensão arterial (HA) aumenta cinco vezes o risco de sofrer um acidente vascular cerebral debilitante (Doumas et al., 2014). Estima-se em cerca de 70.000.000 a prevalência de hipertensão somente nos Estados Unidos da América (Ritter & Neyses, 2003). Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) sinalizam que a hipertensão arterial corresponde a 80% do atendimento médico da população brasileira e mostram que as doenças cardiovasculares são a terceira maior causa de internação após os 60 anos (Jorge, 2011).

A HA consiste em um problema de saúde em todo o mundo, devido à sua alta prevalência e associação com o aumento da morbidade e mortalidade. A HA consiste em um fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular e é uma das principais causas de doença renal em estágio terminal acometendo 7,1 milhões de mortes por ano que podem ser diretamente atribuídos à falta de controle da pressão arterial (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). Além disso, a HA constitui-se no fator de risco mais importante para as doenças cardiovasculares tais como acidente vascular cerebral e enfarte do miocárdio (Raftopoulos et al., 2014). A hipertensão arterial é também um importante fator de risco para doença renal crônica, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca congestiva, além de encefalopatia, retinopatia, insuficiência aguda descompensada cardíaca congestiva, dissecação aórtica e renal aguda (Vaughan & Delanty, 2000). Ainda segundo os mesmos autores, vale ressaltar que a HA é geralmente assintomática até o surgimento das complicações.

Modificações no estilo de vida são geralmente benéficas na redução de vários fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo a HA. Embora as modificações sustentadas na dieta e estilo de vida saudável sejam difíceis de conseguir, "por parte do paciente" sua utilização como opção de tratamento não medicamentoso tem sido amplamente descrita na literatura atual. De um modo geral a abordagem para todos os doentes inclui a perda de peso para o paciente com excesso de peso, a atividade física regular, moderação do consumo de álcool, a modificação da ingestão de sódio e gordura, aumento nos valores dietéticos de cálcio, potássio, magnésio, vitaminas e fibras bem como a cessação do tabagismo. Em pacientes bem motivados a mudança no estilo de vida pode ser mais importante do que a escolha inicial do medicamento anti-hipertensivo (Carretero & Oparil, 2000b).

Neste sentido, o exercício físico tem sido descrito como um importante fator no auxílio na redução da pressão arterial bem como no tratamento e controle da obesidade o que por sua vez incide na melhoria da tolerância à glicose e do perfil lipídico (van Heerebeek et al., 2008, Bórbely et al., 2009; McKinsey and Olson, 2005). A compreensão da associação do stress provocado pelo exercício e os eventos moleculares relacionados à HA parecem ser um importante caminho ao tratamento, visto que esta associação parece ser um consenso de terapia não medicamentosa apesar de permanecer pouco explorado com um reduzido número de trabalhos na literatura atual.

Numerosos fatores têm sido implicados na fisiopatologia de hipertensão, como a ativação do sistema nervoso simpático, regulação positiva do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Zubcevic et al., 2011). Além disto, evidências recentes sugerem que fatores cito imunocitários, especialmente a função das células T alterada, também desempenham um papel no desenvolvimento de hipertensão (Muller, Kvakan & Luft, 2011) e que, a elevada biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ERO's), é o ponto comum a todos estes processos (Montezano & Touys, 2012).

A relação entre as ERO's e a hipertensão foi sugerida pela primeira vez por Romanowskia,

Murray e Huston (1960), mas foi só a partir da década de 1990 que esta associação tem sido investigada de modo mais profundo. Desde então, o interesse crescente no estudo do comportamento mitocondrial e sua relação com a hipertensão é evidenciado pelo número crescente de publicações na área (Montezano & Touys, 2012).

Neste escopo a proteômica tem se mostrado um importante aliado no estudo dos processos biológicos. (van Lieshout et al., 2010). Assim o estudo das diferentes combinações que formam o repertório de proteínas dentro do organismo, mais especificamente nas mitocôndrias do miócito cardíaco, torna-se um mecanismo de grande valor pela possibilidade de prover respostas que poderão auxiliar na compreensão dos efeitos do exercício sobre a hipertensão arterial. A análise proteômica fornece a possibilidade de compreender a fisiopatologia da doença oferecendo não só uma visão global do comportamento da mesma, mas também, a chance de entender a especificidade das interações moleculares permitindo ainda o desenvolvimento de novos candidatos a marcadores tanto para o diagnóstico quanto para o próprio tratamento da doença em seu contexto biológico.

2.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) consiste em uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). A HA pode estar associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais sendo considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). A mortalidade causada por doenças cardiovasculares aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2006).

A HA tem sido considerada uma das principais causas de morbidade e co-morbidade de uma série de doenças do coração tais como o infarto, acidente vascular cerebral e a insuficiência cardíaca (IC), (Carretero & Oparil, 2000a). Embora a hipertensão arterial seja facilmente diagnosticada e tratada, a mesma tem sido comumente relegada a um plano secundário apesar de sua prevalência aumentar o risco da IC de duas a três vezes tornando-se responsável por cerca de 30 % dos casos registrados de IC (Muntner et al., 2010).

A HA pode ser classificada como secundária, responsável por 5% dos casos, quando se origina de distúrbios pré-existentes tais como doenças renais, aldosteronismo ou formas mendelianas da hipertensão, e essencial (também conhecida como primária ou idiopática) responsável por 95% dos casos, quando não coexistem as chamadas causas secundárias (Carretero & Oparil, 2000a). Segundo Elliott, Weir & Black, (2000) o diagnóstico da hipertensão, que pode ser feito a partir de no mínimo duas medições em pelo menos duas visitas subsequentes, é de 90 mmHg para diastólica e 140 mmHg para sistólica.

Sua prevalência, aparentemente, é maior em negros e homens, embora a menopausa apresente

uma tendência a abolir essa diferença (Whelton et al., 2002). Além disso, o mesmo autor cita ainda que o status socioeconômico, que consiste em um indicador do estilo de vida, parece também influenciar a presença da mesma, visto que, hábitos alimentares e o sedentarismo podem ser atributos associados a HA. Para Wilkins et al. (2010) sua prevalência é quase idêntica entre homens (19,7%) e mulheres (19,0%) e aumenta com a idade, de 2% de 20 a 39 anos de idade e 53% dos 60-79 anos. Além disso, a HA consiste em um transtorno heterogêneo, cujas causas não são plenamente conhecidas. A influência genética na HA tem sido sugerida por estudos que demonstram associações da PA entre irmãos e entre pais e filhos (25%) e gêmeos idênticos (65%). Além disso, fatores genéticos (e ambientais) parecem influenciar padrões de comportamento que podem levar a uma tendência à obesidade ou alcoolismo (Carretero & Oparil, 2000a).

A herdabilidade dos níveis de elevados níveis pressóricos tem sido estimada de 30% a 60% dos casos de HA. Vários genes com grandes efeitos foram identificados em formas familiares de hipertensão, incluindo o aumento da sensibilidade ao sódio. No entanto, estes parecem representar um papel relativamente pequeno em relação à população em geral (Taal et al., 2012). Mutações em pelo menos 10 genes têm sido mostradas como influentes no comportamento pressórico através de um caminho comum: o controle da reabsorção de sal e água pelos rins. Nestas mutações monogênicas raras (mendelianas) um único gene é o causador de grandes alterações no valor da pressão arterial como a síndrome glicocorticoide remediável ou aldosteronismo. A síndrome de Liddle e a síndrome de aparente excesso de mineralocorticoide parecem ser as formas mais importantes de elevação da PA (Lifton, 1996). Exemplos destas anormalidades são: 1) a doença de Liddle, devida a mutações nos genes que codificam a subunidade beta e gama dos canais de sódio das células do nefron, aumentando a reabsorção de sódio; 2) o hiperaldosteronismo reversível por glicocorticoide, devido à fusão de dois genes adjacentes do citocromo P450 produzindo uma aldosterona-sintase funcional, sob o controle do ACTH; 3) o excesso aparente de mineralocorticoide, devido à mutação do gene da 11-betahidroxiesteróide desidrogenase tipo 2, com perda de sua função inativadora do cortisol,

levando a um aumento de mineralocorticoide intracelular. Todas são formas familiares de hipertensão arterial com renina baixa e hipocalcemia, de início precoce.

Dentre estes, o aldosteronismo primário (AP) é um grupo heterogêneo de distúrbios, caracterizado pela secreção da aldosterona e concomitante inadequada supressão do seu principal regulador fisiológico, o sistema renina-angiotensina (Monticone et al., 2014). O aldosteronismo tem sido descrito como uma forma monogênica autossômica dominante da HA na qual o controle da secreção da aldosterona, regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico, pode ser modificada por um gene quimérico descrito nos anos 90. Este, por sua vez, provoca a diminuição da concentração de renina e aumento da concentração de aldosterona plasmática, responsável pela alcalose metabólica com hipocalcemia e aumento do volume plasmático (Lifton, 1996).

Nos últimos anos com a utilização de testes de fácil aplicação e manejo observou-se que o aldosteronismo é a forma mais comum de hipertensão secundária (Monticone et al., 2014). Do mesmo modo diversos estudos têm demonstrado extensivamente o papel prejudicial da aldosterona no sistema cardiovascular resultando em uma maior taxa de danos em órgãos-alvo bem como síndrome metabólica em comparação com indivíduos com HA essencial com perfis pressóricos semelhantes (Mulatero et al, 2013; Savard et al., 2013). Aproximadamente 70% dos casos de HA são causados por hiperaldosteronismo de origem idiopática, enquanto os restantes 30% ocorrem principalmente devido a adenomas na glandula adrenal e alguns subtipos raros como a hiperplasia adrenal unilateral e carcinomas adrenal (Else et al., 2014). Até pouco tempo, o único subtipo de AP cujas bases moleculares eram claramente entendidas era o FH-I (ou aldosteronismo remediável glicocorticóide) uma forma de hipertensão monogênica transmitida como uma herança autossômica dominante. A produção inadequada de aldosterona pode ser causada por um gene híbrido que codifica a aldosterona sintase (Lifton, 1996) cujas principais características clínicas são a secreção de aldosterona ACTH-dependente, supressão de renina e altos níveis de esteróides híbridos 18

hidrocortisol e 18-oxocortisol (Mulatero et al., 2004). Até recentemente, os estudos sobre AP estavam centrados principalmente em variantes genéticas que poderiam potencializar a susceptibilidade para desenvolvê-lo ou afectar o fenótipo clínico. Três principais polimorfismos no gene CYP11B2 foram identificados: c.344C>T a substituição do promotor da região; conversão de um intron do gene CYP11B2 em substituição da região correspondente de CYP11B1; uma única substituição de nucleótidos no códon 173 (c.518A>L) que conduz a uma substituição de uma arginina por uma lisina (Mulatero et al., 2004). Recentemente, polimorfismos em outros genes como KCNJ5 e HSD3 β têm sido associados a AP. Finalmente, os polimorfismos em α -aducina (p.G460W) e do receptor B2 da bradicinina (p.C58T) afetam a pressão arterial em pacientes com AH presumivelmente devido as seus efeitos sobre o sódio renal (Mulatero et al., 2004).

A síndrome de Liddle também pode ser considerada uma forma monogênica autossômica dominante que resulta de mutações no canal de sódio do epitélio renal, como resultado da eliminação de 45 a 75 aminoácidos na extremidade carboxi-terminal das subunidades “b” ou “g”, o que leva a um aumento da atividade do canal. Pode ser caracterizada pelo o início precoce da hipertensão com hipocalcemia e supressão de atividade da renina plasmática e da aldosterona, o que a diferencia do aldosteronismo (Carretero & Oparil, 2000a). Nos últimos anos um grande número de estudos tem se concentrado na busca de possíveis mecanismos moleculares que possam alterar geneticamente uma via específica usando qualquer gene ou associação de genes como possíveis candidatos (Martinez-Aguayo & Fardella, 2009). Entretanto, nos dias de hoje é consensual que uma abordagem simples baseada em uma seqüência gênica só pode explicar parcialmente o envolvimento do genoma na patogênese da HA, que deve ser considerada a partir de um ponto de vista mais amplo, que envolve mecanismos epigenéticos que, apesar de sua herdabilidade, são potencialmente modificáveis por fatores ambientais (Wang & Snieder, 2010). A este respeito, o papel dos vários mecanismos epigenéticos na regulação da expressão gênica emerge como um importante passo na

direção da compreensão do desenvolvimento HA, dando luz a um papel mais articulado de mecanismos hereditários da gênese da doença não apenas relacionada a um único gene ou uma a sequência genética (Liang et al., 2013).

Além destes mecanismos, a metilação no ADN pode ser considerada a principal característica epigenética em células de mamíferos. Esta consiste na ligação covalente de um grupo metil na posição 5 de uma citosina que ocorre principalmente dentro do dinucleotídeo CpG (Liang et al., 2013). A disponibilidade de grupos metil depende da quantidade de S-adenosilmetionina. O metil é doador universal, necessário para a função de metiltransferases específicas para reações de metilação, incluindo o de ADN e ARN, e aqueles que ocorrem na cauda da histona. O produto final de reações catalisadas por metiltransferases é S-adenosilhomocisteína, que pode ser também um potente inibidor da atividade da enzima metiltransferase (Bernstein, Meissner & Lander, 2007).

Poucos estudos avaliaram a metilação padrão do ADN e sua implicação na HA, muito embora, o interesse sobre o papel genético nas doenças cardiovasculares, incluindo a HA, tenha aumentado (Friso et al., 2014). Considerando a importância dos mineralocorticóides e glicocorticóides tais como a aldosterona e cortisol no aparecimento e progressão da HA, usando uma abordagem do gene-alvo, a atenção tem sido dedicada aos receptores de mineralocorticóides. Um interesse especial tem sido dedicado a 11-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 2, cuja função consiste em catalisar a desidrogenação de 11 beta-hydroxiglicocorticoide para 11 keto-esteróides usando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como cofator (Ferrari, 2000). Esta enzima catalisa a sua inativação do cortisol em cortisona. A perda da atividade da 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2 pode levar a competição pelo sítio de ligação dos receptores de mineralocorticóides pelo cortisol o que provoca um aumento sensível na reabsorção renal de sódio, que por sua vez, resulta em aumento na pressão arterial.

2.2 Obesidade

A obesidade que, devido a sua alta incidência e prevalência pode ser hoje, considerada um importante problema de saúde pública em países industrializados atingindo proporções epidêmicas, especialmente a obesidade abdominal, apresenta uma alta correlação com HA sendo considerado o principal fator acessório associado a ela. O sobrepeso e a obesidade são a segunda principal causa evitável de morte nos Estados Unidos e em breve poderão ultrapassar o tabagismo como a principal causa evitável de morte (Surya et al., 2009). Estima-se que um ganho de peso de 10% seja responsável por um aumento de cerca de 6 mm. Hg⁻¹ na pressão arterial sistólica (Ashley & Kannel *apud* Carretero & Oparil, 2000b), sendo também causa de aumento na resistência insulínica e diabete principalmente em indivíduos adultos, junto com a hipertrofia ventricular esquerda, hiperlipidemia e doença aterosclerótica (Noda et al., 2012).

A obesidade tem sido caracterizada pela várias anormalidades hemodinâmicas e metabólicas, incluindo um aumento no volume de sangue circulante e da resistência vascular sistêmica, que contribuem para o desenvolvimento da HA, combinando volume e sobrecarga sanguínea (Rahmouni et al., 2004). Tipicamente, através HA o aumento da resistência arterial periférica/pós-carga leva ao espessamento da parede ventricular sem dilatação da câmara, o que tem sido classificado como remodelamento concêntrico ou como hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (VE). Por outro lado, a obesidade com elevado volume de sangue circulante leva a um aumento da massa do VE via dilatação da câmara sem um aumento significativo da espessura da parede, um processo que pode ser referido como hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo (HEVE) (Milani et al., 2006). Os mesmos autores demonstraram que a padrões geométricos anormais no VE em pacientes obesos apresentaram uma correlação direta com a HA. Aumentos de 10 kg de peso corporal foram associados a um aumento de 3 e 2,3mmHg, respectivamente, na pressão arterial sistólica e diastólica o que traduz um risco aumentado de 24% no risco de infarto.

Apesar disto, estudos em populações hipertensas sugeriram que as situações extremas de

obesidade e magreza apresentam prognósticos semelhantes de morte (Stamler, Ford & Stamler, 1991; Wassertheil-Smoller et al., 2000; Uretsky et al, 2007). Estes estudos sugerem que embora obesidade seja um fator de risco para a HA e HEVE, pacientes hipertensos obesos têm um melhores prognostico que pacientes muito magros. Tem sido postulado que menor resistência vascular sistêmica e menor atividade da renina plasmática em pacientes hipertensos obesos em comparação a pacientes hipertensos mais magros podem explicar isto, ao menos em parte.

A relação entre HA e a obesidade pode não ser restrita somente a obesos mórbidos, mas pode ser contínua ao longo de toda a gama de sobrepeso corporal e apresenta uma associação direta desde a infância à idade adulta (Park et al., 2013). Entretanto, o mecanismo pelo qual a obesidade provoca incrementos na PA não foi ainda totalmente entendido. Sugere-se que o aumento volume corporal parece estar associado ao aumento no volume plasmático e do débito cardíaco. A associação com HA reside no fato de que, quando ambos são reduzidos pela perda de peso, tanto em indivíduos normotensos quanto hipertensos, ocorre um decréscimo da PA (Rocchini et al., 1989).

2.3 Hipertrofia do miocárdio

Vários estudos têm descrito a contribuição das várias alterações responsáveis pelo decréscimo da capacidade circulatória do coração, dentre elas: a reprogramação genética, que se assemelha ao perfil do coração encontrado durante o desenvolvimento fetal, promovendo a hipertrofia basolateral e concomitante ativação das vias de sinalização intracelular que conduzem a disfunção mitocondrial; alterações da arquitetura sarcomérica; modificação das concentrações de cálcio no meio intracelular; aumento da vulnerabilidade celular levando a necrose ou apoptose celular; aumento da matriz extracelular; redução de capilarização; isquemia; disritmia e, principalmente, disfunção hemodinâmica (sistólica ou diastólica) (Lips

et al., 2003).

A hipertrofia cardíaca pode ser definida como um mecanismo de adaptação, em resposta a diversos estímulos como o aumento do débito cardíaco decorrente da necessidade metabólica imposta pelo exercício físico; anemias e fistulas arteriovenosas; aumento da carga pressórica ou de volume que pode ocorrer em função da hipertensão arterial e ainda, de modo idiopático, mesmo quando não existem sobrecargas significativas e por mecanismos intrínsecos de natureza genética (Mill & Vassallo, 2001).

O processo de hipertrofia dos cardiomiócitos provavelmente permite o aumento basolateral do ventrículo sem, no entanto, modificar a relação do conteúdo celular, como por exemplo, o número de mitocôndrias pré-existente. (Lips et al., 2003). Os miócitos cardíacos apresentam dois tipos de crescimento sendo o um pela adição de sarcômeros em série e outro em paralelo. A adição de sarcômeros, em série, permite que a célula aumente de comprimento, ocorrência principal nas hipertrofias excêntricas e, a adição em paralelo, aumenta a secção transversa das células, ocorrência principal nas hipertrofias concêntricas (Figura 1) (Russel et al., 2000 *apud* Mill & Vassallo, 2001).

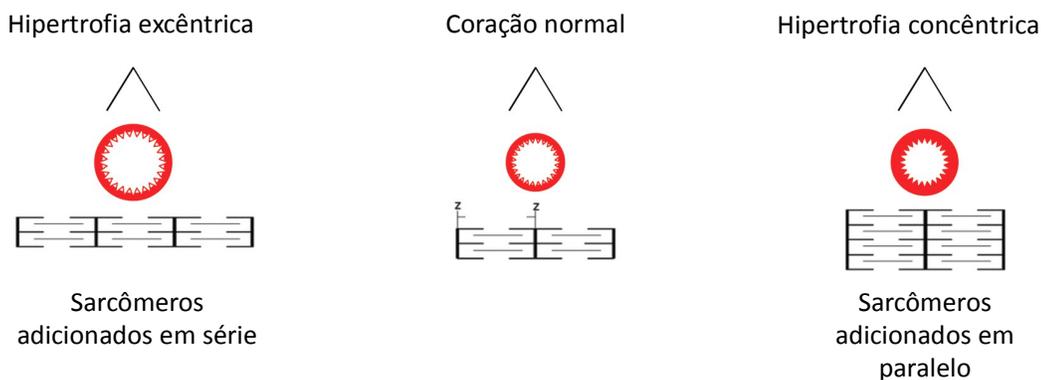


Figura 01. Organização esquemática dos tipos de hipertrofia cardíaca.

Os estímulos que incidem na adaptação morfológica nos miócitos cardíacos podem ser divididos em dois tipos: extrínsecos, causados, por exemplo, pela HA que provoca a hipertrofia concêntrica caracterizada por espessamento das paredes miocárdio sem uma significativa dilatação cavitária ou a anemia, responsável pela hipertrofia excêntrica como resposta ao aumento da sobrecarga volêmica sobre o ventrículo esquerdo que, por sua vez, provoca espessamento das paredes em conjunto com o aumento do diâmetro da cavidade (Lorell & Carabello, 2000); estímulos intrínsecos envolvem mutações genéticas que codificam proteínas sarcoméricas contráteis ou em genes que codificam componentes do citoesqueleto celular bem como genes que são responsáveis por proteínas mitocondriais, associados a alterações e metabólicas (Bauml & Underwood, 2010).

Assim, em consequência de processos patológicos como a HA, acontece a chamada hipertrofia compensatória ventricular esquerda (HCVE) que, acompanhada da redução do volume ejeção pode promover a ativação de mecanismos compensatórios que podem induzir a remodelação da câmara ventricular podendo evoluir à congestão pulmonar e edema periférico (Chen et al., 2012). Vale ressaltar que os fibroblastos representam cerca de 70% do número total de células no coração, influenciando diretamente, a complacência da parede ventricular o que pode em alguns casos, provocar uma maior dificuldade no processo de relaxamento do miocárdio, levando ao aparecimento da insuficiência diastólica (Eghbali et al., 1991, Funck et al., 1997).

Em outras hipertrofias, como a provocada pelo exercício, as características do estroma celular não se alteram e, conseqüentemente, não ocorre prejuízo funcional (Mill & Vassallo, 2001). A HCVE consiste em um dos fatores predisponentes a IC associados à hipertensão arterial sendo considerado um poderoso preditor independente de morbidade e mortalidade cardiovascular (Gosse, 2005). A HCVE induzida pela hipertensão arterial tem sido caracterizada pelo aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo em função da pós-carga determinada pela maior resistência à abertura da valva aórtica em decorrência da

maior pressão arterial. Enquanto a prevalência de HCVE aumenta com a gravidade da hipertensão, outros fatores podem contribuir para a manutenção deste estado tais como o aumento da descarga simpática e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Andersson et al., 2012).

A atual concepção afirma que o coração pode ser capaz de aumentar sua eficiência hemodinâmica por meio do crescimento dos cardiomiócitos, assim a hipertrofia cardíaca pode ser descrita como o aumento da massa miocárdica em decorrência do esforço, no caso da IC, com o objetivo de aliviar a elevação no estresse cavitário (Lips et al., 2003). De acordo com a Lei Laplace, que diz que o estresse na parede do ventrículo pode ser diretamente proporcional ao raio cavitário e à pressão intracavitária, enquanto é inversamente proporcional à espessura desta parede, o estresse na parede ventricular provocado pelo pós-carga estimula a hipertrofia cavitária na tentativa de reduzir o estresse de parede (Mill and Vassallo, 2001).

2.4 Hipertensão arterial e insuficiência cardíaca em modelos animais

2.4.1 Ratos Zucker

A síndrome metabólica (SM) é definida como a coexistência de obesidade visceral, dislipidemia, hiperglicemia, hipertensão (Alberti, Zimmet & Shaw, 2005; Alberti et al., 2009) estando bem

estabelecido na literatura atual como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (Malik et al., 2010). Além disso, a SM pode ser considerada um estado precursor direto do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Grundy, 2012) afetando grande parte da população mundial de todas as idades, desde crianças a idosos de ambos os sexos (Cameron, Shaw & Zimmet, 2004).

Ratos Zucker (Figura 02) são amplamente investigados e estão entre os melhores modelos para o estudo da SM, pois possuem uma mutação no receptor de leptina (fa/fa), um peptídeo sintetizado nos adipócitos associado à sensação de saciedade bem como a super expressão de grelina outro peptídeo associado à sensação de fome. Estes animais já apresentam obesidade na idade de 3-5 semanas e em aproximadamente 14 semanas aproximadamente 40% de sua massa corporal total já é gordura (Mendizábal, Lorens & Nava, 2013). Sua mutação foi descoberta em 1961 por Zucker & Zucker, conduzindo a um modelo recessivo mendeliano que leva estes animais além da obesidade a hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Kava, Greenwood & Johnson, 1991).

Este modelo também tem sido muito utilizado no estudo do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), pois o fenótipo expresso é muito semelhante aos dos seres humanos. Nestes roedores,



Figura 02. Animal apresentando síndrome metabólica Zucker (fa/fa).

a intolerância à glicose geralmente se desenvolve por volta de oito semanas de idade, seguida por hiperglicemia ostensiva até 12 semanas (Király et al., 2007). Em estudo recente Sárközy et al., (2013) descreveu a diminuição da expressão de genes relacionados a síntese de proteínas da membrana da matriz mitocondrial do miócito cardíaco (ATPase Na^+/K^+) em comparação ao controle não sindrômico de ratos. Além disso, os mesmos autores citam ainda uma a regulação negativa de componentes da matriz celular como a miosina IXA, colágeno tipo XXIV e aumento na regulação da espectrina β -3 e agrecano 1. Takatsu et al. (2013) descrevem um aumento no estresse oxidativo no rato Zucker com um aumento da expressão das subunidades da NADPH-oxidase que desempenham um papel central na disfunção endotelial sugerindo que este aumento pode ser associado à obesidade nestes modelos de SM.

Em outro estudo, analisando o comportamento mitocondrial, foi demonstrado uma significativa diminuição na via apoptótica após 12 semanas de treinamento físico, com aumento de uma resposta anti-apoptótica pelo aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bax/Bcl-2, caspase 9 e 3 quando comparado com o grupo de obesos sedentários (Lee et al., 2013). Os mesmos autores sugerem que o aumento das vias apoptóticas pode estar associado à obesidade e o exercício altera este comportamento pela modificação do fenótipo da obesidade no miócito cardíaco.

2.4.2 Ratos SHR

A causa mais comum da hipertensão arterial em seres humanos consiste na chamada hipertensão essencial (Carretero & Oparil, 2000a). Sua causa pode ser uma composição de múltiplos genes, cada qual com efeito alélico e penetrância distintos. Deste modo um modelo experimental para o estudo da

hipertensão essencial não pode ser explicado por um único defeito genético (Lerman *et al.*, 2005).

Desta forma desde o seu desenvolvimento, o modelo de hipertensão mais utilizado tem sido o rato SHR (*Spontaneous Hypertensive Rat*), (Figura 03) descendentes do cruzamento de um macho de Wistar heterogênicos, de constituição genética variada, com hipertensão espontânea e uma fêmea com pressão sanguínea elevada de uma colônia em Kyoto, Japão (Okamoto and Aoki, 1963, Doggrell and Brown, 1998). Através da procriação consanguínea obteve-se uma linhagem geneticamente homogênea de ratos hipertensos como potencial poligênico, que não necessariamente compartilham os mesmos genes da hipertensão humana (Lerman *et al.*, 2005).



Figura 03. Animal SHR (*Spontaneous Hypertensive Rat*).

Seu uso tem sido disseminado ao longo das últimas décadas, fato este que se deve

principalmente a similaridade de sua manifestação hipertensiva com a hipertensão essencial do homem (Okamoto and Aoki, 1963) e apresentam muitas características secundárias as lesões hipertensivas, tais como a hipertrofia ventricular esquerda e a insuficiência cardíaca características estas, que permitem o estudo reprodutivo das principais consequências da hipertensão arterial (Fazan Jr, 2001). Segundo os mesmos autores, no entanto, deve-se levar em consideração que parece ser improvável que ambas as expressões (rato e ser humano) sejam idênticas sob a ótica genética, em que pese à origem poligênica de ambos e as diferentes influências do meio ambiente e, também que, sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressores podem não ser expressos ao mesmo tempo.

Os ratos SHR são pré-hipertensos para as primeiras 5 a 8 semanas de vidas com pressão arterial sistólica em torno de 100 a 120 mmHg (Adams et al., 1989 *apud* Fazan Jr, 2001), já apresentando um nível pressórico que pode ser considerado como HA espontânea entre a 7^a e a 15^a semanas. Alguns autores consideram ainda que o ápice pressórico deve ser atingindo entre a 20^a e 28^a semanas de vida, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (Yamori, 1984 *apud* Fazan Jr, 2001). O mecanismo indutor da HA nestes animais ainda não está totalmente elucidado. A hipertensão do SHR adulto parece estar relacionada ao aumento da resistência vascular periférica (Dickhout and Lee, 1997). Entretanto a resposta do SRAA pode ser sugerida como possível mecanismo de indução no cérebro (Fliser et al., 1998). Sabe-se, no entanto, que alterações dietéticas de sódio e cloreto não são responsáveis por modificações na resposta pressórica. Recentes estudos demonstraram que nos animais SHR's as alterações das propriedades funcionais precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial e que aparentemente a redução da complacência e distensibilidade vascular podem resultar em hipertrofia da camada média vascular o que por sua vez, aumenta a resistência vascular periférica total (van Gorp et al., 2000, Komolova et al., 2012). Além disto, como já citado anteriormente, a causa mais comum da hipertensão arterial em seres humanos consiste na chamada hipertensão essencial. Sua causa pode ser uma composição de múltiplos genes, cada qual com efeito alélico e

penetrância distintos (Carretero & Oparil, 2000a).

Deste modo um modelo experimental para estudo da hipertensão essencial, não pode ser explicado por um único defeito genético. Este modelo deve apresentar semelhanças fisiológicas hemodinâmicas e anatômicas, bem como, desenvolver as consequências da doença ao mesmo tempo ou até mesmo mais rapidamente que o ser humano (Blanc et al., 2000, Leman et al., 2005). Dois genes, o BPSP-1 e o BPSP-2, localizados respectivamente no cromossomo 10 e X, estão envolvidos na variação da pressão arterial nestes animais (Hilbert et al., 1991). Os mesmos autores sugerem uma correlação com o mapa genético humano, pois há indícios que o BP/SP-1 reside no cromossomo 17q, que consiste em uma região que contém o gene da ECA (Enzima de Conversão da Angiotensina).

Muitos estudos têm definido SHR como um excelente modelo para investigar, além da HA, a fisiopatologia da hipertrofia cardíaca em decorrência da HA (Okamoto and Aoki, 1963, Schuman et al., 2011). Estes animais apresentam também, juntamente com o desenvolvimento da HA, uma progressiva hipertrofia cardíaca, sem modificação do débito cardíaco até que nos estágios finais onde a função cardíaca começa a ser comprometida e o mesmo começa a apresentar uma redução em função de uma insuficiência cardíaca congestiva (Kapur et al., 2010).

Porém, podem-se encontrar também autores que descrevem a igualdade de comportamento da frequência cardíaca entre o modelo SHR e Wistar (Markova, 2010). Em uma interessante revisão da literatura, Pinto, Paula & Gantena, (1998) demonstraram que o rato SHR, até o início deste século, era o modelo mais frequentemente usado em estudos da hipertensão arterial. Apesar deste fato, a etiologia da hipertensão arterial neste modelo ainda não está completamente elucidada.

2.5 A mitocôndria e sua influência no desenvolvimento da HA

Acredita-se que somente há cerca de dois bilhões anos atrás, com o rápido aumento da tensão do oxigênio na atmosfera do planeta (de 1 a mais de 15% dos níveis atuais em menos de 200 milhões anos), as mitocôndrias surgiram como organelas em eucariontes primitivos (Holland, 1994 *apud* Kurland and Andersson, 2000). Sabe-se ainda que o sistema respiratório foi um sistema enzimático anterior a sua introdução em organismos eucariotos, segundo a teoria endossimbiótica, que ganhou força com o trabalho de Lynn Margulis na década de 70 (Margulis, 1970). A descoberta do genoma mitocondrial e os resultados das reconstruções filogenéticas com sequências de RNA ribossomal, bem como para algumas proteínas reforçou a confiança nessa teoria onde uma proteobacteria se fundiu a um organismo eucarioto (Gray & Doolittle, 1982; Yang et al., 1985).

Os primeiros registros de estruturas intracelulares, que provavelmente representam mitocôndrias são de 1840, apenas alguns anos após a descoberta do núcleo da célula. Em 1890 Altmann demonstrou a ocorrência generalizada destas estruturas as quais chamou "bioblastos" sugerindo que estes eram organismos elementares com função vital para a sobrevivência da célula. O nome mitocôndria foi introduzido em 1898 por Benda, originado do grego, *mitos*, fio, e *chondros*, cartilagem, referindo-se ao aparecimento destas estruturas durante a espermatogênese (Ernster & Schatz, 1981).

As mitocôndrias são organelas, com aproximadamente 1 µm de tamanho, encontradas no citoplasma de quase todas as células e que podem responder por cerca de 50% do volume de um único cardiomiócito (Rosca and Hoppel, 2010). Sua estrutura pode ser dividida em compartimentos por um sistema de duas membranas. A membrana externa que separa o citoplasma do compartimento intermembranar e a membrana interna que separa o compartimento intermembranar da matriz mitocondrial (Fosslien, 2003). Ainda para o mesmo autor, proteínas especializadas na membrana interna estão envolvidas na coordenação

dos mecanismos relacionados ao suprimento da demanda energética da célula.

Na última década estudos sobre mitocôndrias demonstraram que estas organelas multifacetadas não são somente essenciais para manutenção da função miocárdica normal, mas também podem estar envolvidas em várias doenças cardíacas, como a HA em função do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Entretanto, muito embora o estresse oxidativo não possa ser considerado como a única causa da hipertensão, ele amplifica a elevação da pressão arterial na presença de outros fatores como o aldosteronismo e hiperatividade simpática (Montezano & Touys, 2012).

O aumento da resistência vascular periférica é sob o ponto de vista fisiológico, o responsável pela adaptação da maquinaria contrátil (Montezano & Touys, 2012). A maioria dos estudos que se propõe à avaliação das mudanças na expressão proteica da hipertrofia cardíaca focaliza a maquinaria celular estrutural e contrátil, entretanto, os mecanismos adaptativos a compensação bioenergética parecem ser igualmente participativos na integração da adaptação cardíaca de um modo geral (Heusch et al., 2014).

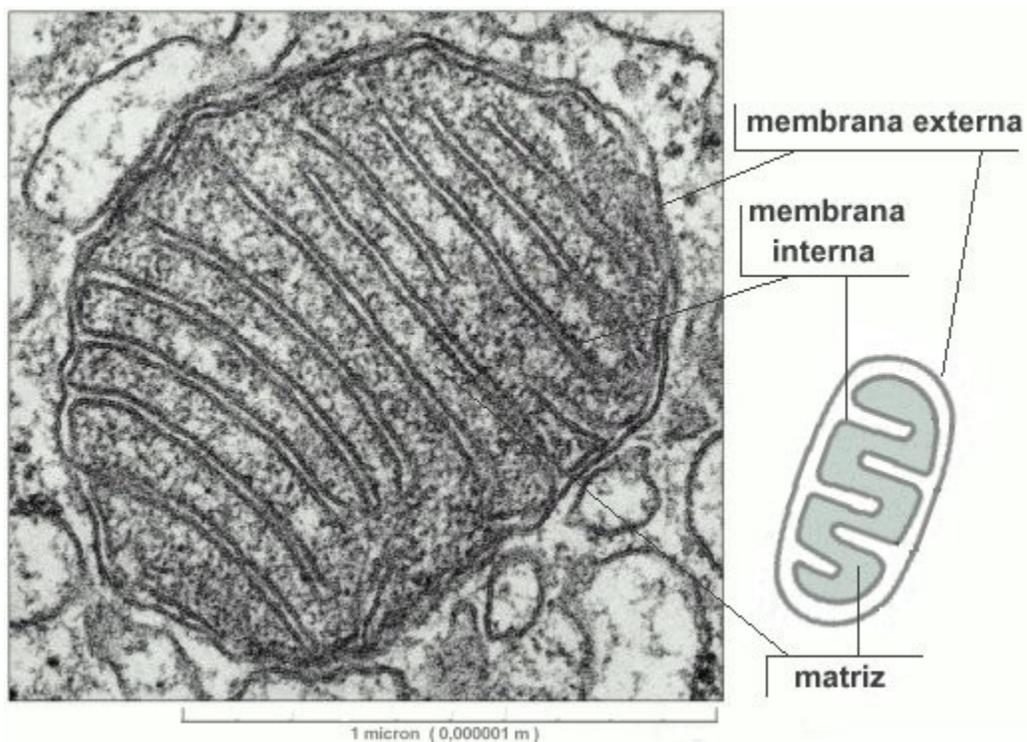


Figura 04. Figura esquemática de uma mitocôndria.

A ligação entre estresse oxidativo e HA foi inicialmente sugerida no início da década de 90 tanto em seres humanos quanto em modelos animais SHR, onde precede o desenvolvimento da própria hipertensão (Nakazono et al., 1991; Fukai et al., 1997). A maioria das ERO's intracelulares, incluindo superóxido, radicais hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode ser gerada como subprodutos da síntese de ATP em reações colaterais do oxigênio com enzimas que formam os complexos I e III na membrana da matriz mitocondrial, e estes radicais superóxidos podem reagir com o óxido nítrico (ON) formando peroxinitrito, uma espécie de radical livre altamente reativo e potencialmente deletério (Marin-Garcia et al., 2013). A resposta aumentada de ERO's nas células do músculo liso vascular, em modelos experimentais, pode estar associada ao aumento da resistência vascular que por sua vez apresentam grande correlação com aterosclerose e HA. Estudos em humanos correlacionando ERO's e hipertensão não

apresentam indicativos positivos desta relação (Montezano & Touys, 2012). Além das ERO's, o papel das proteínas mitocondriais parece ser extremamente contundente e, a determinação do proteoma mitocondrial e suas alterações associadas à HA podem ser um proeminente caminho para futuras intervenções terapêuticas (Hollander et al., 2011).

As vias de apoptose mitocondriais encontram-se significativamente aumentadas em tecidos cardíacos de modelos obesos sugerindo que as mitocôndrias dos cardiomiócitos são responsáveis pela origem e a propagação de arritmias cardíacas associadas geralmente, ao número de canais iônicos de Ca^{2+} na membrana mitocondrial interna (Lu et al., 2007). Nos cardiomiócitos o desacoplamento mitocondrial induz a mudanças na manipulação de Ca^{2+} que estão correlacionadas à expressão diminuída da calsequestrina. Este desacoplamento parece aumentar a produção de espécie reativas de oxigênio/nitrogênio. Uma redução nesta formação restaura a expressão da calsequestrina e as cascatas intracelulares de sinalização do Ca^{2+} (Bugger et al., 2010).

As propriedades químicas do Ca^{2+} e o seu papel na ligação de moléculas complexas, têm sido muito discutido. Algumas destas ligações ocorrem com proteínas contráteis, reguladoras, ou envolvidas em processos de transporte (Saris & Carafoli, 2005). A captação de Ca^{2+} nas mitocôndrias foi inicialmente descrita no início dos anos 60. Desde então, tem sido postulado que o Ca^{2+} mitocondrial é responsável por desempenhar um papel central na fisiologia e patofisiológica celular (Hoppe, 2010).

O influxo de Ca^{2+} originário do citosol controla, dentre outras ações, a taxa mitocondrial de produção de ATP, e ativa três desidrogenases acopladas ao ciclo de Krebs (piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase). Outros *locus* dentro da cadeia de transporte de elétrons, o F0F1ATPase e a adenina nucleotídeo translocase também têm sido sugeridos como Ca^{2+} dependentes (McCormack, Halestrap & Denton, 1990; Yi, Weaver & Hajnoczky, 2004). Além disso, a captação de Ca^{2+} regula a motilidade e morfologia mitocondrial e pode desencadear a morte de células (Kettlewell, 2009).

A principal via de influxo de Ca^{2+} na membrana mitocondrial são os canais iônicos- voltagem dependente (*voltage-dependent anion channel* - VDAC). Estes canais permitem o influxo de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático (RE) podendo induzir ao aumento da permeabilidade e conseqüente morte celular. Constituem-se na proteína mais abundante na membrana externa da mitocôndria (também conhecido como porina), sendo também responsável pelo transporte eficiente de ATP/ADP para fora da mitocôndria. A família VDAC consiste de três isoformas que exibem a mesma homologia funcional (Baines, 2010).

O VDAC apresenta uma dupla capacidade permitindo hora a livre difusão hora exerce um rígido controle da permeabilidade do Ca^{2+} na membrana mitocondrial externa. O influxo de Ca^{2+} na membrana da matriz mitocondrial é rigidamente controlado visando à manutenção de um alto potencial de síntese de ATP (Hoppe, 2010). Além disto, alguns autores relatam a necessidade do VDAC como parte integrante dos poros de transição mitocondriais (PTM). Os PTM's são estruturas inespecíficas que abrangem ambas as membranas mitocondriais, que foram descritos a mais de trinta anos (Hunter, Haworth & Southard, 1976), tem sua abertura induzida por Ca^{2+} e ERO's, o que por sua vez, permite a entrada de água levando a distensão da membrana até sua ruptura (Baines, 2010).

Outro aspecto mitocondrial importante consiste na modificação do substrato energético predominante em cardiomiócitos em função dos aspectos deletérios, como por exemplo, a insuficiência cardíaca (IC), comumente condicionada a HA. A remodelação do cardiomiócito conduz a uma inabilidade de oxidar os ácidos graxos, causada em parte pela diminuição da expressão das enzimas envolvidas neste processo em contraposição ao aumento da expressão de proteínas envolvidas na via glicolítica bem como do ciclo tri carboxílico (Wang et al., 2009). Uma mudança da utilização de ácidos graxos livres (Karlson et al., 1999) como fonte predominante de energia para os cardiomiócitos, para a utilização de glicose (Stanley and Samson, 2002; Frey and Olson, 2003). Apesar da evidente importância destas mudanças metabólicas os mecanismos envolvidos permanecem ainda obscuros. Os processos associados à síntese de ATP, as

consequências na mudança do substrato energético a ser utilizado e a potencial reversibilidade destes processos na IC permanecem, em grande parte, incógnitos (Turer et al., 2010; Marin-Garcia et al., 2013).

Assim o estudo do proteoma mitocondrial tem sido um crescente foco de pesquisa dentro de diversas áreas biológicas durante os últimos quarenta anos. A identificação de processos bioquímicos em nível molecular e a elucidação de seu relacionamento às membranas celulares são vitais para a compreensão de algumas doenças, incluindo a HA.

2.6 Proteômica mitocondrial

O termo proteoma, que pode ser definido como um equivalente de genoma para as proteínas, foi cunhado por Marc Wilkins no Siena Meeting de 1994 (Wilkins, 2010) e inicialmente usado para descrever a totalidade das proteínas codificadas pelo genoma (Vivanco et al., 2003, Shishkin et al., 2004). Para os mesmos autores este termo engloba ainda, a identificação da função, modificações pós-traducionais, interação, localização, atividade e estrutura tridimensional, dentre outros, a partir daí, surge então a proteômica.

O sequenciamento do genoma mitocondrial humano, em 1981, foi um marco na busca pela compreensão de sua importância biológica, além da síntese de ATP, dando origem as investigações a respeito das mutações responsáveis por transtornos hereditários de origem materna desde então, mais de 150 mutações têm sido associadas às síndromes hereditárias (Bankier et al., 1981 *apud* Calvo and Mootha, 2010).

Sem dúvida, uma das grandes consequências desta decodificação consistiu na descoberta de que o DNA mitocondrial pode ser responsável por uma pequena fração do proteoma da organela (cerca de 1%), sendo estas proteínas os principais componentes da cadeia respiratória. Todo o restante das proteínas

mitocondriais é codificado pelo genoma nuclear e requer uma complexa e coordenada maquinaria de importação (Kurland and Andersson, 2000).

A pesquisa atual do proteoma mitocondrial se concentra principalmente em dois aspectos: 1) o perfil do proteoma mitocondrial, que envolve a identificação de todos os componentes mitocondriais de uma única amostra e suas modificações pós-traducionais com o objetivo de criar um banco de dados completo e; 2) a proteômica mitocondrial comparativa, que envolve a identificação de proteínas mitocondriais diferencialmente expressas em amostras de doenças, fornecendo assim informações para compreender ainda mais os mecanismos moleculares das mesmas (Chen et al., 2012). O primeiro proteoma mitocondrial foi elucidado em 1998, utilizando a placenta humana, por meio de técnicas de centrifugação diferencial, eletroforese bidimensional (2D-E) seguida da identificação por PMF (*peptide mass fingerprinting*) onde foram identificadas 46 proteínas (Rabilloud et al., 1998). Estima-se que existam cerca de 1500 proteínas mitocondriais, dentre isoformas e diferentes espécies, resultado de modificações pós-traducionais (Anderson et al., 2012; Kirkwood et al., 1986).

A identificação e classificação funcional da maioria ou, mesmo de todos estes polipeptídeos representaria uma inestimável contribuição ao conhecimento humano. Estudos iniciais, realizados com biópsias de indivíduos portadores de IC demonstraram importantes resultados, utilizando a eletroforese bidimensional (2-DE) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Este estudo demonstrou diferentes expressões proteicas das quais, seis enzimas mitocondriais envolvidas no metabolismo energético foram menos expressas em pacientes com síndrome IC quando comparados a pacientes saudáveis (Hollander et al., 2011). Utilizando ainda as mesmas técnicas, Urbonavicius e cols. (Urbonavicius et al., 2009), demonstraram evidências que esta diminuição pode provocar uma redução na capacidade de síntese de ATP no miócito cardíaco de pacientes com IC em até 35%. No coração adulto normal, o metabolismo aparentemente é predominantemente oxidativo com pequena participação glicolítica. Rosca, (2008)

utilizando a eletroforese unidimensional BN-PAGE (*Blue Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) demonstraram uma mudança de substrato energético predominante na síntese de ATP, com a diminuição da expressão das proteínas envolvidas principalmente na oxidação de ácidos graxos (Acil-CoA sintetases, responsáveis pela síntese de CoA, etapa chave na oxidação completa) e as proteínas do complexo III, IV e V, responsáveis pela manutenção do gradiente protônico. Estes resultados sugerem uma diminuição na capacidade oxidativa em contraposição ao aumento das enzimas glicolíticas e do ciclo tricarboxílico (TCA) que em condições normais são responsáveis por somente 10% da total de ATP sintetizado.

Turer e cols. (2010) destacam ainda que o estado energético pode ser significativamente alterado na HA, envolvendo limitações em todas as vias de síntese de ATP na mitocôndria. Estudos recentes apontaram a redução da máxima taxa do consumo do oxigênio em mitocôndrias isoladas, em modelos experimentais de HA. Uma das possíveis causas para este decréscimo consiste no declínio no nível de expressão de fatores cruciais envolvidos na biogênese mitocondrial.

Por outro lado em estudos utilizando eletroforese bidimensional têm sido demonstrados níveis conservados das enzimas mitocondriais durante a recuperação de processos isquêmicos do miocárdio, sugerindo um importante papel do proteoma mitocondrial durante a revascularização (Folmes et al., 2010). Mudanças no mecanismo contrátil parecem estar associadas ao decréscimo de calsequestrina 2 (CASQ2), uma proteína de membrana associada à regulação do Ca^{2+} sarcoplasmático. CASQ2 pode ser expressa normalmente, em níveis constantes, durante toda a vida. O aumento nos níveis celular de Ca^{2+} devido a esta deficiência mitocondrial pode contribuir para o desenvolvimento de arritmias e morte súbita em indivíduos com taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica (CPVT) (Hanninen et al., 2010). Estudos experimentais sugerem aumentos na produção ERO's como ânions do superóxido e radical hidroxila em portadores de IC. Estes por sua vez causam a oxidação de fosfolipídios e proteínas da membrana e estão envolvidos, em escala larga em lesões isquêmicas (Chen et al., 2012). Os efeitos danosos dos radicais livres

de oxigênio podem ser atenuados por agentes não oxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) (Adlam et al., 2005).

Baseler *et al.* (2011) analisaram proteínas mitocondriais sub-sarcolemais (SSM) e intra-miofibrilares (IMF) de modelos diabéticos encontrando significativas diferenças em proteínas associadas à oxidação de lipídeos. A análise com iTRAQ, uma técnica que permite a identificação de proteínas através de marcação com radioisótopo radioativo, revelou a redução da expressão de 10 proteínas IMF e 10 SSM. Curiosamente, a carnitina palmitoiltransferase-1, uma proteína da membrana externa da mitocôndria que medeia o transporte de ácidos graxos de cadeia longa, foi significativamente aumentada no SSM e sub expressa IMF. O mesmo estudo, utilizando iTRAQ, revelou ainda 14 proteínas da cadeia de transporte de eletrons IMF com a expressão diminuída quando comparadas ao grupo controle não diabético destas, 5 estavam aumentadas no grupo SSM quando comparadas ao controle não diabético (Baseler et al., 2011).

Utilizando SDS-PAGE para análise de proteínas mitocondriais do ventrículo esquerdo de animais SHR com idades entre 4 e 6 semanas, Tang e cols. (2014), descreveram uma sensível diminuição das proteínas associadas aos complexos mitocondriais I e II e da ATP sintase em quando comparados com controle wistar. Outro achado interessante foi a aparente estabilidade na expressão VDAC1, que não demonstrou diferenças entre os grupos SHR e controle (Tang et al., 2014).

Mais recentemente, Littlejhons e cols. (2014), utilizando a combinação de identificação de peptídeos marcados isobaricamente e nano LC-MS/MS, analisaram proteoma mitocondrial de modelos animais não obesos submetidos a uma dieta rica em gordura demonstrando um aumento de 5 vezes na expressão da catalase que atua na diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este achado, acompanhado da diminuição da expressão da superóxido desmutase 2 (SOD-2) parece estar associado a um pior desempenho cardíaco, sugerindo que uma dieta rica em gordura em indivíduos não obesos parece conduzir a uma incapacidade de adaptação a este tipo de condição encontrada, por exemplo,

durante a sobrecarga pressórica. Outro dado importante descrito pelos mesmos autores foi que, apesar da dieta rica em gordura, as mitocôndrias mantiveram a capacidade de oxidar diferentes tipos de substratos a partir da presença da piruvato desidrogenase com semelhante expressão no tratamento e controle (Littlejohns et al., 2014).

Tingting e cols. (2014) usando LC-MS/MS encontraram cerca de 500 proteínas em modelos de IC induzidos por ablação aórtica. Das proteínas identificadas 31 apresentavam diferenças significativas, 15 super-expressas e 16 sub-expressas. As principais diferenças foram descritas nas proteínas do ciclo de Krebs (Tingting et al., 2014).

A acetilação de proteínas é uma importante modificação pós transcricional tendo um papel crucial na conservação destas. Em um estudo avaliando a acetilação e desacetilação de proteínas mitocondriais Philip e cols. (Philip et al, 2014), usando a análise proteômica *gel free* (LC-MS/MS) identificaram a acetilação de 31 proteínas envolvidas no metabolismo energético e sugeriram que estas são possivelmente reguladas pela disponibilidade do substrato energético em tecidos insulino-dependentes, tais como o músculo estriado esquelético. A acetilação destas proteínas é reduzida após a ingestão alimentar sugerindo uma possível associação da regulação alimentar com a utilização do substrato energético preferencial no metabolismo mitocondrial (Philip et al, 2014).

Estudo recente sobre o proteoma mitocondrial em modelos animais hipertensos por constrição arterial demonstrou uma diminuição da capacidade oxidativa associada a sua localização no ventrículo esquerdo. Mitocôndrias intra-miofibrilares apresentaram um maior decréscimo em proteínas associadas à fosforilação oxidativa em comparação com as mitocôndrias subsarcolemais (Shekar et al., 2014).

Em um estudo utilizando eletroforese bidimensional Zamorano-León e cols (2010), demonstraram uma redução na expressão de proteínas associadas à capacidade glicolítica e aumento da expressão de proteínas associadas a β -oxidação, contopondo-se a maior parte da literatura que indica um

aumento da participação glicolítica durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular como fenótipo hipertensivo. Por outro lado, foi descrito também um aumento da síntese de ATP no ventrículo em função da elevação da expressão do complexo ATPF0 sintase.

Em outro estudo utilizando LC-MS/MS em modelos animais isquêmicos observou-se um aumento na expressão de proteínas do ciclo tricarboxílico e a diminuição da expressão de proteínas mitocondriais do complexo I em contraste ausência de modificação na expressão proteica dos complexos II e IV em relação aos controles. A redução no transporte de O₂ e conseqüentemente na fosforilação oxidativa parece ser uma adaptação comum também durante o desenvolvimento da HCVE como consequência da HA (Liu et al., 2014).

A análise do fosfoproteoma mitocondrial de modelos não hipertensos demonstrou a presença de um grande complexo macromolecular que parece estar associado ao efeito cardíaco protetivo, reduzindo a apoptose celular além de aumentar a capacidade oxidativa. Foram descritas 87 proteínas, 16 delas somente encontrados fosforiladas em mitocôndrias de cardiomiócitos de animais treinados, enquanto 6 foram exclusivas dos animais do grupo controle. Essas fosfoproteínas estão envolvidas numa vasta gama de processos biológicos essenciais para o metabolismo do músculo cardíaco sendo o maior cluster funcional modulada pela atividade física (Ferreira et al., 2014).

2.7 Intervenção do exercício no tratamento não medicamentoso da HA

O exercício crônico pode promover melhoria da função cardíaca apartir do aumento da força e volume de ejeção, tendo sido este, associado ao aumento da capacidade aeróbia. Assim, o exercício vem sendo um poderoso meio de tratamento não medicamentoso da HA, bem como das patologias associadas a

ela tais como a insuficiência cardíaca e o infarto do miocárdio (Petritz & Franco, 2014).

Apesar disto, os mecanismos de promoção do exercício no tratamento auxiliar da HA ainda tem sido foco de discussão (Schlüter, Schreckenber & Rebelo, 2010). Exercício de baixa intensidade parece promover redução da hipertensão sistólica e melhoria da síntese de energia e redução da disfunção contrátil, retardando o surgimento da insuficiência cardíaca em modelos experimentais (Kemi et al., 2012). Outro fator importante do exercício é o efeito no remodelamento contrário a HCVE, aumentando o comprimento e largura dos cardiomiócitos em maior grau do que em modelos animais (SHR) não treinados, além de também atenuar a apoptose (Kolwicz et al., 2009).

A hipertrofia concêntrica do ventriculo esquerdo provoca um impacto negativo tanto a estrutura do miocárdio quanto na função circulatória (Hill, 2000). Acredita-se que a resposta cardíaca hipertrófica ao aumento da sobrecarga pressorica consiste em uma tentativa de normalizar o estresse do ventriculo esquerdo e assim ajudar a manter a função cardíaca dada ao aumento da sobrecarga hemodinâmica. Este processo tem sido referido como hipertrofia compensatória ventricular esquerda ou HCVE (Libonati, 2013). Com a HCVE, o miocardio é remodelado pela adição de sarcômeros em paralelo que, caracteristicamente, leva a um aumento da espessura da parede ventricular e fibrose (Cingolani et al., 2003). Este processo parece ser mais induzido por fatores mecânicos com concomitante ativação de fatores de crescimento que por sinalização específica via proteína G (Frey & Olson, 2003; Molkentin, 2004).

Nas hipertrofias patológicas, como a HA, ocorre uma complexa reprogramação da expressão gênica nos miócitos, além do aumento da expressão de proteínas contráteis, estruturais e relacionadas às vias metabólicas, o que leva a modificação no padrão de expressão de algumas proteínas contráteis para isoformas do padrão fetal e também a reexpressão de proteínas do programa fetal, em decorrência da re-expressão de um conjunto de gens que são mais prevalentes durante a vida intra-embriônica (Swynghedauw, 1999). As razões e as possíveis vantagens ou desvantagens dessas modificações qualitativas nas proteínas dos

cardiomiócitos não são ainda adequadamente conhecidas. No entanto, a detecção das mesmas nos diversos modelos experimentais e nos indivíduos adultos com hipertrofia miocárdica permite seu uso como marcadores fenotípicos de hipertrofia (Franchini, 2001).

A proteína contrátil mais descrita na literatura como resultado de hipertrofia no miócito cardíaco é a miosina que apresenta, como já descrito uma mudança de isoforma durante a HCVE (Swynghedauw, 1999). A miosina é composta de um par de cadeias pesadas (MHC *myosin heavy chain*; α e β) e dois diferentes pares de cadeias leves (MLC *myosin light chain*), MLC1 e MPLC2. Três isoenzimas V1, V2 e V3 são expressas no miocárdio nas diversas espécies, todas com os mesmos pares de MLC1 e MPLC2, diferindo apenas na composição das MHC: $\alpha\alpha$ em V1, $\alpha\beta$ em V2 e $\beta\beta$ em V3 (Gupta, 2007).

O sítio ativo da ATPase está localizado nas cadeias MHC. É a capacidade de síntese de ATP que, em parte, define capacidade contrátil da célula. A isoforma $\alpha\alpha$ -MHC tem a maior e a $\beta\beta$ a menor atividade ATPásica, ou seja, a isoforma $\alpha\alpha$ -MHC apresenta maior atividade glicolítica enquanto as fibras $\beta\beta$ -MHC tem maior atividade oxidativa. Em resposta a sobrecargas, pode ocorrer a inibição da expressão do gene que codifica a isoforma rápida (α -MHC) e ativação do gene que codifica a isoforma lenta (β -MHC). A intensidade com que esta alteração é observada na hipertrofia cardíaca depende do tipo de sobrecarga e da espécie estudada (Franchini, 2001). Em ratos, a isoforma $\alpha\alpha$ predomina em corações normais enquanto que em seres humanos a isoforma $\beta\beta$ é predominante. Durante sobrecargas pressoras crônicas em ratos ocorre modificação da predominância de $\alpha\alpha$ para $\beta\beta$, enquanto em humanos esta modificação não é tão acentuada uma vez que a isoforma predominante em condições normais já é a $\beta\beta$. Em modelos de sobrecarga pressora em ratos, aumentos de expressão do mRNA para isoforma $\beta\beta$ podem ser detectados em cerca de 2 h a partir do início da sobrecarga, atingindo um máximo entre o segundo e o terceiro dias após a constrição da aorta. Em modelos experimentais de sobrecarga pressórica, além da MHC ocorre mudança de domínio da forma adulta para a forma embrionária da MLC (normalmente esta isoforma é expressa apenas em átrios dos

animais adultos) em ventrículo esquerdo (Swynghedauw, 1999). A isoforma de actina α , encontrada no músculo esquelético de animais adultos e no miocárdio na fase embrionária também é expressa em ventrículo esquerdo submetido a sobrecarga crônica. Além das isoformas fetais e embrionárias das proteínas contráteis, a sobrecarga induz à expressão de genes expressos no período fetal em miocárdio ventricular tais como o ANP, a enzima conversora da angiotensina I, a subunidade β da creatina quinase e subunidade M da lactato desidrogenase (Bugaisky et al., 1992).

O estímulo que antecede o processo de expressão gênica pode ser mecânico ou químico. Muitos mensageiros químicos, como os agonistas β -adrenérgicos, o hormônio tireoidiano, a angiotensina II, o TGF- β (fator de crescimento transformante β), o IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina) e a endotelina-1 e a calcineurina, são potentes estimulantes da síntese proteica no miocárdio, como já bem descrito anteriormente na literatura (Bugaisky et al., 1992; Yamazaki, Komuro & Yazaki, 1998; Oigman & Neves, 2000; Barry et al., 2008). Entretanto, é importante ressaltar que a hipertrofia miocárdica é produzida por alterações específicas na expressão de vários genes. Os tipos de genes e a intensidade da expressão de cada um deles podem variar não só com a natureza do estímulo indutor da hipertrofia como também em decorrência do tempo deste estímulo. Assim, diferentes fenótipos, tanto morfológicos como funcionais, podem ser encontrados em diferentes fases de evolução do crescimento hipertrófico (Franchini, 2001). Isto justificaria o fato de que, em determinado momento, encontra-se o miocárdio hipertrofiado com desempenho sistólico normal ou até aumentado, como por exemplo no início do desenvolvimento da HA. Em outros momentos esse desempenho encontra-se deprimido como no desenvolvimento da IC. Esta representação é importante porque mostra que a atenuação do crescimento hipertrófico ou sua reversão podem ser feitas sob diversas maneiras medicamentosa ou não, o que justifica a importância do exercício como forma de atenuar alguns destes estímulos.

Por outro lado, a tradução entre o estímulo mecânico (aumento do estresse de parede) e o

desencadeamento do processo hipertrófico é ainda pouco conhecida (Kolwicz, et al., 2009). Aparentemente as proteínas que ocupam o espaço extracelular e as que compõem o citoesqueleto ocupam um papel central neste processo. O estresse imposto à matriz extracelular e ao citoesqueleto nas sobrecargas de pressão ou volume é capaz de ativar canais iônicos sensíveis à deformação (*stretch-operated ion channels*). Um desses canais, que produz uma corrente de entrada de Ca^{2+} e Na^+ nas células, parece ser capaz de estimular a síntese proteica e induzir hipertrofia em culturas de miócitos cardíacos (Molkentin et al., 1998).

O aumento do influxo de Ca^{2+} estimulado pela sobrecarga pressórica induz o crescimento dos cardiomiócitos através de mecanismos relacionados com o mecanismo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a proteína fosfatase, que provoca a desfosforilação factor da família de fatores de transcrição NFAT, promovendo assim translocação nuclear e a indução da transcrição gênica (Hill et al., 2000). O aumento da transcrição gênica mediada pela calcineurina tem sido descrita como um importante fator de indução da IC, enquanto que sua inibição impede o avanço desta síndrome (Molkentin, 1998; 2004).

Em decorrência da elevação da relação volume-sobrecarga sanguínea, alterações sistêmicas neuro-humorais e locais produzem importantes respostas. O exemplo mais bem caracterizado consiste o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) onde o aumento da concentração de angiotensina sistêmica II (Ang II), percebida pelos receptores AT-1 e AT-2 promove a proliferação de fibroblastos e aumento na produção de colágeno, que normalmente é extensa o suficiente para produzir fibrose macroscopicamente visível. O aumento da fibrose por sua vez, contribui para o aumento da rigidez ventricular esquerda e redução da contratilidade (Yamazaki, Komuro & Yazaki, 1999). Além da participação do SRAA a endotelina-1 (ET-1), outro fator humoral sistêmico, também tem sido reconhecida por suas ações locais suficientes para induzir uma hipertrofia em cardiomiócitos, em decorrência de estímulos mecânicos (De Giusti et al., 2013). Apesar disto a literatura atual ainda é carente de dados que demonstrem o efeito do exercício na adaptação do miócito cardíaco durante a HA, como por exemplo, adaptação mitocondrial, ao fenótipo hipertensivo.

2.8 Efeitos do exercício sobre mitocôndrias do miócito cardíaco

As impressionantes diferenças da composição e organização das mitocôndrias dentro de um mesmo tecido podem ser fascinantes e, dado o seu dinamismo, torna não menos fascinante o desafio à sua compreensão. A existência de uma variedade de sinais de transdução tem sido associada ao efeito cardioprotetivo do exercício, Ong e cols., (2010) sugerem que a interação entre as quinases mitocondriais e a abertura dos poros transicionais de permeabilidade (*mPTP*), representam um papel determinante na sobrevivência celular em situações de estresse, como, por exemplo, nas lesões por isquêmicas (Hausenloy and Ruiz-Meana, 2010). No contexto da adaptação à isquemia miocárdica há evidências do papel da hipóxia como um potencial mediador da reprogramação metabólica mitocondrial (Kavazis *et al.*, 2010).

Atualmente postula-se que um dos principais benefícios do exercício para o coração, ou seja, o chamado efeito cardioprotetivo esteja associado à capacidade antioxidante miocárdica. Há a presença de enzimas capazes de reduzir as ERO's, dentre estas enzimas, em especial, a PRDXIII, cuja localização específica dentro da mitocôndria parece oferecer uma linha de defesa preliminar o H_2O_2 produzido pela fosforilação oxidativa (Rhee *et al.*, 2001). A super expressão desta proteína foi demonstrada por Kavazis e cols. (2010), em decorrência do exercício de moderada intensidade. Os mesmos autores apresentam ainda indicativos de uma adaptação diferenciada das mitocôndrias localizadas em regiões distintas (intermiofibrilar e subsarcolemal) no miócito cardíaco em decorrência do exercício físico em modelos animais sedentários, demonstrando a necessidade de novos estudos que se proponham a elucidar estas diferenças.

Judge e cols. (2005) descreveram a redução da produção mitocondrial de H_2O_2 no miócito cardíaco, por parte do complexo enzimático I da cadeia respiratória, em modelos animais que praticaram

exercício voluntário ao longo de 24 semanas sugerindo que esta adaptação pode ser uma das formas de cardioproteção induzidas pelo exercício. A habilidade das mitocôndrias em mover-se, aparentemente, consiste em uma exigência para melhorar a distribuição de ATP em toda a célula. Alterações na morfologia mitocondrial estão implicadas no desenvolvimento, metabolismo, apoptose e desenvolvimento embrionário. Estas mudanças morfológicas são conduzidas por um grupo de proteínas mitocondriais como, a mitofusina 1 e 2 (*Mfn1*; *Mfn 2*) e OPA1 (*optic atrophy 1*). Dados recentes sugerem que as mudanças na morfologia mitocondrial podem estar associadas a vários aspectos da biologia cardiovascular que incluem desde o desenvolvimento cardíaco, resposta a isquemia, *diabetes mellitus*, apoptose celular e IC (Ong et al., 2010).

Colleman et al., (2006) *apud* Rosca and Hoppel, (2010) afirmam que a morfologia das mitocôndrias pode ser responsiva às mudanças nos cardiomiócitos como, por exemplo, as geradas pelo exercício físico. A hipertrofia cardíaca pode ser acompanhada de mitocôndrias muito maiores (também chamadas gigantes) com hipertrofia da crista mitocondrial. Entretanto, parecem haver diferenças em relação à biogênese mitocondrial que ocorrem em decorrência da hipertrofia fisiológica (adaptação positiva em função do exercício físico) que parecem acontecer em função do aumento da necessidade de ATP para a produção de trabalho mecânico e da biogênese mitocondrial na IC, que ocorre como uma resposta à diminuição de uma série de proteínas regulatórias, resposta esta que, no entanto, não parece estar presente em outras patologias (Rosca and Hoppel, 2010). Investigando o efeito de oito semanas de corrida voluntária (*voluntary wheel running*) sobre as mitocôndrias do miócito cardíaco de modelos de HA induzida van Deel et al. (2011) demonstraram além de hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo uma diminuição dos canais iônicos de Ca^{2+} SERCA2a, indicando um efeito anti apoptótico.

Em outro estudo, modelos animais pós-infarto, eram submetidos a oito semanas de treinamento intervalado de alta intensidade. Observou-se a redução no aumento da expressão de enzimas antioxidantes e a melhoria da capacidade mitocondrial devido à preservação dos parâmetros funcionais mitocondriais, como

evidenciado pela atividade preservada do complexo I da cadeia respiratória (Kraljevic et al., 2013).

Estes dados evidenciam a importância do estudo do papel mitocondrial tanto na adaptação fisiológica ao exercício quanto na adaptação patológica à HA. O estudo da proteômica mitocondrial tem se mostrado uma área de estudo proeminente e em franca expansão. Entretanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia mitocondrial e doenças associadas a esta está apenas no começo.

3. Justificativa

A compreensão dos mecanismos adaptativos mitocondriais a partir da utilização do exercício no tratamento da HA representam um imenso potencial para um maior entendimento dos processos celulares e mecanismos biológicos de adaptação em modelos animais. O estudo destas adaptações pode contribuir no desenvolvimento de nova sistemática na prescrição do exercício e, até mesmo, novas condutas terapêuticas no tratamento da HA.

4. Objetivo geral

Analisar o comportamento adaptativo e a expressão de proteínas do miócitos cardíaco de

modelos animais patológicos (Zucker e SHR) submetidos a diferentes tipos de exercício.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Avaliar a capacidade aeróbia de modelos de síndrome metabólica através de teste de corrida em esteira rolante infinita.

4.1.2 Quantificar a expressão da cadeia pesada de miosina, no miócito cardíaco de ratos adultos machos submetidos a treinamento de natação durante oito semanas, três sessões semanais com 30 minutos de duração cada com 2,5; 5,0 e 7,5% de intensidade (sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal) utilizando a técnica de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

4.1.3 Avaliar os efeitos do exercício sob o ponto de vista histopatológico do miócito cardíaco de ratos adultos machos submetidos a treinamento de natação durante oito semanas, três sessões semanais com 30 minutos de duração cada com 2,5; 5,0 e 7,5% de intensidade (sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal).

4.1.4 Analisar os efeitos do exercício forçado, de moderada intensidade, com 4 semanas de duração sobre a hipertensão arterial em modelos SHR.

4.1.5 Descrever, utilizando técnicas proteômicas *gel free* a expressão de proteínas mitocondriais em modelos SHR não hipertensos, submetidos a 4 semanas de exercício forçado de moderada intensidade.

5. Discussão

O exercício regular tem sido descrito como um importante fator de implemento da saúde e, o aumento da função cardiocirculatória, é reconhecidamente uma das principais causas desta melhoria (Seidl & Asplund, 2014). Esta melhoria, em parte, pode ser explicada pelo aumento do número e da densidade dos capilares sangüíneos dos músculos estriados, oferecendo maior capacidade de adaptação circulatória a esforços físicos, elevação do conteúdo de mioglobina dos músculos e aumento da síntese oxidativa de energia (Ghorayeb et al., 2005; Lazar *et al.*, 2013). O exercício físico tem sido associado a alterações neuro-

hormonais, efeitos anti-inflamatórios, assim como o aumento da capacidade contrátil do músculo cardiovascular. Além disto, o exercício aeróbio de longa duração tem sido descrito como eficiente na melhoria da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, aumento no débito cardíaco e nos volumes diastólicos e sistólicos finais, mesmo em pacientes idosos (Kraljevic *et al.*, 2013). Nos cardiomiócitos o exercício crônico parece reduzir a cascata de apoptótica a partir da regulação do Ca^{2+} intracelular (Stolen *et al.*, 2009). Além disso um dos processos adaptativos mais importantes para o coração promovido pelo exercício físico consiste na hipertrofia cardíaca, pois esta se relaciona diretamente com o desenvolvimento da força celular do miócito cardíaco (Natali, 2004; Ghorayeb *et al.*, 2005; Burniston, 2009).

Dentre os sistemas patológicos aqui estudados, a síndrome metabólica (SM) pode ser definida como a coexistência de obesidade visceral, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão, estando bem estabelecido como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (Sárközy *et al.*, 2013). Além disso, a SM pode ser considerada um estado precursor direto do diabetes mellitus tipo 2 (Grundy, 2012; Aschner, 2010). A SM apresenta uma significativa prevalência tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento e pode ser encontrada em todas as faixas etárias de ambos os sexos (Cameron, Shaw & Zimmet, 2004).

Os modelos animais mais utilizados no estudo da SM são os ratos Zucker (ZDF) (Mendizábal, Llorens & Nava, 2013). O ZDF possui uma mutação no receptor (fa/fa) de leptina, tornando-se obesos por volta da 3ª semana de vida. Com 14 semanas aproximadamente, 40% do seu corpo já é composto por gordura, podendo o ZDF ser caracterizados por hiperfagia, dislipidemia, tolerância à glicose, resistência insulínica, hiperinsulinemia, aumento da expressão de grelina e hipertensão (Zucker & Antoníades, 1972).

Neste sentido, a máxima fase estável de lactato, (MFEL) tem sido usada como padrão ouro na avaliação da capacidade aeróbia apresentando uma alta correlação com potência aeróbica máxima (Beneke, Leithauser & Ochentel, 2011). Neste estudo (Artigo #1), o grupo composto por animais Zucker obesos e

sedentários e um grupo controle wistar, também sedentário, foram submetidos a um teste incremental de corrida em esteira rolante em três dias consecutivos a fim de determinar a MFEL neste modelo animal.

Os resultados encontrados demonstram que estes animais apresentaram uma menor capacidade aeróbia quando comparados ao modelo não obeso. Este achado corrobora os dados descritos por Hansen et al. (2014), que em uma extensa análise, demonstraram uma menor capacidade aeróbia relativa à massa corporal total em adolescentes e adultos de ambos os sexos. Drinkard *et al.*, (2007) sugerem que a composição corporal é um dos principais determinantes do desempenho demonstrando uma menor capacidade aeróbia em adolescentes obesos quando comparados ao controle. Também foram descritas diferenças significativas no ponto de inflexão do lactato, sendo esta cerca de 30% menor no grupo obeso.

Diversas são as doenças associadas à obesidade, tais como câncer, diabetes tipo 2 (DM2), doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana (DAC), osteoartrose (OA), dislipidemia e HA (Hall et al., 1993; Rumantir et al., 1999; Halpern et al., 2010; Plourde et al., 2014). A HA representa hoje uma das doenças de maior prevalência mundial e tem sido associada ao decréscimo da capacidade circulatória do coração isquemia; disritmia e, principalmente, disfunção hemodinâmica (sistólica ou diastólica) em decorrência da hipertrofia basolateral (Lips et al., 2003; Plourde et al., 2014). Neste escopo a hipertrofia cardíaca decorrente da carga pressórica ou de volume que pode ocorrer em função da hipertensão arterial ou do exercício (Mill, 2001; Murdolo et al., 2014), tem sido alvo de inúmeros estudos que se propõem a analisar os diferentes processos moleculares adaptativos (Foryst-Ludwig & Kintscher, 2013; Leischik et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar a hipertrofia, bem como a capacidade contrátil do miócito cardíaco, foi proposta a observação do efeito de diferentes intensidades de exercício e o padrão de hipertrofia do miócito cardíaco sobre a expressão de miosina de cadeia pesada (MHC). Para isto, foram usados modelos animais Wistar normotensos divididos aleatoriamente em 4 grupos submetidos a exercício forçado (natação) em diferentes intensidades: GT₁; 2,5%, GT₂; 5,0% e GT₃, sobrecarga de 7,5% do peso corporal do animal e

GC, controle sedentário.

Para verificar se as possíveis alterações no miócito cardíaco seriam consequência a adaptação ao treinamento físico, o limiar anaeróbio (Lan) foi utilizado como parâmetro de treinamento nos modelos Wistar, pois, segundo Prada et al. (2003), este se apresenta como um indicador confiável do desempenho aeróbio. O valor médio dos grupos submetidos a treinamento (um menor acúmulo de lactato) $4,6 (\pm 0,7)$ Mmol. L⁻¹ em relação ao grupo controle, cuja a média foi de $5,9 (\pm 0,4)$ mmol.L⁻¹ após o período de treinamento. Nossos achados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa após o período de treinamento, corroborando os efeitos do treinamento físico sobre o aumento da capacidade aeróbia.

Um dos primeiros trabalhos que abordaram a hipertrofia cardíaca foi realizado por Hickson *et al.* (1979) em ratos submetidos à natação. Neste estudo, foi demonstrado um aumento significativo do peso corporal e da concentração total de proteínas em tecido muscular cardíaco, já no segundo dia, após o início do treinamento. Para Medeiros et al. (2006) a hipertrofia muscular é um processo resultante de um aumento da área de secção transversa do músculo, como resposta ao aumento da síntese proteica, aumento do número e tamanho das miofibrilas, assim como a adição de sarcômeros no interior da fibra muscular. De acordo com Barros Neto (1994), a hipertrofia ventricular secundária ao exercício pode ser vista como forma de adaptação fisiológica à sobrecarga de treinamento. É importante ressaltar que variáveis que afetam o tipo de exercício, tais como volume, intensidade e duração, podem provocar alterações hipertróficas diferentes que irão influenciar no aumento da secção transversa da fibra muscular cardíaca acompanhada ou não do aumento proporcional da câmara ventricular.

Um achado importante descrito neste trabalho foi a lesão no miocárdio identificada no grupo submetido à alta intensidade, uma área de necrose de coagulação (Artigo # 2 Figura suplementar n.1), juntamente com a presença de leucócitos. A necrose de coagulação é o tipo mais comum de morte celular após estímulos exógenos, ocorrendo após estresse, como isquemia e lesão química. Manifesta-se por

tumefação intensa ou ruptura da célula, desnaturação, coagulação das proteínas citoplasmáticas e degradação das organelas celulares. Na mesma amostra, foi possível identificar presença de leucócitos que estão associados à remoção das células mortas por fagocitose Chazaud *et al.* (2003). Os mesmos autores propuseram ainda um modelo cuja deposição de monócitos e leucócitos pode ser explicada pela promoção de micro traumas no tecido celular que, por sua vez, promovem a hipertrofia muscular.

Notou-se que cerca de 20% da amostra do grupo submetido a treinamento de alta intensidade (GT₃) apresentou áreas de esclerose miocárdica com presença de tecido fibroso. Este achado vai ao encontro à descrição de Mills *et al.* (2006), que encontrou em treinamento com cargas de exercício intermitente uma elevada hipertrofia concêntrica, acompanhada de pequenos sinais de fibrose sem, no entanto, encontrar aumento na expressão gênica da MHC. As análises das lâminas do ventrículo esquerdo dos ratos pertencentes ao grupo GT₁ e GT₂, apresentaram algumas alterações morfológicas. Foram evidenciadas áreas de esclerose discreta com infiltrado de lipofuscina, também chamados grânulos de pigmento lipofuscina, que sugerem alterações metabólicas possivelmente associadas ao esforço, sem, no entanto, apresentar nenhuma alteração estrutural. É importante ressaltar que não foram identificadas diferenças significativas nas quantidades de lipofuscina em ambos os grupos GT₂ e GT₃ (Artigo # 2 Figura suplementar n.1). Em um estudo recente Chang *et al.* (2014), analisou o perfil histológico do miocárdio de modelos animais normotensos submetidos a exercício intermitente de alta intensidade. A presença de lipofuscina configura-se de modo semelhante em todos os sujeitos submetidos à sobrecarga de treinamento sem, aparentemente, nenhuma diferença intra-grupos. Estes achados parecem, de certo modo, encontrar respaldo na literatura, demonstrando, no entanto, que o exercício com intensidade relativamente baixa, parece ter significativa resposta no miócito cardíaco, o que não foi demonstrado, na literatura, no músculo esquelético (Kmieć, 2012). Foram descritos aumento da deposição de colágeno, hiperplasia intesticial, aumento dos discos intercalares e desaparecimento de junções comunicantes (*gap junctions*) dados que corroboram nossos achados no grupo animal também submetido a

exercício de alta intensidade.

Em nosso estudo, verificamos inicialmente, através da análise de géis de eletroforese unidimensionais, um aparente aumento quantitativo da expressão da MHC, resultante da hipertrofia do cardiomiócito (Artigo # 2 Figura 1), no grupo GT2 e GT3 em relação ao GC. Este dado corrobora os achados de Hashimoto et al., (2004) que demonstraram aumentos de 30 a 50 %, respectivamente, em ratos infartados e não infartados, submetidos a exercício de baixa intensidade em esteira rolante durante seis semanas. Resultados também semelhantes aos de Iemitsu *et al.* (2004), em ratos idosos, submetidos a treinamento de natação, durante oito semanas, bem como os achados de Paganni & Sollaro (1983 apud Difee & Chung, 2003). Em um estudo pioneiro comparando ratos normais e hipertensos submetidos a exercício de natação, encontraram-se aumentos significativos de MHC, em ambos os grupos, quando comparados a seus respectivos controles utilizando SDS-PAGE (Scheuer et al., 1982).

O músculo cardíaco apresenta pelo menos duas diferentes isoformas da cadeia pesada de miosina (α e β -MHC) e duas cadeias leves de miosinas (MLC) que estão codificadas em dois genes distintos, (Di Domenico et al., 2012). Os genes que codificam as MHC apresentam-se regulados de modo diferente em resposta a diferentes estímulos como, por exemplo, a sobrecarga, o que parece óbvio devido à importância do trabalho cardíaco. Em ratos, os cardiomiócitos expressam as isoformas α e β da cadeia pesada de miosina sendo, no entanto, a α -MHC a maior proteína contrátil exclusivamente expressa no miocárdio (Wan et al., 2014).

Guelfi et al. (2006) analisaram variações no proteoma do músculo esquelético humano durante o processo de envelhecimento associado ou não, ao exercício. Seus achados demonstraram que, no processo de envelhecimento, ocorre uma significativa diminuição da expressão de α -MHC acompanhada de um decréscimo da capacidade de fosforilação da miosina de cadeia leve 2 (regulatória). Estas modificações contribuiriam para a diminuição do desempenho motor enquanto o exercício contribui de forma significativa

no aumento da expressão da β -MHC, o que supriria o decréscimo na capacidade de fosforilação da miosina de cadeia leve.

A partir da constatação do aumento da expressão de MHC era preciso analisar de modo mais profundo o perfil proteico do miócito cardíaco de modelos animais submetidos a diferentes intensidade de exercício. Para isto, foi utilizada, inicialmente, a eletroforese bidimensional (2D-E) do músculo estriado cardíaco. Deste modo, acreditamos que os resultados gerados neste trabalho representaram um avanço para o estudo do miócito cardíaco, utilizando a técnica de 2D-E podendo este ser considerado pioneiro na avaliação de proteínas acima de 100 kDa.

Um grande número de trabalhos voltados à exploração dos efeitos do treinamento físico sobre a composição das proteínas contráteis tem sido descrito. Pinter et al., (2008) demonstraram aumento da ATPase miosínica no ventrículo esquerdo, secundária ao aumento da expressão de α -MHC em ratos submetidos a treinamento de natação. Os mesmos autores citam ainda que, em modelos de treinamento físico com esteira, em ratos, podem ocorrer alterações na função contrátil do miocárdio sem que ocorram mudanças significativas na atividade da ATPase miosínica, bem como na composição das isoformas da miosina ventricular. Isso significa dizer que o aumento na capacidade de ejeção ventricular pode não ser decorrente do aumento da expressão de proteínas contráteis, podendo ser resultado do aumento do influxo de Ca^{2+} no miócito, o que também é sustentado por Natali, (2004).

Levando-se em consideração que o aumento da capacidade circulatória cardíaca depende em parte de sua força contrátil e que, a miosina é o motor operacional desta ação, torna-se de extrema importância o estudo das alterações evocadas pelo exercício, na expressão da miosina no miócito cardíaco. Inúmeros estudos anteriores demonstraram, utilizando técnicas eletroforéticas unidimensionais, aumento na quantidade expressa das diferentes isoformas de miosina no miócito cardíaco (Joumaa & Le'oty, 2002; Diffie & Chung, 2003; Hashimoto *et al.*, 2004; Hinken, Korte & McDonald, 2006). Vale ressaltar que todos estes

trabalhos supracitados estão relacionados com aumento da expressão da MHC em animais que apresentaram algum tipo de cardiomiopatia e foram submetidos a treinamento como visando tratamento clínico.

Natali (2004), sugere que as características contráteis intrínsecas das miofibrilas são modificadas para contribuir para um aumento da função do ventrículo esquerdo e que estas podem estar associadas ao treinamento. Espera-se ainda que o aumento do retorno venoso, estimulado pela ação da epinefrina, liberada na corrente sanguínea pela glândula suprarrenal em resposta ao exercício, possa promover adaptação positiva da capacidade concêntrica das fibras cardíacas, levando a uma provável adaptação em nível celular, no que diz respeito à força absoluta desenvolvida pelas fibras cardíacas. Estes achados parecem ser suportados pelos dados de Medeiros et al. (2006), que demonstraram que após um treinamento de natação de longa duração de uma hora com cinco sessões semanais, durante oito semanas, em ratos, houve um aumento do volume e no peso do ventrículo em 18% e 13%, respectivamente, e cerca de 20% no diâmetro do miócito cardíaco, em comparação ao grupo controle. Pluim *et al.* (1999) em uma extensa meta análise, além de ratificar estes dados associam o crescimento a um maior desempenho em força absoluta, sendo esta cerca de três vezes maior em homens treinados *versus* não treinados, relacionando este achado ao maior influxo de cálcio no sarcolema.

Dentre nossos achados (Artigo # 2 Tabela 1), também foi detectada a presença de outra proteína sarcomérica denominada troponina. De acordo com o modelo de regulação da contração muscular, o sítio de ligação entre a actina e a miosina pode ser ocupado por um complexo proteico formado pela troponina e pela tropomiosina. A troponina, por sua vez, consiste em um tetrâmero formado pelas subunidades TnC, que se associa ao Ca^{2+} , TnT e TnI ambas regulatórias (Peng et al., 2014). A troponina I tem sido amplamente utilizada como um marcador de lesão do miócito cardíaco. A determinação dos níveis séricos da mesma apresenta uma alta correlação com a insuficiência cardíaca e, por consequência com a hipertrofia patológica do miócito cardíaco (Liu & Pollack, 2004; Agianian et al., 2004; Srinivas et al., 2014).

Nossos dados demonstraram o aparecimento da troponina no GT₃ (Artigo # 2 Tabela 1), o que, parece ir ao encontro aos dados da análise histoquímica que indicam neste mesmo grupo área necrótica, indicativa de lesão, bem como a forte presença leucocitária associada à hipertrofia do miócito cardíaco (Chazaud et al., 2003). É possível que a ausência de troponina nos outros grupos treinados e no controle esteja ainda associada à baixa sensibilidade da técnica, conforme descrito anteriormente neste trabalho ou mesmo ao fato de que somente altas concentrações poderiam ser identificadas como ocorrido no GT₃. Em recente trabalho Li et al. (2013) demonstraram o aumento da expressão da troponina no ventrículo esquerdo em modelos animais que sofreram infarto do miocárdio em consequência da IC, utilizando técnicas de análises proteômicas *gel free* (nano LC-MS). Os autores sugerem que o aumento da expressão da troponina possa estar associado ao dinamismo da lesão induzida pela HCVE. Estes dados corroboram os achados de Cubedo, Padró & Badimon (2013) que, utilizando 2D-E e MALDI TOF-TOF, descreveram o aumento da expressão de troponina nas fases iniciais do processo de lesão conduzido pelo infarto em seres humanos admitidos na emergência hospitalar.

A produção de radicais livres do oxigênio tem sido discutida como um importante componente da fadiga muscular. Chen & Zweier (2014), em uma extensa revisão, explicou que durante a síntese mitocondrial de ATP (adenosina trifosfato) ocorre a produção de superóxidos que irão formar radicais hidroxílicos e peróxidos de hidrogênio, estes com menor capacidade reativa e eletricamente neutra, o que possibilita um maior potencial de difusão tecidual. A literatura sugere que este acúmulo possa estar relacionado ao papel das superóxido dismutase, um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação (potencial redox) do radical livre do oxigênio, principalmente, a Mn-SOD (mangânês superóxido desmutase) (Ravi Kiran, Subramanyan & Asha; 2004; Ravi Kiran et al., 2006). Ambos os íons funcionam como moléculas sinalizadoras modificando funções protéicas. Os radicais hidroxílicos têm uma contribuição extremamente significativa no desenvolvimento da fadiga muscular, estando intrinsecamente relacionados ao

exercício de alta intensidade (Chen & Zweier, 2014). Em nosso estudo encontramos a Mn-SOD expressa em todos os grupos exercício, sem, no entanto, identificar diferenças em sua expressão.

As intensidades relativas de exercício estão relacionadas diretamente a variações no consumo de oxigênio, conhecido como $VO_{2máx}$. Duranteau et al. (1998) sugeriram que a mitocôndria exerce papel fundamental na cascata de sinalização-ativação da síntese de superóxidos e que, a partir disto, uma série de sinais intra e extracelulares, associados ao stress provocado pelo exercício, induziriam tanto a redução inicial da capacidade contrátil do miócito cardíaco quanto à ativação do ciclo celular. Os mesmos autores sugerem ainda que esta última deve-se ao aumento da expressão de proteínas cinases da família das *MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*), que desempenham um importante papel na divisão e diferenciação dos cardiomiócitos. As cinases desta família são ativadas pela fosforilação de resíduos de tirosina (Tyr) e treonina (Thr) presentes em uma região conservada, o que pode ocorrer através da ativação de uma tirosina cinase ou da proteína G acoplada a receptores de membrana. Esta ativação, por sua vez, está associada à produção de superóxidos (Gillespie-Brown *et al.*, 1995). Deste modo, podemos inferir que a variável intensidade nos diferentes grupos de treinamento poderia induzir a ativação da cascata de ações descrita acima.

Nas células eucarióticas o estágio final da oxidação de nutrientes ocorre na mitocôndria, com a rápida oxidação de NADH e $FADH_2$ produzidos nas reações de glicólise, ciclo tricarboxílico, β -oxidação de ácidos graxos e oxidação de aminoácidos. Em nosso estudo, encontramos em todos os grupos (GC e GT's) a enzima NADH-ubiquinona oxidoreductase (Artigo # 2 Tabela 1) que tem papel fundamental na etapa inicial de transferência de elétrons na cadeia respiratória para a coenzima Q (ubiquinona) segundo (Voet, Voet & Pratt, 2000; Daria et al., 2008; Tsutsui, Kinugawa & Matsushima, 2011; Dikalov & Ungvari, 2013).

No entanto, somente no GT₃ encontramos uma maior expressão de translocases de membrana mitocondrial (Artigo # 2 Tabela 1) que estão associadas à transferência de ATP e H^+ para o citosol. Estes

achados parecem suportar a ideia do aumento da capacidade oxidativa em função do treinamento de natação aos quais os animais foram submetidos, reforçando a ideia do aumento da capacidade aeróbia. Não foi possível encontrar na literatura dados que, através do 2D-E, confirmassem estes achados.

Além disto, deve-se também observar que o aumento da síntese de ATP implica aumento da participação das superóxido dismutase, um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação (potencial redox) do radical livre do oxigênio, principalmente, a Mn-SOD (manganês superóxido dismutase) (Ravi Kiran, Subramanyan & Asha; 2004; Ravi *et al.*, 2006), estando esta enzima identificada em nosso grupo de animais.

Todos estes achados conduziram a necessidade de uma análise mais profunda do efeito do exercício sobre o proteoma mitocondrial em modelos patológicos devido a importância do exercício como forma não medicamentosa de tratamento para várias doenças cujo papel mitocondrial ainda carece de maiores esclarecimentos. O modelo escolhido para esta análise foi o SHR que apresenta claramente a HA, iniciando seu desenvolvimento entre a 5^a e 6^a semana de idade podendo apresentar valores superiores a 180 mmHg a partir da 15^a semanas de idade (Pinto, Paul & Ganten, 1998) assim, foram separados dois grupos em diferentes momentos da HA: um grupo, com 6 semanas de idade (GE₆), e outro, com 40 semanas de idade (GE₄₀), e seus respectivos controles sedentários, (GC₆ e GC₄₀). Ambos os grupos exercício foram submetidos a 5 sessões semanais de exercício forçado de moderada intensidade, durante 4 semanas (Artigo # 3 Figura 2). O objetivo desta separação foi verificar os efeitos do exercício moderado sobre o proteoma mitocondrial antes e depois do desenvolvimento da HA.

Um dos principais achados neste trabalho foi o aumento de 1,5 e 1,4 vezes, respectivamente GC₆ e GC₄₀ (Artigo # 3 Figura 1 A e B) na expressão do complexo I (NADH-ubiquinona oxireductase). O complexo I é um grande complexo enzimático que faz parte da cadeia de transporte de elétrons (CTE) na mitocôndria catalizando a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona (Q) com a translocação de

prótons através da membrana (Friedrich, 2014).

O complexo I é composto por um domínio hidrófilico que contém atividade de NADH oxidase na extremidade proximal e atividade quinona (Q) redutase, na extremidade distal, englobando ainda um mononucleótido de flavina (FMN) e uma série de aglomerados ferro-enxofre (Fe-S) com atividade redox, que conduzem elétrons do NADH para a quinona (Bazil et al., 2014). Ainda segundo os mesmos autores, o complexo I ainda é composto por outro domínio hidrofóbico de prótons cuja mecânica ainda é desconhecido, mas provavelmente envolve um mecanismo ou uma sequência de proteínas conformacionais fortemente acopladas.

Historicamente o complexo I tem sido considerado a maior fonte de EROs, (que aqui serão especificamente para o superóxido e H_2O_2), nas mitocôndrias de eucariotos (Hirst et al., 2008). Vale ainda ressaltar que EROs são moduladores cruciais da função celular. Em baixas concentrações são essenciais participantes na sinalização celular enquanto que o excesso pode perturbar a função celular normal e promover os danos celulares. Assim, um equilíbrio entre sua produção e remoção permite a função celular normal, enquanto que um desequilíbrio provoca estresse oxidativo, com consequências patológicas (Dikalov & Ungvari, 2013).

O aumento da expressão do complexo I no grupo controle vai de encontro aos achados de Korantzopoulos e cols. (2003) e Sawyer e cols. (2002) que descreveram resultados semelhantes em portadores de IC, em que pese o fato do grupo de animais jovens (GC_6) não apresentarem hipertrofia (dados não apresentados baseados na relação peso coração /peso total do animal) significativa a ponto de gerar quadros de IC. Este aspecto poderia suportar a ideia de que a HCVE é um processo associado não somente a sobrecarga pressórica, mas sim a sinalização mitocondrial.

Acredita-se que seriam dois os mecanismos de adaptação mitocondrial que poderiam contribuir

para a proteção cardíaca associada ao exercício: a diminuição da produção ou aumento da capacidade de tolerar a maior concentração de EROs; e aumento dos níveis de cálcio intra mitocondriais (Judge *et al.*, 2005; Starnes, Barnes & Olsen, 2007). Os mesmos autores relatam que em exercício voluntário em modelos animais, houve a diminuição da produção H_2O_2 em 10% nas mitocôndrias do miocárdio em comparação ao controle sedentário.

O aumento do stress oxidativo, no entanto, pode ser útil para a manutenção da homeostase celular como indica, por exemplo, a recente descrição de Prosser, Ward & Lederer (2011) do papel fisiológico das EROs em miócitos cardíacos. O estiramento da fibra ativa os receptores de rianodina (RyR2) o que resulta em um aumento da libertação de Ca^{2+} retículo sarcoplasmático que contribue para o ajuste fino das propriedades contráteis dos miócitos.

Este mesmo mecanismo parece estar associado ao aumento das concentrações de Ca^{2+} no citoplasma celular que podem atravessar a membrana externa e interna da mitocôndria a partir de canais iônicos, VDAC (Aon, Cortassa & O'Rourke, 2010). A principal força motriz para a entrada de Ca^{2+} na matriz mitocondrial é o potencial de membrana negativo em toda a membrana da matriz mitocondrial mantido pela translocação de prótons da CTE (Csordás & Hajnóczky, 2009). Devido à sua elevada condutância, os VDAC's permitem uma rápida difusão do Ca^{2+} , podendo estes ser controlados por fosforegulação, o que pode bloquear o influxo do mesmo (Sag *et al.*, 2013).

O Ca^{2+} pode ser considerado uma espada de dois gumes para as mitocôndrias. Em concentrações moderadas é responsável pela ativação da piruvato desidrogenase, resultando em aumento do potencial redox do NADH e síntese de ATP (Brookes *et al.*, 2004). Aumentos demasiados em sua concentração podem resultar numa progressiva diminuição da CTE, em função da queda no potencial de repouso da membrana da matriz mitocondrial. Este declínio gradual continua até que a alta $[Ca^{2+}]$ estimula a abertura de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTPM) resultando em um súbito colapso da

membrana, perda de produção de ATP e efluxo maciço de Ca^{2+} (Biala & Kirshenbauma, 2014).

Em nosso estudo, encontramos um aumento de 2,1 e 2,9 (respectivamente GC_6 e GC_{40}) vezes a expressão do VDAC1 (Artigo # 3 Figura 1A e B), o que parece corroborar a literatura atual indicando que este talvez seja o principal aspecto cardio-protetivo do exercício tanto no início do desenvolvimento da doença (GE_6) quanto quando os mecanismos adaptativos da mesma já estão instalados (GE_{40}). O menor influxo de Ca^{2+} (associado ao decréscimo na expressão de VDAC1) nos animais submetidos ao exercício pode estar associado a uma diminuição dos eventos apoptóticos na mitocôndria.

As mitocôndrias desempenham um papel crucial na apoptose, a morte de célula a partir da liberação de proteínas apoptogênicas, incluindo citocromo c, para o citoplasma, que ativa a cascata apoptótica (Zamzami e Kroemer, 2001). Os fatores apoptogênicos, estão todos localizados no espaço intermembranar, o que sugere que um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa é um evento chave no processo de apoptose (Martel, Wang & Brenner, 2014).

Evidências sugerem que a proteína da membrana externa envolvida na formação de PTPM consiste no canal aniônico voltagem-dependente (VDAC) (Tsujiimoto & Shimizu, 2007), cuja atividade eletrofisiológica é muito semelhante à do PTPM, sendo modulada pela disponibilidade de NADH, Ca^{2+} , glutamato ou após a ligação com a hexocinase, condições que também modulam a atividade da MPTP (Alaviana et al., 2014).

Vários modelos diferentes têm sido propostos para explicar o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, como a ruptura física da membrana, entretanto, a maioria dos modelos envolve a liberação de proteínas apoptogênicas através de canais específicos, como o canal VDAC-Bax ou de um canal criado por oligômeros de um multi-domínio membro pró-apoptótica da família Bcl-2, tais como Bax ou Bak (Shimizu, Narita & Tsujiimoto, 1999). A família Bcl-2 (B linfoma-2) é formada por um grupo de

proteínas pró-sobrevivência ou pró-apoptótica responsáveis pela regulação do MPTP bem como outros fatores de indução da morte mitocôndrial a partir do início da cascata de caspases apoptóticas (Kvansakul & Hinds, 2014). Apesar de não termos descrito em nossos achados estas proteínas podemos supor que o aumento da expressão do VDAC pode influenciar este mecanismo adaptativo. O VDAC está diretamente envolvido na regulação do MPTP durante apoptose, pois é um dos alvos funcionais da família de proteínas Bcl-2 (Tsujimoto & Shimizu, 2007). O papel do VDAC foi inicialmente sugerido pela constatação de que alguns membros da família Bcl-2, como a Bcl-xL, Bax e Bak, interagem diretamente com o VDAC (Calmettes et al., 2014). Os mesmos autores demonstraram que as ações anti-apoptóticas de Bcl-xL e pró-apoptóticas Bax (ou Bak) são antagônicas: Bcl-xL fecha o VDAC enquanto Bax/Bak, o abrem possibilitando a passagem de algumas proteínas, incluindo citocromo c. Nossos achados sugerem que o efeito cardioprotetor do treinamento físico pode ser, ao menos parcialmente, devido a uma redução na produção de EROs mitocondrial, resultando em menos influxo de Ca^{2+} , o que atenuaria abertura MPTP e diminuição da produção de ATP. Este mecanismo é consistente com os resultados de Alaviana et al. (2014), a partir da manutenção do potencial elétrico das membranas mitocondriais em função do menor influxo de Ca^{2+} .

O aumento no influxo de Ca^{2+} nos grupos controle poderia também ser responsável pela tentativa de melhoria no metabolismo oxidativo através da ativação de desidrogenases sensíveis ao cálcio, que alimentam equivalentes redutores para a ETC e a ATPsintase F1F0 (Territo *et al.*, 2000; Dedkova & Blatter, 2008). Este achado confirma-se parcialmente em nosso estudo pelo aumento da expressão da ATPase em 1,6 vezes no GC₆ quando comparado ao GC₄₀ (Artigo # 3 Figura 1A e B), o que parece demonstrar uma adaptação positiva na tentativa de aumento no oferecimento de ATP presente no início da HA onde o aumento do influxo de Ca^{2+} resultante de aumentos fisiológicos na carga de trabalho cardíaco, pode ser compensado pelo aumento do bombeamento prótonico pela ATPsintase F1F0 (Dedkova & Blatter, 2008).

Por outro lado, um dos mecanismos adaptativos encontrados foi o aumento significativo na

expressão da ATP sintase F1F0 em 2,9 e 2,4 vezes, respectivamente nos GE₆ e GE₄₀ (Artigo # 3 Figura 1A e B) como previamente descrito (Swynghedauw, 1999; Bo et al, 2008; Kraljevic *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014). Hubbard & McHugh, (1996) sugem que este aumento esta associado ao aumento na CTE em função da maior disponibilidade de Ca²⁺ em desidrogenases sensíveis a este. Assim o exercício aumentaria a disponibilidade do Ca²⁺ oriundo do retículo sarcoplasmático ou mesmo em função do aumento da descarga adrenergica em decorrência do aumento da frequência cardíaca. Sabe-se que a HA provoca uma redução na expressão do receptor ββ-adrenérgico (ββAR) e, conseqüentemente a redução na capacidade de resposta inotrópica miocárdica em resposta ao estresse simpático compensado pela calcineurina que modifica a atividade da proteína quinase A (PKA) revertendo o inotropismo cardíaco (MacDonnell *et al.*, 2007; Libonati, 2013; Sun et al., 2014). Estes achados parecem suportar os recentes indicativos do papel do Ca²⁺, como segundo mensageiro, para a regulação das tarefas mitocondriais representando um elo crucial para o metabolismo mitocondrial bem como o mecanismo acoplamento-excitação-contração no coração (Dedkova & Blatter, 2013).

6. Conclusões

Artigo #1 Determination of the Maximal Lactate Steady State in Obese Zucker Rats.

Este estudo identificou a MFEL em ratos Zucker obesos durante corrida em esteira, que foi significativamente menor do que em ratos não obesos. Este parâmetro é uma excelente ferramenta para a padronização das intensidades de treinamento corretas e seguras para estudos futuros que envolvam modelos obesos.

Artigo # 2 High molecular mass proteomics analyses of left ventricle from rats subjected to differential swimming training.

Exercício de alta intensidade demonstrou um aumento de expressão em algumas proteínas miofibrilares de alta massa molecular como α -miosina de cadeia pesada, troponina, MRS2 e NADH desidrogenase. No entanto, o exercício de alta intensidade também representou um significativo grau de lesão

celular, quando comparado aos indivíduos dos grupos submetidos a leve e moderada intensidade. O aumento na expressão da cadeia pesada de miosina sugere um o aumento da eficiência do coração demonstrando uma clara correlação com o padrão de intensidade ao quais os indivíduos foram submetidos. Exercícios de alta intensidade parecem representar um grau significativo de lesão celular, quando comparado aos indivíduos submetidos à baixa e moderada intensidade o que pode, em longo prazo, representar perda de capacidade contrátil e conseqüentemente diminuição funcional. Estes dados parecem ser corroborados pelo aumento da expressão da troponina, no grupo submetido à alta intensidade, outro achado importante em nosso estudo.

Artigo # 3 Effect of moderate exercise on mitochondrial proteome in heart tissue of hypertensive models

Este trabalho demonstrou a redução da abundância de complexo I, a diminuição na expressão do VDAC, e o aumento na ATP sintase (entre duas e três vezes) em ambos os grupos submetidos a exercício de moderada intensidade (GE₆ e GE₄₀) em esteira rolante quando comparado com aos respectivos grupos controle, sugerindo que o exercício reduz os efeitos deletérios da hipertensão sobre a mitocôndria do miócito cardíaco, nos levando a crer que o exercício é capaz de modular efeitos cardio protetivos por uma possível diminuição da apoptose mitocondrial associado à redução do MPTP de Ca²⁺, e sem dúvida, o aumento na produção de ATP, o que poderia ser considerado o principal marcador mitocondrial de eficiência do treinamento.

7. Bibliografia

Adlam VJH, Porteous J, James CM, Smith AM et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2005, 19(9): 1088-1095.

Alaviana KN, Beutner G, Lazrova E et al. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore *Proc Nat Acad Sci* 2014, 111(29) 10580-585.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, et al. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity: Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009, 120:1640-1645.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: IDF Epidemiology Task Force Consensus Group: The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *Lancet* 2005, 366:1059-1062.

Andersson C, Gislason GH, Weeke P, Kjaergaard J. et al. The prognostic importance of a history of hypertension in patients with symptomatic heart failure is substantially worsened by a short mitral inflow deceleration time. *BMC Cardiovasc Disord* 2012, 12, 30-34.

Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Redox-optimized, R.O.S. balance: a unifying hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1797:865-877.

Aschner P: Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010, 8:407-412.

Baines Christopher P.. The Cardiac Mitochondrion: Nexus of Stress. *Annu. Rev. Physiol.* 2010. 72: 61-80.

Barros Neto TL, Camarda SR, Tebexreni AS, Páfaró CN et al. Comparison of maximal heart rate using the prediction equations proposed by Karvonen and Tanaka. *Arq Bras Cardiol.* 2008, 91(5):311-4.

Barry SP, Davidson SM, Townsends PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy *Int Journal of Bio & Cell Biol* 2008, 40: 2023-2039

Baseler WA, Dabkowski ER, Williamson CL et al. Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart: contribution of protein import dysfunction. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2011, 300(2): R 186-200.

Bauml MA & Underwood DA. Left ventricular hypertrophy: an overlooked cardiovascular risk factor. *Cleve Clin J Med*, 2010, 77. 381-7.

Bazil JN, Pannala VR, Dash RK, Beard DA. Determining the origins of superoxide and hydrogen peroxide in the mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase *Free Radl Biol Med* 2014, 77: 121-129.

Beneke R , Leithauser R M , Ochentel O . Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. *Int J*

Sports Physiol Perform 2011, 6: 8-24

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007, 128:669-81.

Biala AK & Kirshenbaum LA The interplay between cell death signaling pathways in the heart. *Trends Cardiovasc Med.* 2014, 14: S1050-57.

Blanc J, Lambert G & Elghozi JL. Endogenous renin and related short-term blood pressure variability in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 2000, 394: 311-20.

Bo H, Jiang N, Ma G et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: Role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2 *Free Radical Biology & Medicine* 2008 44: 1373-81.

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287: 817-833.

Borbély A, Papp Z, Edes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep.* 2009, 61(1):139-45.

Bugaisky LB, Gupta M, Gupta MO, Zak R. Cellular and molecular mechanisms of cardiac hypertrophy. In: *The heart and cardiovascular system*, 2. ed. HA Fozzard et al. (eds.). New York, Raven Press, 1992, 1621-40.

Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010, 85:376-C384.

Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics* 2009, 9:106-115

Calmettes G, Ribalet B, John S, Korge P, Ping P, Weiss JN. Hexokinases and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Sep 26. pii: S0022-2828(14)

Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ: The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004, 33:351-375.

Calvo SE & Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010, 11: 25-44.

Carretero OA and Opari S. Essential Hypertension : Part I: Definition and Etiology. *Circulation.* 2000a;101:329-335

_____. Essential Hypertension : Part II: Treatment *Circulation.* 2000b;101:446-453

Chen YR & Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014, 114(3):524-37

Chang Y, Yu T, Yang H, Peng Z. Exhaustive Exercise-Induced Cardiac Conduction System Injury and Changes of cTnT and Cx43. 2014 Sep 25.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a

support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003, 163(5):1133-43.

Cingolani OH, Yang XP, Cavaşin MA and Carretero OA. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003, 41(2):249-254.

Chen X, Li J, Hou J, Xie Z et al. Mammalian mitochondrial proteomics: insights into mitochondrial functions and mitochondria-related diseases. *Expert Rev Proteomics* 2012, 7:333-45.

Csordás G and Hajnóczky G SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1787(11): 1352-1362.

Cubedo J, Padró T, Badimon L. Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: the implication of serum amyloid P-component. *Int J Cardiol.* 2013,168(6):5196-204.

Daria E, Martin SK, Gregory Y and Judy H. Production of reactive oxygen species by complex 227 I (NADH:Ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme 228 from mitochondria. *Biochemistry* 2008; 47: 3964-71.

[De Giusti VC](#), Caldiz CI, Ennis IL, Pérez NG et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS). *Front Physiol.* 2013, 30(4):126-32.

Dedkova EN and Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria *Mol Cell Cardiol.* 2013, 58: 125-133.

_____. Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium* 2008 44: 77-91

Demirel HA, Powers SK, Caillaud C et al. Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc* 1998, 30: 1211-1216.

Di Domenico M, Casadonte R, Ricci P, Santini M et al. Cardiac and skeletal muscle expression of mutant β -myosin heavy chains, degree of functional impairment and phenotypic heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cell Physiol.* 2012, 227(10):3471-6

Dickhout JG, Lee RM Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997,29(3):781-9.

Diffie GM, Chung E. Altered single cell force-velocity and power properties in exercise-trained rat myocardium. *J Appl Physiol* 2003, 94(5):1941-8.

Dikalov SI and Ungvari Z. Mitochondria in Cardiovascular Physiology and Disease Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 305: H1417-H1427.

Doggrell SA & Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 1998, 39: 89-105.

Doumas M, Tsioufis C, Faselis C, Lazaridis A, Grassos H, Papademetriou V. Non-interventional management of resistant hypertension *World J Cardiol* 2014, 6(10): 1080-1090.

Drinkard B, Roberts MD, Ranzenhofer LM et al. Oxygen-uptake efficiency slope as a determinant of fitness in overweight adolescents. *Med Sci Sports Exerc.* 2007,39(10):1811-6.

Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C. et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991, 69:483-490.

Elliott WJ, Weir DR, Black HR. Cost-effectiveness of the lower treatment goal (of JNC VI) for diabetic hypertensive patients. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med.* 2000, 160(9):1277-83.

Else, T.,Williams, A.R., Sabolch, A., Jolly, S. et al. Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014, 99: 455-461.

Ernster L and Schatz G Mitochondria: A Historical Review. *The Journal of Cell Biology* 1981, 91(3) 2276-255s.

Fazan Jr, R, Silva VJD, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial *Rev Bras Hipertens* , 2001 8:19-29.

Fliser D, Veldhuis JD, Dikow R, Schmidt-Gayk H et al. Effects of acute ACE inhibition on pulsatile renin and aldosterone secretion and their synchrony. *Hypertension*, 1998, 32:929-34.

Folmes CD, Sawicki G, Cadete VJ, Masson G et al. Novel O-palmitoylated beta-E1 subunit of pyruvate dehydrogenase is phosphorylated during ischemia/reperfusion injury. *Proteome Sci* 2010, 8:38-45.

Fosslien E. Review: Mitochondrial medicine cardiomyopathy caused by defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2003, 33:371-95.

Funck RC, Wilke A, Rupp H & Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol* 1997, 432: 35-44.

Feitosa ACR, Mancini MC, Cercato C, Villares SM, Halpern A. Metabolic profile according to leptin levels in obese patients *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007, 51(1):59-64.

Ferreira CL, Armaganijan D, Gowdak L, Mansur A et al Guideline for Stable Coronary Artery Disease.*Arq Bras Cardiol.* 2014 103(Suppl 2):1-59.

Ferrari P, Krozowski Z. Role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney Int* 2000; 57:1374-81.

Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Sex differences in exercise-induced cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch.* 2013, 465(5):731-7.

Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001 8:125-42.

Franchini S, Savino A, Marcovecchio ML, Tumini S. et al The effect of obesity and type 1 diabetes on renal function in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2014 Aug 11. doi: 10.1111/pedi.12196.

- Frey N and Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly *Annual Review of Physiology* 2003, 65: 45-79.
- Friedrich T. On the mechanism of respiratory complex I. 2014, 46(4):255-68.
- Friso S, Carvajal CA, Fardella CE and Olivieri O. Epigenetics and arterial hypertension: the challenge of emerging evidence. *Translational Research* 2014, 1: 1-12.
- Fukai T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers QT, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NAD(P) H oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997;80:45-51.
- Garcia JA & Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol* 2010, 90: 409-16.
- Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Bogoyevitch MA, Cowley S, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1995, 270(47):28092-6.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014, 129: e28-e292.
- Ghorayeb N, Batlouni M, Pinto IM, Dioguardi GS. Left ventricular hypertrophy of athletes: adaptative physiologic response of the heart *Arq Bras Cardiol.* 2005 85(3):191-7.
- Gosse P. Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl.* 2005, 23: S27-33.
- Gray MW and Doolittle WF. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* 1982, 46:1-42.
- Grundy SM: Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59:635-643.
- Guelfi KJ, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA et al. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006, 33(10):952-7.
- Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure *J Mol Cell Cardiol.* 2007, 43(4): 388-403.
- Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ Jr. Obesity-induced hypertension: renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 1993, 22: 292-9.
- Halpern A, Mancini MC, Magalhães ME, Fisberg M et al. Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. *Diabetol Metab Syndr.* 2010, 2:55-64.
- Hanninen SLR, Leskinen JJ & Tavi P. Mitochondrial uncoupling downregulates calsequestrin expression and reduces SR Ca²⁺ stores in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2010 88(1): 75-82.

Hausenloy DJ & Ruiz-Meana M. Not just the powerhouse of the cell: emerging roles for mitochondria in the heart. *Cardiovasc Res* 2010, 88:5-6.

Hansen D, Marinus N, Remans M, Courtois I, Cools F, Calsius J, Massa G and Takken T. Exercise tolerance in obese vs. lean adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews* 2014, 15: 894-904.

Hashimoto M, Chen PC, Mitchell MW, Nikitopoulos DE, Soper SA, Murphy MC. Rapid PCR in a continuous flow device. *J Appl Physiol* 2004, 4(6):638-45.

Hendrik R. Taal, Germaine C. Verwoert, Ayse Demirkan, A. et al.. Genome-Wide Profiling of Blood Pressure in Adults and Children. *Hypertension*. 2012, 59:241-247.

Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D. et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*. 2014, 383(9932):1933-43.

Hickson RC, Hagberg JM, Conlee RK, Jones DA, Ehsani AA, Winder WW. Effect of training on hormonal responses to exercise in competitive swimmers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1979, 41(3):211-9.

Hill JA, Karimi M, Kutschke W et al., Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* 2000, 101 (24) 2863-2869.

Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991, 353: 521-9.

Hinken AC, Korte FS, McDonald KS. Porcine cardiac myocyte power output is increased after chronic exercise training. *J Appl Physiol* 2006, 101(1):40-6.

Hirst J, King MS and Pryde KR The production of reactive oxygen species by complex I *Biochem Soc Trans* (2008) Volume 36, part 5

Hollander JM, Baseler WA & Dabkowski ER. Proteomic remodeling of mitochondria in heart failure. *Congest Heart Fail* 2011, 17:262-8.

Hoppe, U. C. Mitochondrial calcium channels *FEBS Letters* 2010, 585:1975-1981.

Hubbard MJ, McHugh NJ. Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett* 1996, 391(3):323-9.

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1976, 251:5069-77.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T et al. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 286(5):H1696-705.

Jorge AJ. Estudo da prevalência de insuficiência cardíaca em indivíduos cadastrados no programa médico de família - Niterói. estudo digitalis: desenho e método. *Rev Bras Cardiol*. 2011, 24(5) 320-25.

Joumaa WH, Bouhlel A, Mème W, Léoty C. Methyl jasmonate-induced stimulation of sarcoplasmic

reticulum Ca(2+)-ATPase affects contractile responses in rat slow-twitch skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 300(2):638-46.

Judge S, Jang YM, Smith A, et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 289: R1564-R1572. Kapur S, Aistrup GL, Sharma R, Kelly JE et al. Early development of intracellular calcium cycling defects in intact hearts of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, 299(6):H1843-53.

Karlson BM, Lofberg AM, Lorelius LE, Jacobson G et al. Intra arterial chemoembolisation with lipiodol and epirubicin in hepatocellular cancer improved survival in some patients? *Ann Chir Gynaecol* 1999, 88: 264-8.

Kava RA Turkenkopf IJ, Feldweg A, Horowitz C et al. Zucker and Wistar diabetic fatty rats show different response to adrenalectomy. *Am J Physiol.* 1991, 261(4 Pt 2):R912-9.

Kavazis ANS, Min AJ, Tumer K & Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, 299(5): H1515-1524.

Kettlewell S, Cabrero P, Nicklin SA, Dow JTA et al. Changes of intra-mitochondrial Ca²⁺ in adult ventricular cardiomyocytes examined using a novel fluorescent Ca²⁺ indicator targeted to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol* 2009, 46: 891-901.

Kemi O J, Macquaide N, Hoydal MA, Ellingsen O, Smith GL and Wisloff U. Exercise training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats *J Cell Physiol.* 2012, 227(1) 20-26.

Királya MA, Batesa HE, Yuea JTY, Goche-Montesa D, Fediucd S, Parka E et al. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. *Metab Clin Exp.* 2007, 56:732-744.

Kirkwood SP, Packer L & Brooks GA. Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *Am J Physiol* 1986, 251: C395-C402.

Kmieć AZ. Age-related changes of skeletal muscles: physiology, pathology and regeneration. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2012, 66:392-400.

Kolwicz SC, MacDonnell SM, Renna BF et al. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009, 297(4): H1361-8.

Komolova M, Friberg P. & Adams MA. Altered vascular resistance properties and acute pressure-natriuresis mechanism in neonatal and weaning spontaneously hypertensive rats. *Hypertension,* 2012, 59:979-84.

Korantzopoulos, P.; Galaris, D.; Papaioannides, D.; Siogas, K. The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med. Sci. Monit.* 2003, 9:120-125.

Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart *Cardiovasc Res* 2013, 99: 55-64.

- Kurland CG & Andersson SG. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64:786-820.
- Kvansakul M, Hinds MG. The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. 2014 Nov 15.
- Lazar JM, Khanna N, Chesler R, Saliccioli L. Swimming and the heart *International Journal of Cardiology* 2013, 168:19-26.
- Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan SH et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2013, 23:566-573.
- Lerman LO, Chade AR, Sica V & Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 2005, 146:160-73.
- Leischik R, Spelsberg N, Niggemann H, Dworrak B, Tiroch K. Exercise-induced arterial hypertension - an independent factor for hypertrophy and a ticking clock for cardiac fatigue or atrial fibrillation in athletes? *F1000Res*. 2014, 12(3):105.
- Li C, Qiu Q, Wang Y, Li P et al. Time course label-free quantitative analysis of cardiac muscles of rats after myocardial infarction. 2013, 168(6):5196-204.
- Liang M, Cowley AW Jr, Mattson DL, Kotchen TA, Liu Y. Epigenomics of hypertension. *Semin Nephrol* 2013, 33:392-9.
- Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. *ISRN Hypertension* Volume 2013, Article ID 980824, 9 pages. disponível em: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/980824>
- Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996, 272:676-80.
- Lips DJ, Dewindt LJ, Van Kraaij DJ & Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003, 24:883-96.
- Littlejohns B, Pasdois P, Duggan S, Bond AR, Heesom K, et al. (2014) Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. *PLoS ONE* 2014, 9(6): e100579.
- Liu X, Pollack GH. Stepwise sliding of single actin and Myosin filaments. *Biophys J*. 2004, 86(1):353-8.
- Lorell BH & Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000, 102:470-9.
- Lu MC, Tzang BS, Kuo WW, Wu FL et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity* 2007, 15:2634-42.
- Lyon D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB et al. The Progression From Hypertension to Congestive Heart Failure. *JAMA*. 1996, 275(20):1557-1562.
- MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM et al., Calcineurin inhibition normalizes β -adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 2007, 293(5) H312-H319.
- Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV et al. Obesidade e Doenças Associadas. In: Mancini MC,

Geloneze B, Salles JEN, Lima JG, Carra MK. Tratado de Obesidade. Itapevi: AC Farmacêutica. 2010, 253-264.

Marcil M, Bourduas K, Ascah A, Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decreases in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 290: H1549-H1557.

Margulis, L. 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, Conn.

Marin-Garcia J, Akhmedov AT & Moe GW. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Fail Rev.* 2013, 18(4):439-56.

Markova PIB, Popov D & Girchev R. Heart rate variability during NOS inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Trakia J of Sci* 2010, 8: 4-10.

Martel C, Wang Z, Brenner C. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion.* 2014 Aug 1.

Martinez-Aguayo A, Fardella C. Genetics of hypertensive syndrome. *Horm Res* 2009, 71:253-9.

McCormack, J.G., Halestrap, A.P. and Denton, R.M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 1990, 70:391-425.

McKinsey TA & OLSON EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes *J Clin Invest.* 2005 15(3):538-C546.

Medeiros PT, Martinelli Filho M, Arteaga E, Costa R et al. Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of arrhythmic events in patients at risk for sudden cardiac death. *Arq Bras Cardiol.* 2006, 87(5):649-57.

Mendizábal Y, Llorens S & Nava E. Hypertension in metabolic syndrome: vascular pathophysiology. *Int J Hypertens.* 2013, 2013:230868

Milani RV, Lavie CJ, Mehra MR, Ventura HO, Kurtz JD, Messerli FH. Left ventricular geometry and survival in patients with normal left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol.* 2006, 97:959-963.

Mill JG & Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens* 2001, 8: 63-75.

Mills GD, Kubo H, Harris DM, Berretta RM et al. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 291(1):H61-70.

Muntner P, Woodward M, Mann D, Shimbo D et al. Comparison of the framingham heart study hypertension model with blood pressure alone in the prediction of risk of hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) *Hypertension.* 2010, 55(6): 1339-C1345.

Millis RM. Epigenetics and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2011, 13:21-C8

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL et al., A calcineurin dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998, 93(2): 215-228.

_____. Calcineurin NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research* 2004, 63(3): 467-475.

Montezano AC & Touys RM. Oxidative stress, NOx and hypertension: Experimental evidences and clinical controversies. *Ann Med.* 2012, 44(8): 854-8.

Monticone S, Else T, Mulatero P, Williams TA et al. Understanding primary aldosteronism: Impact of next generation sequencing and expression profiling. *Mol Cell Endocrinol.* 2014, (14) S0303-7207

Mulatero P, Monticone, S., Bertello, C. et al. Long term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013, 98(12):4826-33.

_____, Morello, F., Veglio, F., Genetics of primary aldosteronism. *J. Hypertens.* 2004 22: 663-670.

Muller DN, Kvakan H, Luft FC. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011, 20:113-7.

Murdolo G, Angeli F, Reboldi G, et al. Left Ventricular Hypertrophy and Obesity: Only a Matter of Fat? *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2014, Aug 13.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, et al. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88:10045-8.

Natali A Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004, 33(2):417-29.

Noda K, Zhang B, Iwata A, Nishikawa H et al. Lifestyle changes through the use of delivered meals and dietary counseling in a single-blind study. The STYLIST study. *Circ J* 2012, 76, 1335-44.

Oigman W, Fritsch M and Neves T. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda *Rev Bras Hipertens* 2000, 3: 261-7.

Okamoto K & Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963, 27: 282-93.

Ong SSS, Lim S, Yellon DM, Davidson SM et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2010, 121 :2012-C2022.

Park MH, Falconer C, Viner RM. & Kinra S. The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: a systematic review. *Obes Rev.* 2013, 13(11) 985-1000.

Peng Y, Ayaz-Guner S, Yu D, Ge Y. Top-down mass spectrometry of cardiac myofilament proteins in health and disease. 2014, 4;10(3):505-13.

Petriz BA and Franco OC. Effects of hypertension and exercise on cardiac proteome remodelling. *BioMed Research International* Volume 2014, 2014 ID 634132.

Philp A, Rowland T, Perez-Schindler J, and Schenk S. Understanding the acetylome: translating targeted proteomics into meaningful physiology *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014, 307(9): C763-C773.

Pinter RCCE, Padilha AS, Oliveira EM, Vassallo DV, et al. Cardiovascular adaptive responses in rats submitted to moderate resistance training. *Eur J Appl Physiol.* 2008, 103(5):605-13.

Pinto YM, Paula M and Gantena D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* 1998, 39: 77-88.

Plourde B, Sarrazin JF, Nault I, Poirier P. Sudden cardiac death and obesity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014, 12(9):1099-110.

Pluim BM, Swenne CA, Zwinderman AH, Maan AC, van der Laarse A, Doornbos J, Van der Wall EE. Correlation of heart rate variability with cardiac functional and metabolic variables in cyclists with training induced left ventricular hypertrophy. *Heart.* 1999, 81(6):612-7.

Prada FJ, Macedo DV, Mello MA. Evaluation of a protein deficient diet in rats through blood oxidative stress biomarkers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2003,113-114:213-28.

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJX. ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 333:1440~C1445;2011. proton flux through the ATP synthase. *Curr Biol* 2008, 18:855~C859.

Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M et al. Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* 1998, 19:1006-14.

Raftopoulos L, Katsi V, Makris T et al. Epigenetics, the missing link in hypertension. 2014 Aug 13. pii: S0024-3205(14)00675-4.

Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, et al. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension.* 2004, 45:9-14.

Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004,137(2):187-96.

Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Prathima S, Asha Devi S. Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress. *J Comp Physiol B.* 2006,176(8):749-62.

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001, 52: 35-41.

Ritter O, Neyses L The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med.* 2003, 9(7):313-21.

Romanowskia A, Murray JR, Huston MJ. Effects of hydrogen peroxide on normal and hypertensive rats. *Pharm Acta Helv* 1960, 35:354-7.

Rocchini AP, Key J, Bondie D, Chico R et al. The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *N Engl J Med* 1989, 321: 580-5.

Rosca MG Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008, 80(1):30-9.

Rosca MG & Hoppel CL. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010, 88:40-50.

Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL, et al. Neural mechanism in human obesity-related hypertension. *J Hypertens* 1999, 17: 1125-33.

Sag CM, Wolff HA, Neumann K, Opiela M et al. Ionizing radiation regulates cardiac Ca handling via increased ROS and activated CaMKII. *Basic Res Cardiol*. 2013, 108(6):385.

Saris, N.E. L. and Carafoli, E. A Historical Review of Cellular Calcium Handling, with Emphasis on Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70 (2); 187-194.

Sárközy M, Zvara A, Gyémánt N, Fekete V, Kocsis GF et al. Metabolic syndrome influences cardiac gene expression pattern at the transcript level in male ZDF rats Cardiovascular. *Diabetology*, 2013, 12:16

[Staunton L](#), O'Connell K & Ohlendieck K. Proteomic Profiling of Mitochondrial Enzymes during Skeletal Muscle Aging. *J Aging Res*. 2011, 7;2011:908035.

Savard, S., Amar, L., Plouin, P.F., Steichen, O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension*. 2013, 62: 331-336.

Sawyer, DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR et al. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2002, 34: 379-388.

Scheuer J, Malhotra A, Hirsch C, Capasso J et al. Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest*. 1982, 70(6):1300-5.

Schlüter KD, Schreckenber R and Rebelo RMC. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies *Hypertension Research* 2010, 33(11) 1155-1161.

Schuman ML, Landa MS, Toblli JE, Peres Diaz LS et al. Cardiac thyrotropin-releasing hormone mediates left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2011, 57(1):103-9.

Seidl J, Asplund CA. Effects of excessive endurance activity on the heart. *Curr Sports Med Rep* 2014, 13(6):361-364.

Shekar KC, Li L, Dabkowski ER et al. Cardiac mitochondrial proteome dynamics with heavy water reveals stable rate of mitochondrial protein synthesis in heart failure despite decline in mitochondrial oxidative capacity *J Mol Cell Cardiol* 2014, 75: 88-97.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature* 1999, 399: 483-487.

Shishkin SS, Kovalyov LI & Kovalyova MA. Proteomic Studies of Human and Other Vertebrate Muscle Proteins *Biochemistry (Moscow)* 2004, 69(11): 1283-1298.

Srinivas P, Manjunath CN, Banu S, Ravindranath KS Prognostic significance of a multimarker strategy of biomarkers in acute heart failure. *J Clin Diagn Res*. 2014, 8(9):MC01-6.

Shu-Shan Z, Jian-Jun D, Cai-Feng W, Ting-Yu Z, De-Fu Z. Comparative proteomic analysis of hearts of adult SCNT Bama miniature pigs (*Sus scrofa*). 2014, 8(7-8):554-68.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensao. *Arq Bras Cardiol*. 2006, 1:48-

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Rev Bras Hipertens. 2010, 17(1):11-17.

Stamler RO, Ford CE, Stamler J. Why do lean hypertensives have higher mortality rates than other hypertensives: findings of the Hypertension Detection and Follow-up Program. Hypertension. 1991, 17:553-564.

Stanley JC, Samson RH. Treatment of hypertension from volume to vasoconstriction: The ACE up your sleeve. Semin Vasc Surg. 2002, 15(4):225-36.

Starnes JW, Barnes JD and Olsen ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. Appl Physiol 2007, 102:1793-1798.

Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E et al. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. Circ Res 2009,105: 527-536.

Sun P, Yan H, Ranadive SM et al. Blood Pressure Changes Following Aerobic Exercise in Caucasian and Chinese Descendants. Int J Sports Med 2014 Oct

Surya S, Horowitz JF, Goldenberg N, Sakharova A, Harber M, Cornford AS, Symons K, Barkan AL.J The pattern of growth hormone delivery to peripheral tissues determines insulin-like growth factor-1 and lipolytic responses in obese subjects. Clin Endocrinol Metab. 2009, 94(8):2828-34.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling Physiological Reviews 1999, 79(1):215-62.

Takatsu M, Nakashima C, Takahashi K, Murase T, Hattori T et al. Calorie Restriction Attenuates Cardiac Remodeling and Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Metabolic Syndrome Hypertension. 2013, 62:957-965.

Taal HR, van den Hil LC, Hofman A, van der Heijden AJ, Jaddoe VW. Genetic variants associated with adult blood pressure and kidney function do not affect fetal kidney volume. The Generation R Study. Early Hum Dev. 2012, 88(9):711-6.

Tang Y, Mi C, Liu J, Gao F, and Long J. Compromised mitochondrial remodeling in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. Cardiovasc Pathol. 2014, 23: 101-106.

Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. Ca²⁺ Activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. Am J Physiol Cell Physiol 2000, 278:C423-C435.

Tingting L, Le C, Kime E et al. Anne A. Knowlton Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure Life Sciences 2014, 101: 27-36A

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 2004,122:339-352.

Tsutsui H, Kinugawa S and Matsushima S. Oxidative stress and heart failure Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011, 301: H2181-H2190.

- Tsujimoto Y & Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 2007, 12(5):835-40.
- Turer AT, Malloy CR, Newgard CB & Podgoreanu MV. Energetics and metabolism in the failing heart: important but poorly understood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010, 13:458-65.
- Urbonavicius S, Wiggers H, Bøtker HE, Nielsen TT et al. Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. *Acta Cardiol*. 2009, 64(4):511-22.
- Uretsky S, Messerli FH, Bangalore S, et al. Obesity paradox in hypertension and coronary artery disease. *Am J Med*. 2007, 120:863-870.
- van Gorp AW, Schenau DS, Hoeks AP, Boudier HA et al. In spontaneously hypertensive rats alterations in aortic wall properties precede development of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ* 2000, 278(4) H1241-7.
- van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. [Circulation](#). 2008, 117(1):43-51.
- van Lieshout J, Wensing M & Grol R. Improvement of primary care for patients with chronic heart failure: a pilot study. *BMC Health Serv Res*. 2010, 10:8-16.
- Vaughan CJ, Delanty N. Hypertensive emergencies. *Lancet* 2000, 356(9227):411W7.
- Vivanco F, Martin-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG et al. Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J. Proteome Res*. 2005, 4:1181~C91.
- Voet D, Voet J, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica - a vida em nível molecular*. 4ª edição, 2000. Ed. Artmed
- Wan W, Xu X, Zhao W, Garza MA et al. Exercise training induced myosin heavy chain isoform alteration in the infarcted heart. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014, 39(2):226-32
- Wang X, Snieder H. Genome-wide association studies and beyond: what's next in blood pressure genetics? *Hypertension* 2010, 56:1035-7.
- Wassertheil-Smoller S, Fann C, Allman RM. et al; for the SHEP Cooperative Research Group. Relation of low body mass to death and stroke in the systolic hypertension in the elderly program. *Arch Intern Med*. 2000, 160:494-500.
- Whelton A.J COX-2-specific inhibitors and the kidney: effect on hypertension and edema. *Hypertens Suppl*. 2002, 20(6):S31-5.
- Wilkins K, Campbell NR, Joffres MR et al. Blood pressure in Canadian adults. *Health Rep*. 2010, 21(1):37-46.
- Williams B. The year in hypertension. *JACC*. 2010, 55(1):66-73.
- Yamazaki T, Komuro I and Yazaki Y. Signalling Pathways for Cardiac Hypertrophy *Cell. Signal* 1998, 10(10) 693-698.

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Role of the renin–Angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 1999, 83:53-7.

Yang DY, Oyaizu H, Oyaizu G, Olsen J and Woese CR. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82:4443-4447.

Yi, M., Weaver, D. and Hajnoczky, G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J. Cell. Biol.* 2004, 167: 661-672.

Yoshihide T, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis *Biochimie* 2002, 84 187-193.

Zamorano-León JJ, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ et al. A proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats *Cell Physiol Biochem* 2010, 25:347-358.

Zamzami N and Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens, *Nat. Rev.* 2001, 2: 67-71.

Zubcevic J, Waki H, Raizada MK, Paton JF. Autonomic-immune-vascular interaction: an emerging concept for neurogenic hypertension. *Hypertension* 2011, 57:1026-33.

Zucker, L. and Antoniades H., Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat “fatty”. *Endocrinol.* 1972, 90:1320-1330.

8. Anexos

Artigo #1 Determination of the Maximal Lactate Steady State in Obese Zucker Rats

Artigo # 2 High molecular mass proteomics analyses of left ventricle from rats subjected to differential swimming training.

Artigo #3 Effect of moderate exercise on mitochondrial proteome in heart tissue of hypertensive models.

Artigo #4 Proteomics Applied to Exercise Physiology: A Cutting-Edge Technology
Mitochondrial Proteomics: From Structure to Function