

Determinantes Moleculares da Hipertrofia Cardíaca Induzida por Diferentes Volumes de Treinamento Aeróbio

Molecular Determinants of Cardiac Hypertrophy Induced by Different Amounts of Aerobic Exercise Training

3

Nara Yumi Hashimoto, Tiago Fernandes, Úrsula Paula Reno Soci, Edilamar Menezes de Oliveira

Resumo

Fundamentos: O treinamento físico aeróbio (TF) acarreta adaptações cardiovasculares, dentre as quais se destaca a hipertrofia cardíaca (HC). Marcadores moleculares são apontados na distinção da HC fisiológica da patológica.

Objetivo: Investigar a magnitude de HC induzida por diferentes volumes de TF, verificando se estas respostas adaptativas estão associadas a marcadores moleculares de HC patológica.

Métodos: Vinte e uma ratas Wistar foram separadas em três grupos: sedentárias-controle (SC), treinadas protocolo 1 (P1), treinadas protocolo 2 (P2). P1: treinamento de natação durante 60min, 1x/dia, 5dias/semana/10 semanas, com 5% de sobrecarga. P2: o mesmo de P1 até a 8ª semana; na 9ª semana os animais treinaram 2x/dia, e na 10ª semana 3x/dia.

Resultados: O TF promoveu bradicardia de repouso, HC, aumento da tolerância ao esforço e consumo de oxigênio de pico no grupo P1, sendo estas adaptações exacerbadas para P2. A expressão gênica de α -miosina de cadeia pesada (MHC), β -MHC, α/β -MHC, fator natriurético atrial (ANF) e α -actina esquelética não mudou no P1. Em P2 houve melhora neste perfil genético com aumento na expressão gênica da α -MHC, redução de β -MHC, aumento da α/β -MHC e redução da α -actina esquelética. O aumento de atividade da proteína quinase-B (Akt) ocorreu de forma dependente ao volume de TF.

Conclusões: A magnitude da HC foi dependente do aumento do volume de TF e os mecanismos moleculares por ele ativados são diferentes dos encontrados na HC patológica, conferindo-lhes o caráter de HC fisiológica.

Palavras-chave: Exercício aeróbio; Hipertrofia ventricular esquerda; Marcadores biológicos; Proteínas quinases

Abstract

Background: Aerobic exercise training (ET) induces cardiovascular adaptations, including cardiac hypertrophy (CH). Molecular markers differentiate between physiological and pathological CH.

Objective: To investigate the amount of CH induced by different amounts of ET, ascertaining whether these adaptive responses are associated with pathological CH molecular markers.

Methods: Twenty-one female Wistar rats were divided into 3 groups: sedentary control (SC), trained protocol 1 (T1) and trained protocol 2 (T2). T1: swimming for 60 min, 1x/dayx10 weeks, with 5% workload. T2 was the same as T1 until the 8th week, with training 2x/day in the 9th week and 3x/day in the 10th week.

Results: ET promoted resting bradycardia, CH, increased effort tolerance and peak oxygen uptake in the T1 group, with these responses increased in the P2 group. In T1 the cardiac gene levels of α -myosin heavy chain (MHC), β -MHC, α/β -MHC, atrial natriuretic factor (ANF) and skeletal α -actin did not change, with an improvement in this genetic profile noted in T2 with increased α -MHC, lower β -MHC, higher α/β -MHC and lower skeletal α -actin. Protein kinase B (Akt) activity increased in parallel to the amount of ET.

Conclusions: The magnitude of the CH was dependent on the increase in the amount of ET and the molecular markers that it activates differ from those found in pathological CH, thus indicating physiological CH.

Keywords: Aerobic exercise; Hypertrophy, left ventricular; Biologic markers; Protein kinases

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício - Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo (USP) - São Paulo, SP - Brasil

Correspondência: Edilamar Menezes de Oliveira | Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo | Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano | Av. Professor Mello Moraes, 65 - Butantã - 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
E-mail: edilamar@usp.br

Recebido em: 02/05/2011 | Aceito em: 03/06/2011

Introdução

O termo “coração de atleta” é utilizado para caracterizar mudanças que ocorrem no coração causadas pelo treinamento físico (TF) em atletas. A hipertrofia cardíaca (HC) induzida pelo TF é importante mecanismo compensatório ao aumento de sobrecarga imposta ao coração, ocorrendo pela necessidade do órgão de ajuste para suportar novas cargas de trabalho¹⁻³. Essa adaptação contribui para o aumento do consumo de oxigênio (VO₂) de pico no exercício, participando da melhora da capacidade aeróbia⁴.

A HC é dependente do tipo de exercício realizado. Exercícios aeróbios promovem sobrecarga de volume ou aumento de pré-carga sobre o miocárdio, induzindo a hipertrofia excêntrica. Nesta, ocorre à adição de sarcômeros em série resultando em aumento da câmara cardíaca sem prejuízo de função¹⁻⁵. Exercícios resistidos, como o levantamento de peso, levam à sobrecarga pressórica ou aumento de pós-carga, desenvolvendo hipertrofia concêntrica, com aumento na espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE) e adição de sarcômeros em paralelo, sem alteração do tamanho da câmara cardíaca ou prejuízo da função¹⁻⁵.

Uma das diferenças entre a HC fisiológica e patológica pode consistir no tempo de estímulo. Na patologia o coração trabalha continuamente contra uma sobrecarga pressórica ou volumétrica aumentada, e no TF esse estímulo ocorre de forma intermitente^{3,6,7}.

Estudos apontam para determinantes moleculares na distinção dessas hipertrofias. Nesse sentido, a hipertrofia patológica é associada a alterações na expressão do gene da miosina de cadeia pesada do tipo beta (β -MHC) e alfa (α -MHC), acompanhada pela reexpressão de genes de reprogramação fetal como o da alfa-actina esquelética (α -actina esquelética) e fator natriurético atrial (ANF)^{8,9}. Por outro lado, o TF normaliza esses níveis gênicos em patologias, indicando que a hipertrofia mediada pelo TF apresenta um perfil molecular diferente do encontrado em doenças cardíacas^{10,11}.

Além disso, a proteína quinase-B, conhecida como PKB ou Akt, é outro crítico determinante da via de sinalização intracelular da HC fisiológica induzida pelo TF. Em situações patológicas esta via não é ativada, sugerindo que a sinalização mediada pela via da Akt também é um diferenciador entre a HC patológica e a fisiológica¹²⁻¹⁵.

Embora estudos mostrem que o TF aeróbio promove diversas adaptações no sistema cardiovascular, dentre

as quais se destaca a HC, mudanças no volume de TF e a avaliação desses marcadores moleculares responsáveis por essas alterações são pouco conhecidos. Portanto, este artigo tem como objetivo investigar a magnitude de HC induzida por diferentes volumes de TF aeróbio e verificar se estas respostas adaptativas estão associadas a marcadores moleculares de HC patológica.

Metodologia

Animais Experimentais

Foram utilizadas 21 ratas Wistar, pesando entre 180g e 200g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

Os animais permaneceram em gaiolas plásticas, em grupos de três ou quatro animais por caixa, e separados por grupo. A temperatura foi mantida entre 22°-24°C e a luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro (12/12 horas). Água e comida foram administradas *ad libitum*.

Os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da USP sob o n° 2006/19.

Identificação dos animais

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos com sete animais em cada grupo: a) ratas Wistar sedentárias-controle (SC); b) treinadas com protocolo 1 (P1); c) treinadas com protocolo 2 (P2).

Protocolos de treinamento físico aeróbio

P1: animais realizaram treinamento de natação durante 10 semanas, sessões de 60min, 1 x / dia, 5 x / semana, com sobrecarga acoplada à cauda do animal de 5% do peso corporal (PC)¹⁶. Os animais foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga.

P2: treinamento igual ao P1 até a 8ª semana. Na 9ª semana os animais nadaram duas sessões de 60min ao dia. Na 10ª semana realizaram três sessões de 60min ao dia. Houve intervalo de 4 horas entre sessões. Este protocolo mimetizou o TF de alto rendimento¹⁷.

Os protocolos foram caracterizados como treinamentos de baixa a moderada intensidade e longa duração,

efetivos na promoção de adaptações cardiovasculares e na capacidade oxidativa muscular^{16,17}.

Após o período de TF, os animais foram submetidos às análises hemodinâmicas, teste de tolerância ao esforço físico máximo e consumo de oxigênio. Posteriormente foram decapitados e as amostras coletadas e armazenadas para análises histológicas e moleculares.

Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca

Após o período de TF, os animais foram canulados e mantidos em gaiolas individuais. A cânula foi conectada a um tubo de polietileno (PE 100) e o sinal (*Stemtech, Inc.*) transduzido, (P23 Db; *Gould-Statham*) amplificado, (*General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.*) e registrado em tempo real (CODAS). A análise foi realizada por programa compatível com *Windows*. Os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e FC foram obtidos batimento a batimento.

Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo

Os animais foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante, com velocidade inicial de 6m/min (sem inclinação). Foram realizados incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3min, até ser atingida a exaustão, determinada no momento em que o animal não foi mais capaz de correr. A avaliação foi feita 48 horas antes e após o TF, comparando a resposta de desempenho (min) do animal entre os grupos e em cada rata.

Avaliação do consumo de oxigênio (VO₂)

O VO₂ pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO₂) durante o teste máximo. Os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. A câmara é conectada a um analisador de gases para analisar a FeO₂. Cada animal permanecia dentro da caixa metabólica em repouso por 30min para registrar o estado basal, e o teste iniciado com velocidade de 6m/min. Durante cada estágio (3min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO₂ no ar da caixa metabólica. Após a exaustão, o animal permaneceu na caixa por 3min e as FeO₂ foram registradas para verificar a recuperação do animal. O VO₂ foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VO_2 = \text{fluxo de ar} \times (FiO_2 - FeO_2) / \text{peso corporal}$$

onde: VO₂=mL.kg⁻¹.min⁻¹; Fluxo de ar=1000mL/min (analisador)+2500mL/min (bomba de

aspiração)=3500mL/min; FiO₂=fração de oxigênio inspirada (ar ambiente); FeO₂=fração de oxigênio expirada (caixa de mistura), peso corporal=kg

Avaliação da morfologia cardíaca

O coração foi dissecado, tendo sido separados o VE (ventrículo esquerdo) e VD (ventrículo direito). A HC foi avaliada pelo peso úmido do VE corrigido pelo PC do animal (mg/g).

A HC também foi avaliada pela análise do diâmetro dos cardiomiócitos. O VE foi fixado em 6% de formaldeído, embebido em parafina e foram realizados cortes histológicos de 5µm no nível do músculo papilar. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A imagem foi ampliada 400x e os miócitos com núcleos visíveis e membrana celular intacta foram escolhidos para análise. A análise foi realizada por microscópio óptico associado a um sistema de análise de imagens *Quantimet Leica*[®], (Leica, UK) por estu- do-cego. Cinco campos visuais foram analisados por animal.

Avaliação da expressão gênica cardíaca por Real-Time PCR

A expressão gênica relativa para α-MHC, β-MHC, α-actina esquelética e ANF no VE foram analisadas por reação em cadeia de polimerase em tempo real (*real-time PCR*). Foi realizada extração do RNA total em 1ml de trizol (*Invitrogen Life Technologies, USA*) conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo, durante 40min a 100v e avaliada pela intensidade das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S.

Sucedeu-se a síntese de cDNA com 2µg de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5µg/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65°C por 5min, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20µL contendo 3U de RNAsin (*PROMEGA, USA*), 10mM de dNTPs, 0,1M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5U de *SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Life Technologies, USA)* pelo período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo.

As reações de *real-time PCR* foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento *ABI 7700 (Applied-Biosystems, USA)* e com o composto fluorescente *SYBR-Green I*, conforme instruções do fabricante.

Os primers foram desenhados usando o programa Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), sendo utilizados:

α -MHC:

sense: 5'-CGA GTC CCA GGT CAA CAA G-3',
antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC C-3';

β -MHC:

sense: 5'-CAT CCC CAA TGA GAC GAA G-3',
antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC A-3';

ANF:

sense: 5'-CTT CGG GGG TAG GAT TGA C-3',
antisense: 5'-CTT GGG ATC TTT TGC GAT CT-3';

α -actina esquelética:

sense: 5'-ACC ACA GGC ATT GTT CTG GA-3',
antisense: 5'-TAA GGT AGT CAG TGA GGT CC-3';

ciclofilina:

sense: 5'-AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3',
antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3'.

A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da ciclofilina (DCT). A expressão gênica foi calculada usando as diferenças em valores de DCT entre as amostras (DDCT) e a equação 2^{-DDCT} .

Expressão de proteínas cardíacas

Aproximadamente 100mg de VE foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), sucrose 0,3 M, DTT 0,5mM, EDTA 1mM (pH 8,0), PMSF 0,3mM, NaF 10mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10min a 4°C com 12.000 rpm. A concentração de proteína das amostras foi analisada pelo método de Bradford¹⁸.

Foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240mM; SDS 0,8%; β -mercaptoetanol 200mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %) 50 μ g de proteína. Os níveis proteicos de Akt1 e phosphoSer473-Akt no VE foram avaliados por Western blot. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 6-15%: dependendo do peso molecular da proteína), no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, USA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose

(Amersham Biosciences, USA), que sofreu bloqueio de ligações inespecíficas (solução com caseína a 5%) e posteriormente foi incubada com o anticorpo primário: rabbit anti-Akt1 (1:1000, Upstate Cell Signaling Solutions, USA) e o rabbit anti-phospho^{Ser473}-Akt (1:1000, Cell Signalling Technology, UK). A membrana foi lavada 3x10min com TBS-T, incubada por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários, exposta a filme de PVC mediante reação de quimiluminescência (ECL), e os blots foram analisados pelo software Scion Image, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via internet. α -tubulina foi utilizada como proteína normalizadora.

Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) de uma via foi utilizada para comparar os valores dos grupos e teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado para diferenças (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Adotou-se como significativo um $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

Resultados

Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de PAS, PAD e PAM expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da FC expressos em batimentos por minuto (bpm) pós-TF foram sumarizados na Tabela 1 nos grupos SC, P1 e P2.

Não houve diferença da PA entre os três grupos estudados. A FC diminuiu significativamente após 10 semanas de TF no grupo P1 (301,2 \pm 15,3bpm) e P2 (309 \pm 14bpm), comparado ao SC (344,8 \pm 12,1bpm, $p < 0,05$).

Marcadores de treinamento físico: teste de esforço e consumo de oxigênio

O teste de tolerância ao esforço foi um parâmetro para comprovar a eficácia do TF. Os resultados do teste realizado pré e pós 10 semanas de protocolo experimental estão representados na Figura 1A. Pré-TF

Tabela 1
Parâmetros hemodinâmicos

Grupos	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
SC	127,6 \pm 3,9	97,6 \pm 10,3	113,5 \pm 7,3	344,8 \pm 12,1
P1	123,3 \pm 8,5	96,4 \pm 5,2	110,7 \pm 6,7	301,2 \pm 15,3*
P2	123,0 \pm 8,4	94,3 \pm 8,9	108,3 \pm 9,0	309,0 \pm 14,0*

Valores expressos em média \pm EPM. Resultados de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos pós-período de TF em ratas Wistar sedentárias controle (SC), ratas Wistar treinadas com protocolo 1 (P1) e ratas Wistar treinadas com protocolo 2 (P2). * $p < 0,05$ vs. SC.

os grupos apresentavam o mesmo desempenho físico; entretanto pós-TF houve uma melhora significativa de desempenho em P1 e P2 comparados a eles mesmos no pré-TF e aos animais-controle tanto no pré quanto no pós-TF. O grupo-controle obteve o mesmo resultado do teste inicial e os grupos treinados apresentaram um aumento médio de 20,7% em P1 e 29,4% em P2.

A Figura 1B mostra o VO_2 pico dos animais pré e pós o protocolo experimental. No período pré-TF observa-se que todos os grupos tinham o mesmo nível médio de VO_2 pico; entretanto pós-TF observa-se a eficácia do treinamento com uma resposta de manutenção do VO_2 para os grupos que treinaram (P1 e P2) e uma redução para o grupo sedentário-controle (SC) (pós-TF- SC: $67,6 \pm 2,2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; P1: $75,63 \pm 2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e P2: $80,05 \pm 2,4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

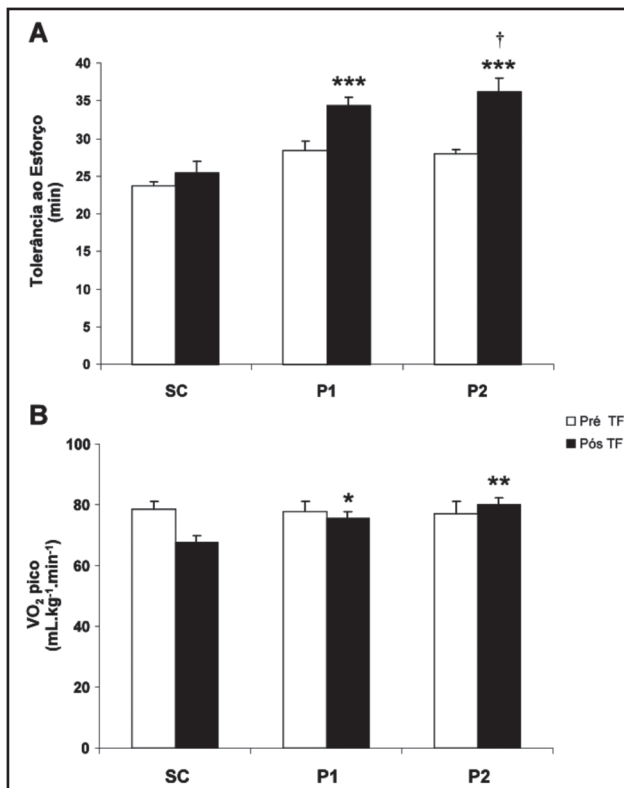


Figura 1
Marcadores de TF aeróbio. Tolerância ao esforço físico máximo avaliado pelo tempo de duração do teste (A) e consumo de oxigênio (VO_2) de pico (B) pré e pós-TF. Resultados expressos em médias \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao SC pós-TF; ** $p < 0,01$ comparado ao SC pós-TF; *** $p < 0,001$ comparado ao pré-TF e SC pós-TF; † $p < 0,05$ comparado ao P1 pós-TF TF=treinamento físico

Hipertrofia cardíaca

O PC pré e pós-TF foi similar entre os grupos. A Figura 2A mostra a relação do VE/PC (mg/g) e o diâmetro dos cardiomiócitos (μm). A hipertrofia do

VE obtida pelo P1 e P2 foi 13% ($2,8 \pm 0,14 \text{ mg/g}$; $p < 0,05$) e 27% ($3,2 \pm 0,12 \text{ mg/g}$; $p < 0,01$), respectivamente, comparado ao grupo de SC ($2,5 \pm 0,06 \text{ mg/g}$). Houve diferença entre os grupos P1 e P2 de 14% ($p < 0,05$). O aumento na relação de VE/PC observado com TF foi confirmado pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos do VE em P1 ($13,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$) e o grupo P2 ($14,4 \pm 1,3 \mu\text{m}$) comparado ao grupo SC ($11 \pm 1,1 \mu\text{m}$) $p < 0,05$. A Figura 2B representa as imagens dos cortes histológicos de diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos.

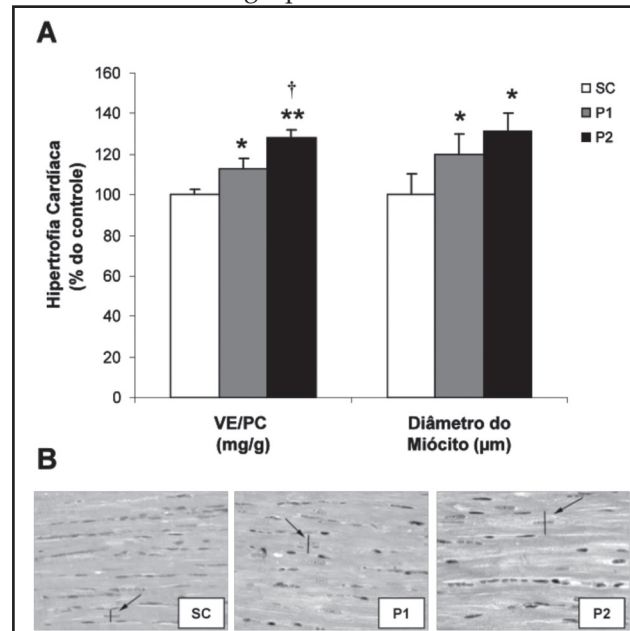


Figura 2
Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a hipertrofia cardíaca. Razão VE/PC (mg/g) e diâmetro dos cardiomiócitos (μm) foram usados como índices de hipertrofia (A). Imagens representativas dos cortes histológicos do diâmetro dos cardiomiócitos de animais sedentários-controle (SC), treinados protocolo 1 (P1) e treinados protocolo 2 (P2) (B). As setas indicam o diâmetro dos cardiomiócitos os quais foram traçados manualmente passando pelo meio do núcleo celular (400 \times). Resultados expressos em médias \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao SC; ** $p < 0,01$ comparado ao SC; † $p < 0,05$ comparado ao P1 TF=treinamento físico; PC=peso corporal; VE=peso do ventrículo esquerdo

Marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca

As Figuras 3A-E mostram que o TF não modificou a expressão dos genes α -MHC, β -MHC, α/β -MHC, ANF e α -actina esquelética em P1. Entretanto no grupo P2 foi observado um aumento de 37% na expressão gênica da α -MHC, redução de 70% da β -MHC, aumento de 98% da α/β -MHC, nenhuma alteração na expressão de ANF e uma redução de 53% da α -actina esquelética comparados ao grupo SC ($p < 0,05$).

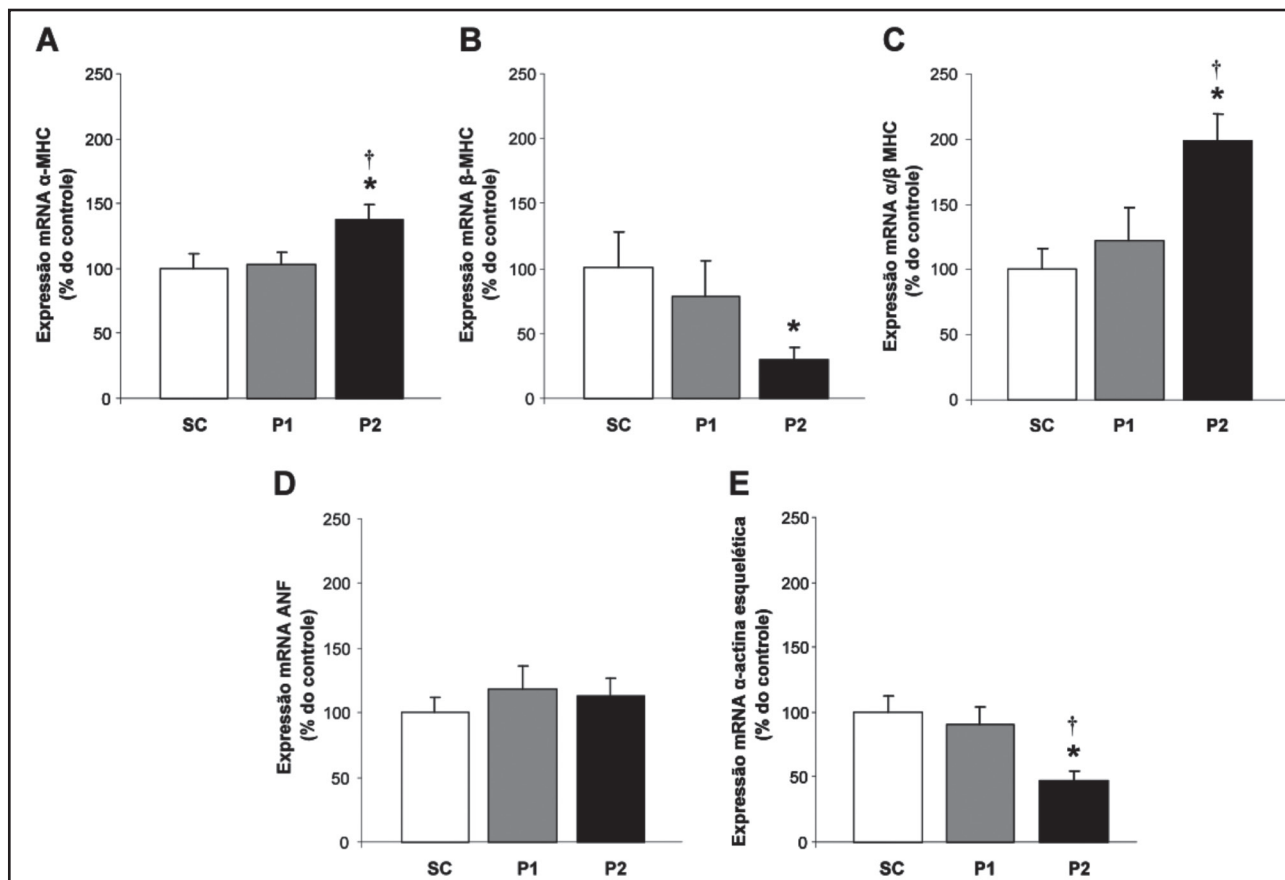


Figura 3

Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre os marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca patológica. Expressão gênica da α -MHC (A), β -MHC (B), α/β -MHC (C), ANF (D) e α -actina esquelética (E) avaliados por *real-time* PCR de animais sedentários-controle (SC), treinados protocolo 1 (P1) e treinados protocolo 2 (P2). Os genes alvos foram normalizados pelo mRNA da ciclofilina cardíaca.

Resultados expressos em médias \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao SC; † $p < 0,05$ comparado ao P1

TF=treinamento físico; MHC=miosina de cadeia pesada; ANF=fator natriurético atrial

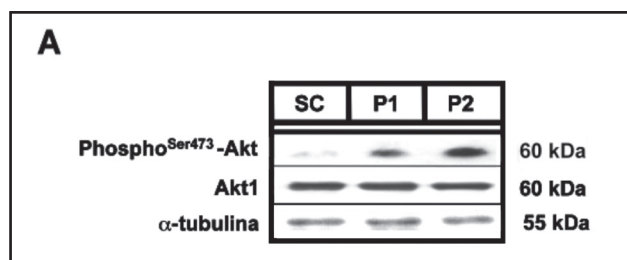
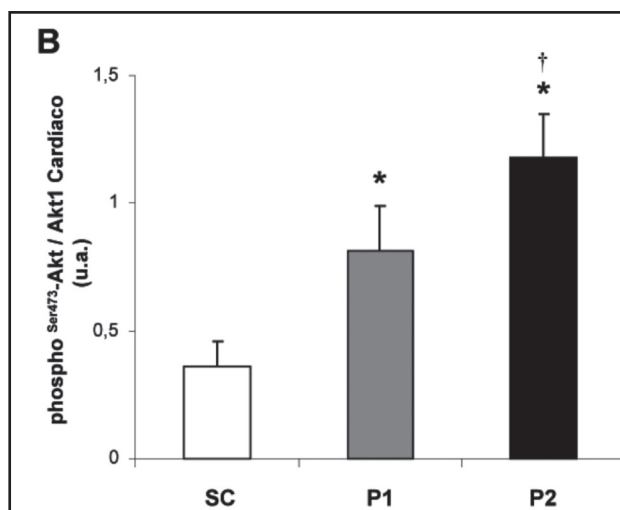


Figura 4

Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a atividade da Akt cardíaca. Blots representativos de *phospho*^{Ser473}-Akt, Akt1 e α -tubulina para animais sedentários-controle (SC), treinados protocolo 1 (P1) e treinados protocolo 2 (P2) (A). Níveis proteicos da atividade da Akt (razão *phospho*^{Ser473}-Akt/Akt) no VE analisados por *Western blot* (B). As bandas-alvo foram normalizadas pela proteína α -tubulina cardíaca.

Resultados expressos em médias \pm EPM * $p < 0,05$ comparado ao SC; † $p < 0,05$ comparado ao P1

TF=treinamento físico; VE=ventrículo esquerdo



A Figura 4A mostra os *blots* representativos das proteínas-alvo cardíaca. A Figura 4B indica que a atividade da Akt no VE, dada pela razão phospho^{Ser473}-Akt / Akt1, aumentou 125% no grupo P1 ($p < 0,05$) e 228% no grupo P2 ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SC. Foi observado aumento de 103% na atividade da Akt para P2 comparado ao grupo P1 ($P < 0,05$), indicando aumento na sinalização da via Akt dependente do volume de TF.

Discussão

No presente estudo, foi avaliado o efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a magnitude da HC e sua associação com marcadores moleculares. Os principais resultados mostram que o TF: 1) induziu bradicardia de repouso sem alterações na PA; 2) aumentou a tolerância ao esforço; 3) preveniu a redução do VO_2 de pico; 4) promoveu HC de maneira dependente do aumento do volume de TF sem ativação de marcadores moleculares expressos em hipertrofia patológica.

O TF aeróbio acarreta adaptações cardiovasculares e hemodinâmicas, responsáveis pela melhora do rendimento físico observado em atletas^{1-5,16-20}. Para determinar se o protocolo de TF utilizado foi efetivo em produzir adaptações aeróbias nos grupos de animais treinados, foram medidos os principais marcadores fisiológicos de treinamento: a melhora na capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço e VO_2 de pico, a bradicardia de repouso e a HC^{1-5,16-20}.

Os mecanismos pelos quais a bradicardia ocorre parecem ser fortemente influenciados pelo tipo de TF. Em ratos normotensos, a bradicardia de repouso resultante do TF aeróbio em esteira está associada a uma redução na FC intrínseca¹⁹, ao passo que os animais submetidos ao protocolo de natação parecem apresentar bradicardia de repouso por um aumento do tônus vagal¹⁶.

Estudos mostram que a resposta de PA permanece inalterada em humanos e animais normotensos submetidos ao TF¹⁶⁻²⁰. No presente estudo, consistente com os outros estudos mencionados, não houve diferença significativa na PA entre os grupos, mostrando que o TF não modifica a PA em repouso. Além disso, esse efeito não parece ser inerente ao tipo de TF empregado quando comparado à modalidade em esteira com a natação, nem espécie dependente. No entanto, pode ser condicionada ao nível inicial de PA, já que populações hipertensas são beneficiadas com a redução da PA com TF aeróbio²¹.

A HC induzida pelo TF é considerada fisiológica e desenvolvida de forma simétrica no coração, sendo que as mudanças estruturais são dependentes da natureza, duração, frequência e intensidade do exercício¹⁻⁵. Essa hipertrofia é um mecanismo compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos¹⁻⁷. Brandão et al.²² mostraram que o TF aumenta a velocidade máxima de enchimento do VE, sugerindo que o indivíduo treinado possui uma capacidade de acomodar maior volume de sangue na mesma frequência cardíaca que o não treinado. Esses fatores tendem a melhorar a eficiência cardíaca nos atletas contribuindo para melhora do rendimento físico. De fato, os resultados aqui encontrados coincidem com os da literatura, em que o TF aeróbio promoveu HC com aumento do diâmetro dos cardiomiócitos no grupo P1. Além disso, observa-se que o grupo P2 promoveu uma hipertrofia de maior magnitude, sugerindo que esta resposta exacerbada frente ao aumento do volume de TF pode refletir ainda mais a melhora da capacidade de trabalho aeróbio.

Crítérios têm sido utilizados para poder diferenciar a HC fisiológica da patológica. A relação entre o tamanho do coração e o rendimento físico no teste ergométrico, ou mesmo a massa do VE com o VO_2 máximo têm sido utilizados como parâmetros. Em analogia, o advento de novas técnicas de biologia molecular tem permitido avanços na caracterização do perfil molecular dessas hipertrofias, contribuindo para o diagnóstico patológico ou fisiológico⁶⁻⁹.

Evidências indicam que a gênese da HC é um processo complexo, envolvendo geração de sinais na membrana celular que ativam uma cascata de vias de sinalização intracelular, as quais regulam a atividade gênica e proteica necessária para o crescimento do miócito. Entre os fatores mais descritos no processo hipertrófico destacam-se os mecânicos, neurais e hormonais^{3,23}.

O crescimento dos miócitos se dá pela síntese de novos sarcômeros, com aumento da espessura ou do comprimento das miofibrilas e em seu número. Além disso, há modificações nas proporções de isoformas de actina e miosina expressas para adequar a velocidade e força de contração necessárias ao processo de adaptação frente ao estímulo de hipertrofia^{3,23}.

Na HC patológica observa-se um padrão de expressão gênica característicos do período fetal, com expressão da α -actina esquelética e ANF.

Estudos relatam que a reexpressão desses genes fetais participam da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia patológica, embora seu significado fisiológico no ventrículo permaneça desconhecido. Em analogia, observa-se também aumento na expressão da β -MHC o que determina mudança na capacidade contrátil do miocárdio, com diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros em patologias cardíacas^{8-11,24}.

Por outro lado, a HC induzida pelo TF em animais experimentais tem mostrado um perfil de expressão desses genes diferente da patológica^{10,11}. Scheinowitz et al.²⁵ encontraram uma diminuição na expressão da β -MHC no coração de ratos treinados em natação, por duas semanas, sendo que ao final do protocolo de seis semanas de TF não foi encontrada alteração na expressão do gene. Resultados similares foram observados com o TF realizado em esteira²⁶.

Esses resultados foram semelhantes ao encontrado no presente estudo em que o grupo P1 não apresentou nenhuma alteração na expressão gênica desses mediadores patológicos. Entretanto, foi possível observar uma melhora neste perfil gênico com o grupo P2, indicando que o aumento do volume de TF promoveu adaptações moleculares importantes, podendo estar relacionadas à melhora da condição aeróbia, uma vez que uma maior expressão do gene α -MHC poderia representar uma maior velocidade de encurtamento dos sarcômeros, à medida que também foi observada redução da expressão de β -MHC, indicando uma relação α/β -MHC aumentada, que pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento das propriedades contráteis do miocárdio frente ao TF.

Entre as vias de sinalização intracelular indutoras de HC, a via sinalizada pela proteína quinase-B (PKB/Akt) apresenta um papel-chave nesse processo. A fosforilação e ativação da Akt são conhecidas por uma variedade de estímulos, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, de maneira dependente da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)²⁷, sugerindo um importante papel da Akt na função mitogênica celular. De fato, estudos genéticos com camundongos *knockout* para o gene Akt1 (Akt1^{-/-}) mostram deficiência no crescimento muscular²⁸ e camundongos que superexpressam Akt1 resultam num fenótipo de HC²⁹.

Em estudo recente, Kemi et al.¹³ avaliaram a participação da via da Akt na HC após TF em esteira por seis semanas e observaram que embora a

expressão total de Akt não fosse alterada, a expressão da proteína fosforilada (ativada) estava aumentada. Recentemente, estudo realizado em camundongos Akt1^{-/-} demonstrou que o TF não foi capaz de gerar HC nesse grupo de animais, sugerindo a participação da Akt1 na hipertrofia cardíaca induzida pelo TF¹².

Quando ativada, a Akt age sobre a quinase glicogênio sintase 3 β (GSK3 β) e a *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A Akt inibe a GSK3 β que controla negativamente a HC. Por outro lado, a mTOR estimula a síntese proteica e ativa as proteínas quinases-S6 (S6K1 e S6K2) que aumentam a biossíntese ribossomal, tradução de proteínas, progressão do ciclo celular e hipertrofia³⁰. A mTOR também libera o eIF4E da ligação com 4E-BP1 (fator de iniciação da tradução) que se liga a um outro fator de iniciação - eIF4G -, que leva à iniciação da tradução ribossomal^{18,30}.

Kemi et al.¹³ observaram ativação de Akt-mTOR após o TF com aumento na expressão de seus substratos S6K1 e 4E-BP1. É possível que tanto a ativação de S6K1, quanto de 4E-BP1 via Akt-mTOR estejam envolvidas no processo de HC induzida pelo TF. Por outro lado, os autores do estudo mostraram que essa via da Akt não era ativada em situações patológicas, sendo indicada como via intracelular na diferenciação da HC fisiológica da patológica. Assim, os resultados aqui encontrados também estão de acordo com os da literatura, uma vez que se observa aumento da atividade da Akt de forma dependente do aumento do volume de TF, demonstrando que a hipertrofia de maior magnitude pelo grupo P2 era de cunho fisiológico.

Conclusões

Este estudo mostra que a magnitude da HC foi dependente do aumento do volume de TF aeróbio e que os mecanismos moleculares ativados são diferentes das encontradas nas hipertrofias patológicas. Adicionalmente, as adaptações encontradas no P2 se aproximam das encontradas em atletas de alto rendimento, que realizam várias sessões de TF ao longo do dia, conferindo-lhes respostas adaptativas mais proeminentes necessárias ao grau de TF exigido. Assim, a utilização do protocolo 2 é cabível em estudos que desejem estudar adaptações condizentes às dos atletas de modalidades aeróbias.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo FAPESP (nº. 2007/56771-4; 2009/18370-3), CAPES e CNPq (nº. 307591/2009-3).

Vinculação Universitária

Este estudo faz parte da dissertação de Mestrado de Nara Yumi Hashimoto pela Universidade de São Paulo (USP).

Referências

1. Urhausen A, Kindermann W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. *Sports Med.* 1999;28(4):237-44.
2. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000;101(3):336-44.
3. Dorn GW 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2007;49(5):962-70.
4. Steding K, Engblom H, Buhre T, Carlsson M, Mosén H, Wohlfart B, et al. Relation between cardiac dimensions and peak oxygen uptake. [Abstract]. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010;12:8.
5. Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med.* 1975;82(4):521-4.
6. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(6):R2029-36.
7. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(4):255-62.
8. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 1991;5(15):3037-46.
9. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(2):339-43.
10. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R381-7.
11. Garcarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2009;53(4):708-14.
12. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation.* 2006;113(17):2097-104.
13. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008;214(2):316-21.
14. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(21):12355-60.
15. McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(2):612-7.
16. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(12):1909-17.
17. Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics.* 2011;43(11):665-73.
18. Magalhães FC, Barretti D, Hashimoto NY, Melo SFS, Roque FR, Oliveira EM. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte (REMEFE).* 2008;7:189-93.
19. Evangelista FS, Martuchi SE, Negrão CE, Brum PC. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):1141-6.
20. Katona PG, McLean M, Dighton DH, Guz A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. *J Appl Physiol.* 1982;52(6):1652-7.
21. Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension.* 2003;42(4):851-7.
22. Brandao MU, Wajngarten M, Rondon E, Giorgi MC, Hironaka F, Negrão CE. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. *J Appl Physiol.* 1993;75(5):1989-95.
23. Heineke J, Molkenstein JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;(7):589-600.
24. Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1693-700.

25. Scheinowitz M, Kessler-Icekson G, Freimann S, Zimmermann R, Schaper W, Golomb E, et al. Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Horm IGF Res.* 2003;13(1):19-25.
26. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(6):H2994-3002.
27. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905-27.
28. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance or glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38349-52.
29. Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, et al. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22896-901.
30. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2004;63(3):403-13.