

**IGOR LUCAS GOMES DOS SANTOS**

**Angiotensina II e treinamento físico na insuficiência  
cardíaca: implicações para a miopatia esquelética**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

**São Paulo  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes-Santos, Igor Lucas

Angiotensina II e treinamento físico na insuficiência cardíaca : implicações  
para a miopatia esquelética / Igor Lucas Gomes dos Santos. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.

Orientador: Carlos Eduardo Negrão.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Sistema renina-angiotensina  
3.Doenças musculares 4.Terapia por exercício 5.Atrofia muscular/patologia  
6.Atrofia muscular/reabilitação 7.Ubiquitina/genética 8.Exercício/fisiologia  
9.Angiotensina II 10.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-418/13

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese à minha família. Não podia ser diferente, afinal todos somaram esforços para que, apesar das dificuldades, essa longa caminhada se concluísse. Agradeço ao meu pai, **Ernane**, primeiro responsável por eu almejar uma carreira universitária, e às minhas irmãs, **Lívia** e **Elise** pelo amor e companheirismo. Agradeço à minha **tia Marlene** pela atenção de sempre, e sou eternamente grato aos meus tios **José Alberto** e **Eliane**, pelo suporte emocional e principalmente financeiro. Sem a ajuda de vocês, NADA disso teria acontecido!*

\* \* \*

*Mais que tudo, essa tese é dedicada à minha mãe, **Gisela**. Ela, que faleceu precocemente quando eu já me preparava para entrar no doutorado, sempre me apoiou, incentivou e ensinou que eu “amarrasse o meu arado a uma estrela”... E se eu cheguei até aqui, foi por seu incentivo, seu exemplo e sua insistência!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Carlos Eduardo Negrão**, pela confiança. Sou grato por me deixar livre na busca da minha formação e dos meus interesses, e mais ainda por saber o momento certo de me puxar de volta, sempre trazendo em perspectiva o que é importante, extraíndo a essência dos dados e me lembrando de manter o foco... E mais ainda por ensinar seriedade, ética e comprometimento científico através do próprio exemplo. Foi uma honra e uma inspiração ter sido seu aluno!

Também agradeço às professoras **Edilamar Oliveira**, **Luciana Rossoni** e **Patrícia Brum**, apaixonadas pela Ciência de forma contagiante, e grandes exemplos de cientistas-docentes. Frequentar seus laboratórios e suas aulas foi uma experiência pessoalmente enriquecedora, além de fundamental para essa tese!

À **Dra Dulce Casarini** pela colaboração na dosagem das angiotensinas e discussão dos dados.

À **Dra Vera Salemi** agradeço pelo compromisso em assumir a realização da excelente análise ecocardiográfica do nosso estudo, apesar do sempre grande número de animais e dos horários ingratos...

Agradeço muito à **Gisele Couto** pela colaboração e disponibilidade ao longo de todo o protocolo. Também agradeço ao **Tiago Fernandes** pelo comprometimento e dedicação ao me ensinar e me ajudar com os experimentos de bioquímica e biologia molecular. Sem sua ajuda e da professora Edilamar, a finalização dessa tese não teria sido possível!

Às meninas do “grupo de atletas”, **Luciana Nagem, Luciene Azevedo, Patrícia Perlingeiro** e **Luciana Ângelo**, agradeço pela amizade e pela oportunidade de convivência, com prazerosas e acaloradas discussões sobre Fisiologia do Exercício! Foi onde comecei no InCor, e onde mais vivenciei pesquisa com assistência multiprofissional.

À todos com quem convivi na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício ao longo desses 7 anos! Agradeço à **Ellena Paulino** e à **Fernanda Zamo**, essenciais no começo do projeto. Aos amigos contemporâneos do período de doutorado, **Marcelo Rodrigues, Lígia Antunes, Raphaela Groehs, Denise Lobo, Edgar Dias, Patricia Trevisan,**

**Daniel Martinez, Adriana Sarmiento, Ana Sayeg, Camila Jordão, Sara Rodrigues, Francis Ribeiro, Thúlio, Kelly, “Dra Tatu”** e a tantos outros que ocupariam mais alguns parágrafos, e que contribuíram com discussões e elucubrações tanto em disciplinas como nos botecos no fim do dia... vocês contribuíram para que essa experiência fosse mais interessante!

Agradeço especialmente aos que se tornaram amigos de todas as horas, **Felipe Cepêda, Larissa dos Santos e Thaís Simões**. Muito obrigado pela companhia, pela convivência e pela confiança ao longo desses anos. A amizade de vocês foi meu principal achado em SP!

Às professoras **Dra Maria Urbana, Dra Ivani Trombetta** e à **Dra Janieire**, obrigado pela convivência, pelo carinho de sempre e pela seriedade no trabalho e comprometimento com todos do grupo de reabilitação.

Agradeço à **Mônica, Sandrinha e Mari**, pela paciência e prontidão ao longo desses anos. Também agradeço às secretárias da pós-graduação em Cardiologia pela assistência ao longo do doutorado. A ajuda da **Juliana** e da **Neusa** foi fundamental para que as pautas das primeiras reuniões da pós-graduação fossem decifradas... Durante esse período de representação

discente, também agradeço ao professor **Jose Antônio Franchini Ramires** pelas elucidações e discussões.

Aos demais funcionários da Unidade de Reabilitação e a todos do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da EEFÉ-USP pela convivência, discussões e auxílio ao longo desses anos. Especialmente, agradeço à **Katt Mattos**, que praticamente me pegou pela mão e indicou caminhos nos primeiros anos de laboratório, e também pela amizade ao longo de todo o doutorado. Também às técnicas **Glória** e **Marcele** pelo auxílio no laboratório.

Essa caminhada começou há muitos anos. **Tio Guto**, **Tia Everly** (já falecida) e todos da minha família contribuíram muito para essa vivência em SP, e mesmo o apoio da minha avó **Zeferina**, que já assimilou que eu estudo num hospital, mas pra ser “outro tipo de doutor que não é médico” (embora ela não saiba bem o porquê, e ainda achar que estudar demais faz mal...)

Agradeço aos professores **Walter** e **Ângela**, do Colégio Maria Lago Barcellos. Aos professores da UFMS, que me ajudaram nos primeiros passos e me estimularam a continuar andando (**Renato Yonamine**, **Claudia Stefane**,

**Alessandro Zagatto**), e aos amigos de Campo Grande, pelo incentivo sempre. Também agradeço àqueles que torceram por mim, e aos que não torceram também... Afinal, a resiliência se torna um grande motor!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento.

Não posso deixar de agradecer à **Faculdade de Medicina** e ao **Instituto do Coração**, cuja estrutura permite uma intrincada relação entre Ensino, Pesquisa e Assistência de excelência, e o apoio de suas fundações (**Fundação Faculdade de Medicina** e **Fundação Zerbini**) proporcionam uma formação ímpar. Finalmente, agradeço à **Universidade de São Paulo**, a minha verdadeira *Alma Mater*. Aqui pude frequentar as melhores aulas da minha vida, com alguns dos professores que já conhecera em livros. Saio com uma forma diferente de ver o mundo e, embora pense que sei menos do que devia, percebo que ‘nada sei’ sobre assuntos que antes eu nem sequer cogitava existirem.

## EPÍGRAFE

*“— Acho que só há um caminho para a ciência –  
ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua  
beleza e apaixonarmo-nos por ele; casarmo-nos com ele  
até que a morte nos separe – a não ser que  
encontremos outro problema ainda mais fascinante...”*

**Karl Popper**

*“ – É preciso que veja por sí mesmo. Essa é sua última chance. Depois disso não haverá retorno. Se tomar a pílula azul, fim da história. Vai acordar em sua cama e acreditar no que você quiser. Se tomar a pílula vermelha, fica no país das maravilhas. E eu vou mostrar até onde vai a toca do coelho. Lembre-se: Eu estou oferecendo a verdade, nada mais...”*

**“Morpheus”**

**(Matrix, 1999)**

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS CAPITULO 1</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS CAPITULO 2</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS CAPITULO 1</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS CAPITULO 2</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii

**CAPÍTULO 1. Efeito do treinamento físico no balanço sistêmico e muscular esquelético dos eixos ECA/AngII/AT1 - ECA2/Ang-(1-7)/Mas na insuficiência cardíaca crônica**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. Sistema Renina Angiotensina .....	2
1.2. Sistema Renina-Angiotensina e Insuficiência Cardíaca .....	55
1.3. Sistema Renina-Angiotensina e Exercício Físico na Insuficiência Cardíaca .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Amostra .....	17
3.2. Indução da Insuficiência Cardíaca .....	17
3.3. Avaliação da Função Ventricular.....	18
3.4. Avaliação da Capacidade Funcional .....	19
3.5. Protocolo de Treinamento Físico.....	21
3.6. Sacrifício e Coleta dos Tecidos.....	21

3.7.	Expressão Gênica .....	22
3.8.	Expressão Proteica .....	25
3.9.	Determinação da Atividade da ECA e da ECA2.....	26
3.10.	Determinação das Concentrações de Angiotensinas.....	27
3.11.	Análise Estatística .....	28
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1.	Resultados Basais.....	29
4.2.	Efeito do Treinamento Físico.....	32
4.2.1.	Massa Corporal e Capacidade Funcional .....	32
4.2.2.	Massa tecidual .....	34
4.2.3.	Sistema Renina-Angiotensina Sistêmico.....	36
4.2.4.	Sistema Renina-Angiotensina Tecidual.....	39
4.2.4.1.	Músculo Sóleo.....	39
4.2.4.2.	Músculo Plantar .....	46
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1.	Caracterização morfofuncional do modelo de insuficiência cardíaca Crônica e o efeito do treinamento físico.....	53
5.2.	Sistema Renina-Angiotensina Circulante .....	55
5.3.	Sistema Renina-Angiotensina Muscular Esquelético .....	57
5.4.	Limitações .....	61
5.5.	Perspectivas.....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

**CAPÍTULO 2. Modulação da angiotensina II na melhora da miopatia esquelética provocada pelo treinamento físico na insuficiência cardíaca crônica**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>86</b>
1.1. Insuficiência Cardíaca e Miopatia Esquelética .....	89
1.2. Sistema Renina-Angiotensina e Miopatia Esquelética .....	5
1.3. Sistema Renina-Angiotensina, Miopatia Esquelética e Treinamento Físico .....	92
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>94</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>95</b>
3.1. Amostra .....	95
3.2. Delineamento Experimental .....	95
3.3. Indução da Insuficiência Cardíaca .....	97
3.4. Avaliação da Função Ventricular.....	97
3.5. Avaliação da Capacidade Funcional .....	97
3.6. Protocolo de Treinamento Físico.....	98
3.7. Sacrifício e Coleta dos Tecidos.....	98
3.8. Expressão Gênica .....	98
3.9. Expressão Proteica .....	99
3.10. Proteínas Carboniladas.....	99
3.11. Determinação da Atividade do Proteassoma .....	100
3.12. Análise Estatística .....	100
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>102</b>
4.1. Estudo Piloto .....	102
4.2. Capacidade Funcional, Parâmetros Ecocardiográficos e Dados Fisiológicos .....	103

4.3. Resposta Muscular Esquelética ao Treinamento Físico com infusão de AngII .....	109
4.3.1 Músculo Sóleo.....	110
4.3.2 Músculo Plantar.....	113
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>118</b>
5.1. Efeito do Treinamento Físico na Função Cardíaca e Efeito do Clamp de AngII .....	118
5.2. Papel da AngII na Miopatia Esquelética, e o Papel do Treinamento Físico .....	120
5.3. Limitações .....	125
5.4. Perspectivas .....	125
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>126</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>127</b>

**LISTA DE FIGURAS CAPITULO 1**

<b>Figura 1.</b> Sequência de aminoácidos de angiotensinas .....	9
<b>Figura 2.</b> Esquema atualizado do Sistema Renina-Angiotensina.....	11
<b>Figura 3.</b> Função ventricular e capacidade funcional basal .....	30
<b>Figura 4.</b> Função ventricular e capacidade funcional .....	34
<b>Figura 5.</b> Massa cardíaca e massa do pulmão.....	35
<b>Figura 6.</b> Atividade sérica das enzimas ECA e ECA2 .....	37
<b>Figura 7.</b> Concentração plasmática de AngII .....	37
<b>Figura 8.</b> Concentração plasmática de Ang(1-7) e razão Ang-(1-7)/AngII ...	39
<b>Figura 9.</b> ECA, AngII e correlação entre a ECA a AngII no músculo sóleo ..	40
<b>Figura 10.</b> ECA2, Ang-(1-7) e correlação entre a ECA2 e Ang-(1-7) no músculo sóleo .....	42
<b>Figura 11.</b> Razão entre a ECA e a ECA2 e razão entre a Ang-(1-7)/AngII no músculo sóleo .....	43
<b>Figura 12.</b> Expressão do receptor AT1 no músculo sóleo .....	44
<b>Figura 13.</b> Expressão do receptor AT2 no músculo sóleo .....	45
<b>Figura 14.</b> Expressão do receptor Mas no músculo sóleo .....	46
<b>Figura 15.</b> ECA, AngII e correlação entre a ECA a AngII no músculo plantar .....	47

<b>Figura 16.</b> ECA2, Ang-(1-7) e correlação entre a ECA2 e Ang-(1-7) no músculo plantar.....	49
<b>Figura 17.</b> Razão entre a ECA e a ECA2 e razão entre a Ang-(1-7)/AngII no músculo plantar.....	50
<b>Figura 18.</b> Expressão do receptor AT1 no músculo plantar .....	50
<b>Figura 19.</b> Expressão do receptor AT2 no músculo plantar .....	51
<b>Figura 20.</b> Expressão do receptor Mas no músculo plantar .....	52

**LISTA DE FIGURAS CAPITULO 2**

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) .....	88
<b>Figura 2.</b> Delineamento experimental .....	97
<b>Figura 3.</b> Modelo de Clampeamento .....	102
<b>Figura 4.</b> Capacidade funcional.....	106
<b>Figura 5.</b> Concentração plasmática de AngII .....	109
<b>Figura 6.</b> Concentração de AngII e do receptor AT1 no músculo sóleo .....	110
<b>Figura 7.</b> Expressão gênica dos atrogenes MuRF, Atrogin e E3 $\alpha$ no músculo sóleo .....	111
<b>Figura 8.</b> Proteínas ubiquitinadas e proteínas carboniladas no músculo sóleo .....	112
<b>Figura 9.</b> Atividade do proteassoma no músculo sóleo .....	113
<b>Figura 10.</b> Concentração de AngII e do receptor AT1 no músculo plantar.....	114
<b>Figura 11.</b> Expressão gênica dos atrogenes MuRF, Atrogin e E3 $\alpha$ no músculo plantar .....	115
<b>Figura 12.</b> Proteínas ubiquitinadas e proteínas carboniladas no músculo plantar .....	112
<b>Figura 13.</b> Atividade do proteassoma no músculo plantar .....	117

**LISTA DE TABELAS CAPITULO 1**

<b>Tabela 1.</b> Sequência de oligonucleotídeos .....	24
<b>Tabela 2.</b> Características ecocardiográficas basais .....	31
<b>Tabela 3.</b> Características ecocardiográficas .....	33
<b>Tabela 4.</b> Massa tecidual.....	36
<b>Tabela 5.</b> Angiotensina I e razão AngII/AngI no plasma .....	38
<b>Tabela 6.</b> Angiotensina I e razão AngII/AngI no músculo sóleo.....	41
<b>Tabela 7.</b> Angiotensina I e razão AngII/AngI no músculo plantar .....	48

**LISTA DE TABELAS CAPITULO 2**

<b>Tabela 1.</b> Sequência de oligonucleotídeos .....	98
<b>Tabela 2.</b> Características ecocardiográficas .....	105
<b>Tabela 3.</b> Características morfológicas .....	108

## RESUMO

Gomes-Santos IL. Angiotensina II e treinamento físico na insuficiência cardíaca: implicações para a miopatia esquelética [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

**INTRODUÇÃO:** *Capítulo 1.* A Insuficiência Cardíaca (IC) é acompanhada de uma hiperativação simpática e do sistema renina-angiotensina (SRA). As ações deletérias do SRA são atribuídas à Angiotensina II (AngII), mas a Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), um metabólito da AngII, demonstra efeitos cardiovasculares benéficos, contrários aos da AngII. O conceito tradicional é de que as concentrações sistêmicas mediam as respostas do SRA, mas evidências emergem acerca da importância funcional do SRA local. Nesse estudo, estudou-se o SRA circulante e muscular esquelético na IC, testando-se a hipótese de que as alterações seriam diferentes nesses dois territórios, e que o treinamento físico corrigiria essas alterações. *Capítulo 2.* A IC é uma síndrome sistêmica, onde fatores neuroendócrinos, como a AngII, podem levar a alterações periféricas. Na musculatura esquelética, a hiperatividade do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) é um dos elementos que compõem um quadro de miopatia, aumentando o catabolismo muscular em direção à atrofia, e contribuindo com o agravamento da síndrome. O treinamento físico normaliza o SUP e reduz as concentrações plasmáticas de AngII na IC. Dessa forma, testamos a hipótese de que a redução do SUP mediada pelo treinamento físico na IC depende da queda das concentrações plasmáticas de AngII. **MÉTODOS:** *Capítulo 1.* Ratos Wistar, machos, foram induzidos à IC por ligadura da artéria coronária descendente anterior, ou cirurgia fictícia (Sham, SH). Os animais foram divididos em grupos mantidos sedentários, SD (SHSD, n=10 e ICSD, n=12) ou submetidos ao treinamento físico, TR (SHTR, n=10, ICTR, n=12). O treinamento físico foi realizado em esteira, a 60% do consumo máximo de oxigênio, 5 dias por semana durante 8 semanas, quando foram sacrificados para coleta de sangue e músculos (sóleo e plantar). As angiotensinas circulantes e musculares foram dosadas por HPLC. A atividade sérica e muscular da ECA e da ECA2 por fluorimetria. Os receptores AT1 e AT2 foram analisados por expressão gênica (RT-PCR) e proteica (Western Blot), e o

receptor Mas por expressão gênica. **Capítulo 2.** Ratos Wistar, machos, foram induzidos à IC por ligadura da artéria coronária descendente anterior, ou cirurgia fictícia (Sham). Após 4 semanas, os animais Sham (n=10) constituíram um grupo sedentário saudável (SHSD) e os animais com IC (n=30) foram igualmente alocados em 3 grupos: um mantido sedentário (ICSD), um treinado (ICTR) e um treinado com as concentrações plasmáticas de AngII nos mesmos níveis dos animais do grupo ICSD (ICTRAII), mantidas através de minipump osmótica. O treinamento físico foi realizado em esteira, a 60% do consumo máximo de oxigênio, 5 dias por semana durante 8 semanas, quando foram sacrificados para coleta de sangue e músculos (sóleo e plantar). As angiotensinas circulantes e musculares foram dosadas por HPLC. A expressão gênica das enzimas ligases E3 $\alpha$ , MuRF e Atrogin foi realizada por RT-PCR. O receptor AT1, as proteínas ubiquitinadas e as proteínas carboniladas (Oxyblot) foram quantificadas por Western Blot. A atividade da porção 26S do proteossoma foi determinada por fluorimetria. **RESULTADOS:**

**Capítulo 1.** Na circulação, a atividade da ECA2 estava reduzida na IC, e o treinamento físico reduziu a atividade da ECA e restaurou a atividade da ECA2 esses animais. A concentração de AngII reduziu nos grupos treinados, e a razão Ang-(1-7)/AngII aumentou no grupo ICTR. Nos músculos, não houve alteração em relação à atividade ou expressão proteica da ECA ou da ECA2, mas a concentração de AngII estava aumentada com a IC, e normalizou com o treinamento físico. A concentração de Ang-(1-7) aumentou no músculo plantar do grupo ICTR, e a razão Ang-(1-7)/AngII apresentou forte tendência de aumento no músculo sóleo dos animais treinados. No músculo sóleo, o AT1 estava aumentado nos animais com IC, e o treinamento físico normalizou a expressão gênica e proteica desse receptor, e também aumentou a expressão gênica do receptor Mas nos grupos treinados. No músculo plantar, normalizou a expressão gênica do receptor Mas, sem alterar o AT1. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão do receptor AT2 nos músculos estudados. **Capítulo 2.** O treinamento físico promoveu uma melhora da capacidade de exercício em ambos os grupos treinados. A AngII aumentou nos músculos dos animais com IC, e o treinamento físico normalizou esses valores. Na circulação, como se esperava, a AngII diminuiu apenas no grupo ICTR. A expressão do receptor AT1 aumentou no músculo sóleo com a IC e normalizou com o treinamento físico, sem diferenças entre grupos no músculo plantar. Em relação à expressão gênica das E3 ligases e na quantidade de proteínas ubiquitinadas e carboniladas, não houve diferenças entre os grupos no

músculo sóleo. Já no músculo plantar, a expressão do atrogin estava aumentada nos animais com IC, e o treinamento físico reduziu a expressão tanto da atrogin quanto da E3 $\alpha$  e da MuRF. Essa melhora foi prejudicada com a infusão de AngII. Refletindo esse cenário, a quantidade de proteínas ubiquitinadas e carboniladas estavam aumentadas na IC e reduziram com o treinamento físico, e a infusão de AngII atenuou a redução das proteínas ubiquitinadas e aboliu a diminuição das oxidadas. A atividade do proteassoma aumentou em ambos os músculos de animais com IC, e o treinamento físico reduziu a atividade nos animais treinados, sendo significativamente menor no grupo ICTRAII. **CONCLUSÕES: Capítulo 1.** Em modelo de IC crônica, os níveis de AngII estão aumentados na musculatura esquelética, mas não na circulação. O treinamento físico reduz os níveis plasmáticos de AngII na circulação e normaliza nos músculos. Essa redução é acompanhada de um aumento dos níveis de Ang-(1-7) ou da melhora na razão Ang-(1-7)/AngII em ambos os territórios, indicando uma atenuação da hiperativação do SRA na IC com o treinamento físico. **Capítulo 2.** Em modelo isquêmico de IC crônica em ratos, há uma diferença no perfil do SUP no músculo sóleo e no músculo plantar. O treinamento físico reduz a atividade do SUP e, ao menos no músculo plantar, essa melhora parece ser dependente da redução dos níveis de AngII.

**Descritores:** Insuficiência cardíaca; Sistema renina-angiotensina; Doenças musculares; Terapia por exercício; Atrofia muscular/patologia; Atrofia muscular/reabilitação; Ubiquitina/genética; Exercício/fisiologia; Angiotensina II; Ratos Wistar.

## ABSTRACT

Gomes-Santos IL. Angiotensin II and exercise training in Heart Failure: implications to skeletal muscle myopathy [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

**INTRODUCTION:** *Chapter 1.* Heart Failure (IC) is a syndrome accompanied by a sympathetic and renin-angiotensin system (RAS) hyperactivity. The deleterious actions of RAS are attributed to Angiotensin II (AngII), but Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)), a metabolite of AngII, shows benefic cardiovascular effects opposing to AngII. The traditional concept states that the systemic concentrations are responsible for RAS actions, although increasingly evidence emerge about the functional role of local RAS. The working hypothesis was that the RAS alterations, if any, would be different on this two territories of heart failure rats, and the exercise training should correct this alterations. *Chapter 2.* Heart failure is a systemic syndrome in which neuroendocrine factors, such as angiotensin II (AngII), can lead to peripheral damage. In skeletal muscle, the hyperactivity of ubiquitin-proteasome system (SUP) is one of the elements composing the myopathy framework, elevating the catabolism toward atrophy, and contributing to the worsening of the syndrome. Exercise training normalizes SUP and reduces plasmatic concentrations of AngII. On this way, we tested the hypothesis that exercise training-mediated SUP deactivation is dependent on plasma falls of AngII. **METHODS:** *Chapter 1.* Male Wistar rats underwent left coronary artery ligation or Sham (SH) operation. They were allocated in sedentary, SD (SHSD, n=10 and ICSD, n=12) or trained, TR (SHTR, n=10 and ICTR, n=12) groups. The exercise training consisted in treadmill running, at 60% of maximal oxygen uptake, 5 days per week, during 8 weeks, when they were killed for blood and skeletal muscle (soleus and plantaris) collection. Angiotensin's concentrations were determined by HPLC. ACE and ACE2 activity were accessed in serum and muscles by fluorimetry, and by protein expression (Western Blot) in the muscles. AT1 and AT2 receptors were quantified by protein and gene (RT-PCR) expression, and Mas receptor by gene expression. *Chapter 2.* Male Wistar rats underwent left coronary artery ligation or Sham operation. After 4

weeks, Sham operated rats (n=10) constituted a healthy, sedentary control group (SHSD), and the heart failure rats (n=30) were equally allocated into 3 groups: sedentary (ICSD), trained (ICTR) and trained with plasma AngII at the same level of sedentary, heart failure rats (ICTRAII), kept by an osmotic minipump. The exercise training consisted in treadmill running, at 55% of maximal oxygen uptake, 5 days per week, during 8 weeks, when they were killed for blood and skeletal muscle (soleus and plantaris) collection. AngII concentrations were determined by HPLC. Gene expression of E3 $\alpha$ , MuRF e Atrogin were performed by PR-PCR. AT1 receptor, ubiquitinated and carbonylated (oxyblot) proteins were quantified by Western Blot. Proteasomal 26S activity were determined by fluorimetry. **RESULTS: Chapter 1.** Heart failure reduced circulating ACE2 activity, and exercise training reduced ACE and normalized ACE2 activity in this rats. AngII concentration reduced in both trained groups, increasing Ang-(1-7)/AngII ratio on ICTR group. The studied skeletal muscles did not change activity or protein expression of ACE and ACE2, although the AngII, which was increased with heart failure, has normalized with exercise training. Absolute Ang-(1-7) concentration increased in plantaris muscle, and a strong tendency of significant increase was shown in soleus muscle of trained rats. Also in the soleus, AT1 receptor raised with heart failure, and the exercise training normalized the gene as well as protein expression of this receptor, also increasing gene expression of Mas receptor of trained groups. In plantaris muscle, exercise normalized Mas receptor in ICTR, without influencing AT1 receptor. No significant changes among groups were found in relation to AT2 receptor of the studied muscles. **Chapter 2.** Exercise training promoted an improvement of exercise capacity in trained groups. AngII raised in skeletal muscle of rats with heart failure, and exercise training normalized this. Circulating AngII, as expected, reduced only in ICTR group. AT1 receptor expression increased in soleus muscle of heart failure, and normalized after exercise in trained rats, without any difference among groups in plantaris muscle. Regarding E3 ligases gene expression and quantity of ubiquitinated and carbonylated proteins, there were no differences among groups in soleus muscle. Nevertheless, in plantaris muscle, atrogin expression was increased in heart failure rats, and exercise training reduced atrogin, as well as E3 $\alpha$  and MuRF expression. These improvements were impaired by AngII infusion. Mirroring this scenario, the amount of ubiquitinated and carbonylated proteins increased with heart failure and reduced with exercise training, but AngII infusion lessen the reduction of ubiquitinated proteins and completely blunted the effects of exercise on

carbonylated proteins. Proteasome 26S activity was increased in both muscles of heart failure rats, and exercise avoided this increase in trained rats, being significantly reduced in ICTRAII. **CONCLUSIONS: Chapter 1.** In a model of chronic heart failure rats, AngII levels are increased in skeletal muscle, but not in the circulation. The exercise training reduces plasma and normalizes skeletal muscle concentration of AngII. This reduction is accompanied by an increase Ang-(1-7) levels, or improvements of Ang-(1-7)/AngII ratio in both systemic and local territories, indicating an attenuation of RAS hyperactivity with exercise training in heart failure rats. **Chapter 2.** In a model of chronic heart failure rats, there is a difference on SUP activation profile in soleus and plantaris muscle. Exercise training reduces SUP activity and, in plantaris muscle, this amelioration seems to be, at least in part, dependent of a reduction in AngII levels.

**Descriptors:** Heart failure; Renin-angiotensin system; Muscular diseases; Exercise therapy; Muscular atrophy/pathology; Muscular atrophy/rehabilitation; Ubiquitin/genetics; Exercise/physiology; Angiotensin II; Rats, Wistar

**Efeito do treinamento físico no balanço  
sistêmico e muscular esquelético dos  
eixos ECA/AngII/AT1 - ECA2/Ang-(1-7)/Mas  
na insuficiência cardíaca crônica**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema Renina Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um sistema complexo, constituído por hormônios e peptídeos regulados por diversas enzimas, que exercem um amplo espectro de funções em todo o organismo, em especial no sistema cardiovascular. O marco inicial do SRA se deu na observação de Tigersted & Bergman, em 1898. Estes investigadores verificaram que o extrato renal de coelhos, injetado na circulação em animais saudáveis, causava um aumento rápido e sustentado da pressão arterial<sup>1</sup>. Este extrato foi inicialmente denominado substância de renina. Contudo, somente 42 anos depois se chegou ao isolamento de uma substância vasoconstritora, o que ocorreu de modo independente e concomitante por dois grupos. Bernardo Houssay, fisiologista da Universidade de Buenos Aires, e seu aluno Eduardo Braun-Menendez identificaram a renina como uma enzima proteolítica de globulinas sanguíneas que teria como produto final a substância denominada hipertensina<sup>2</sup>. Na mesma época, Irvine Page, do Eli Lilly Research Laboratory, isolou e descreveu a substância com as mesmas propriedades vasoconstritoras, denominando-a angiotonina<sup>3</sup>. Em 1957, estes autores sugeriram a adoção do termo híbrido angiotensina para essa substância<sup>4</sup>.

Classicamente, a cascata de sinalização do SRA começa com a liberação de renina pelos rins. A renina é sintetizada como uma pré-enzima (pré-pró-renina), com 406 aminoácidos e peso molecular de ~45kDa. Ela

passa por modificações pós-translacionais, como a clivagem de uma sequência de 20 aminoácidos, gerando a pró-renina no interior do retículo endoplasmático, que é em capsulada pelo complexo de golgi em uma forma glicosilada. Parte é liberada na circulação<sup>5</sup> e parte direcionada às células justaglomerulares renais, onde a separação na porção N-terminal de 46 aminoácidos é convertida na forma ativa com 38kDa<sup>6</sup>, a qual é excitada frente a estímulos como a redução da pressão de perfusão renal<sup>7</sup>.

Uma vez na circulação, a renina cliva a ligação Leu10-Leu11 de seu único substrato conhecido, uma  $\alpha$ -globulina circulante proveniente dos hepatócitos, denominada angiotensinogênio, formando o decapeptídeo Angiotensina I (AngI)<sup>6</sup>. A AngI é degradada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), uma glicoproteína com massa molecular de ~180kDa pertencente à família das zinco metalopeptidases, que catalisa a hidrólise dipeptídica da porção carboxiterminal de diferentes oligopeptídeos. A ECA é caracterizada em três formas distintas: a somática, composta por dois domínios homólogos, com um sítio catalítico cada (C-terminal e N-terminal) que é ancorada em um único domínio transmembrânico próximo à região C-terminal na membrana plasmática de diversos tipos de células, em especial na superfície endotelial pulmonar<sup>6</sup>; a solúvel, presente no soro e em fluidos corporais, derivada da própria forma somática, que tem seu domínio ectópico solubilizado pela ação de mecanismos proteolíticos endógenos denominados “secretases da ECA”<sup>8</sup>; e a testicular ou germinal, que possui apenas um sítio catalítico equivalente à porção C-terminal da forma somática, expressa exclusivamente nos testículos que é de grande

importância na fertilidade<sup>9</sup>. Ambos os sítios catalíticos são capazes de degradar a AngI. Entretanto, apesar da afinidade ser similar aos dois sítios, a taxa de hidrólise na porção C-terminal da ECA é responsável por cerca de 75% da clivagem da AngI, enquanto a porção N-terminal pelos 25% restantes<sup>10</sup>. A ECA hidroliza a porção Phe-His da AngI, liberando o dipeptídeo His-Leu<sup>11</sup> e, com isso, a Angiotensina II (AngII).

A AngII é a forma biologicamente ativa mais importante do eixo clássico do SRA. Trata-se de um octapeptídeo com meia-vida bastante curta, em torno de 15 segundos na circulação de ratos, cujo catabolismo ocorre durante o trânsito ao longo do leito vascular<sup>12</sup>, o que sugere que a geração desse peptídeo na circulação está associada à ação local. As ações da AngII são mediadas por sua ligação ao receptor do AngII tipo 1 (AT1), responsável pelas ações mais conhecidas da AngII, e do tipo 2 (AT2), cuja ativação leva a efeitos aparentemente opostos à ativação do AT1. Em roedores, o AT1 é ainda expresso nas isoformas AT1<sub>a</sub> e AT1<sub>b</sub>, que possuem 94% de homologia e semelhante afinidade de ligação e transdução de sinal a partir da AngII<sup>13</sup>.

O receptor AT1 é expresso de forma ubiqüitária em todo o organismo. No sistema cardiovascular causa inotropismo cardíaco, vasoconstrição, aumento da atividade simpática adrenérgica, retenção de sódio e fluídos e, conseqüentemente, aumento na pressão arterial. Trata-se de um receptor constituído por 359 aminoácidos e 40kDa que forma uma proteína integral com 7 domínios transmembrânicos acoplados à múltiplas heterotrimétricas proteínas G. Ele também possui sinalização independente de proteína G,

através da ativação de vias de MAP kinases, de receptores de tirosina quinase e de atividade quinase independente da tirosina<sup>14,15</sup>.

O efeito da ligação da AngII ao receptor AT1 parece transitório. Após a ligação com a AngII, os receptores são dessensibilizados por fosforilação de resíduos Ser-Thr na porção intracelular e, então, internalizados juntamente com o ligante por endocitose, formando vesículas<sup>16</sup>. A maior parte dos receptores é reciclada por endossomos e retorna à membrana, enquanto o restante, juntamente com a AngII, é degradado por peptidases nos endossomos<sup>17</sup>. Entre outros mecanismos de dessensibilização, pode-se destacar o próprio receptor AT2, que provoca heterodimerização com o AT1, impedindo a sua alteração conformacional para ativar a proteína G<sup>18</sup>.

Embora a associação do SRA com a regulação e aumento da pressão arterial fosse evidenciada desde o seu descobrimento, a percepção de envolvimento na fisiopatologia cardiovascular ganhou força no início dos anos 1970, com a observação de desfechos clínicos importantes, como o infarto agudo do miocárdio (IAM)<sup>19</sup> e de ensaios de opinião a partir de achados clínicos e experimentais preliminares<sup>20</sup>.

## **1.2. Sistema Renina-Angiotensina e Insuficiência Cardíaca**

A IC é uma síndrome complexa e comumente entendida como a via final de doenças cardíacas. Ela causa intolerância aos esforços físicos e declínio da qualidade de vida. A taxa de hospitalizações recorrentes e mortalidade em pacientes que sofrem de IC são elevadas, constituindo-se,

portanto, numa condição de alto custo para o sistema de saúde<sup>21</sup>. Nos EUA, a IC acomete mais de 5 milhões de adultos, e está aumentando. Atualmente, o risco de um indivíduo com mais de 40 anos desenvolver IC ao longo da vida é de 20% e, uma vez diagnosticada, apenas 50% dos pacientes sobrevivem após 5 anos<sup>22</sup>.

É bem descrito que após uma injúria cardíaca importante, como a que ocorre no IAM, há queda no débito cardíaco. O mecanismo compensatório para essa resposta é o aumento no sistema nervoso simpático, que provoca elevação na contratilidade miocárdica e aumento na pressão de perfusão, cujo resultado é um aumento compensatório do débito cardíaco<sup>23</sup>. Por outro lado, a vasoconstrição periférica decorrente da elevação simpática leva à diminuição de fluxo renal<sup>24</sup>, causando liberação de renina pelas células renais e consequente ativação do SRA. Este processo retroalimenta a ativação do sistema nervoso simpático e provoca aumento na retenção de sódio e fluídos<sup>25</sup>, como forma de preservar a homeostase circulatória. Inicialmente benéfica, essa ativação neurohumoral em longo prazo aumenta a pré-carga e a pós-carga do ventrículo esquerdo. O resultado de todo este ajuste hemodinâmico é o remodelamento e a fibrose progressivos do coração e o agravamento da disfunção cardíaca<sup>23</sup>.

As alterações cardíacas surgem antes do desenvolvimento dos sintomas da IC e contribuem tanto para o agravamento quanto para o aumento do risco de morte súbita<sup>26,27</sup>. Curiosamente, elas apresentam baixa associação com a intolerância ao esforço<sup>28</sup>. Essa constatação é paradoxal e de grande relevância, uma vez que reforça o caráter sistêmico da síndrome.

Este fato levou alguns investigadores a voltarem à atenção para as alterações periféricas na IC, especificamente à estrutura e função da musculatura esquelética<sup>29</sup>, dando origem à hipótese de *miopatia muscular* nesta síndrome<sup>30</sup>. Foi possível, então, identificar perda de massa muscular<sup>29</sup> e alteração na distribuição de fibras<sup>31-33</sup>, que são fatores determinantes na redução da força e da tolerância ao esforço. O SRA tem um papel importante nesse processo, uma vez que ele modula a apoptose<sup>34</sup>, proteólise<sup>35</sup> e, em consequência, a atrofia muscular<sup>36</sup>.

Na progressão da IC, os níveis plasmáticos de AngII variam com o estado clínico, com elevação progressiva de acordo com a evolução da classificação funcional da New York Heart Association<sup>37</sup>, e se tornando um importante marcador de mortalidade em pacientes com IC grave<sup>38,39</sup>. Tanto é que o tratamento com inibidores da ECA tornou-se um dos principais tratamentos farmacológicos da IC. O estudo CONSENSUS I mostrou redução expressiva de mortalidade em pacientes com essa síndrome, submetidos a tratamento com inibidores da ECA<sup>40</sup>. Na realidade, os resultados deste estudo mudaram o paradigma de tratamento da IC. Vale ressaltar, também, que essa conduta terapêutica previne a redução de massa corporal<sup>41</sup> e a atrofia relacionada à apoptose<sup>42</sup> na IC. Entretanto, evidências recentes mostram que o bloqueio farmacológico é insuficiente para evitar a elevação dos níveis plasmáticos de AngII com a evolução da síndrome<sup>39</sup>. Há ainda informações em modelos experimentais que o decurso fisiopatológico da IC apresenta respostas temporais que, cronicamente, se associavam mais as elevações AngII regionais do que as circulantes<sup>43</sup>.

Esses achados, em associação com o avanço das técnicas de bioquímica e biologia molecular, propiciaram duas grandes constatações. Primeiro, a existência de componentes do SRA em praticamente todos tecidos, com novos peptídeos e vias alternativas relevantes para a degradação de angiotensinas<sup>44</sup>. Segundo, a caracterização de um novo eixo do SRA, cujas ações se sobrepõem aos efeitos potencialmente deletérios da elevação crônica do conhecido eixo ECA/AngII/AT1<sup>45</sup>.

Em relação à ativação regional do SRA, constatou-se que, além da concentração de angiotensinas e ECA, havia a existência de um completo RAS local que podia expressar receptores AT1 em diferentes compartimentos celulares e, também, expressar e/ou captar da circulação os diversos componentes do SRA, tais como, a ECA<sup>44</sup>, o angiotensinogênio<sup>46</sup> e a renina/prorenina<sup>47</sup>, aumentando a concentração de angiotensinas no interior das células e permitindo ações intrácrinas e parácrinas sinérgicas às ações hormonais circulantes<sup>44</sup>. Independente das concentrações locais de angiotensinas serem provenientes da formação intracelular<sup>48</sup> ou da captação<sup>49</sup> desses peptídeos, o importante é que os sistemas teciduais estariam mais relacionados à regulação crônica das funções do SRA e de forma independente da circulação<sup>46</sup>.

Outro aspecto relevante dos sistemas locais é a importância de vias alternativas geradoras de angiotensinas. Isto é, enzimas já conhecidas, mas por muito tempo pouco consideradas, tais como, a PEP, Catepsina G, Tonina, Elastase-2, Neprilisina e Quimase<sup>50,51</sup>. Estas enzimas teriam papel significativo nos sistemas locais. Por exemplo, a Quimase responsável por

mais de 90% da formação de AngII no coração<sup>52</sup>. Nesse ínterim, uma nova e interessante perspectiva acerca da geração de AngII surgiu. Nagata e *et al.* isolaram e identificaram um novo peptídeo do SRA, presente no plasma e em diversos tecidos, caracterizado com uma sequência de 12 aminoácidos homólogos à AngII até o 8º resíduo (Figura 1)<sup>53</sup>.

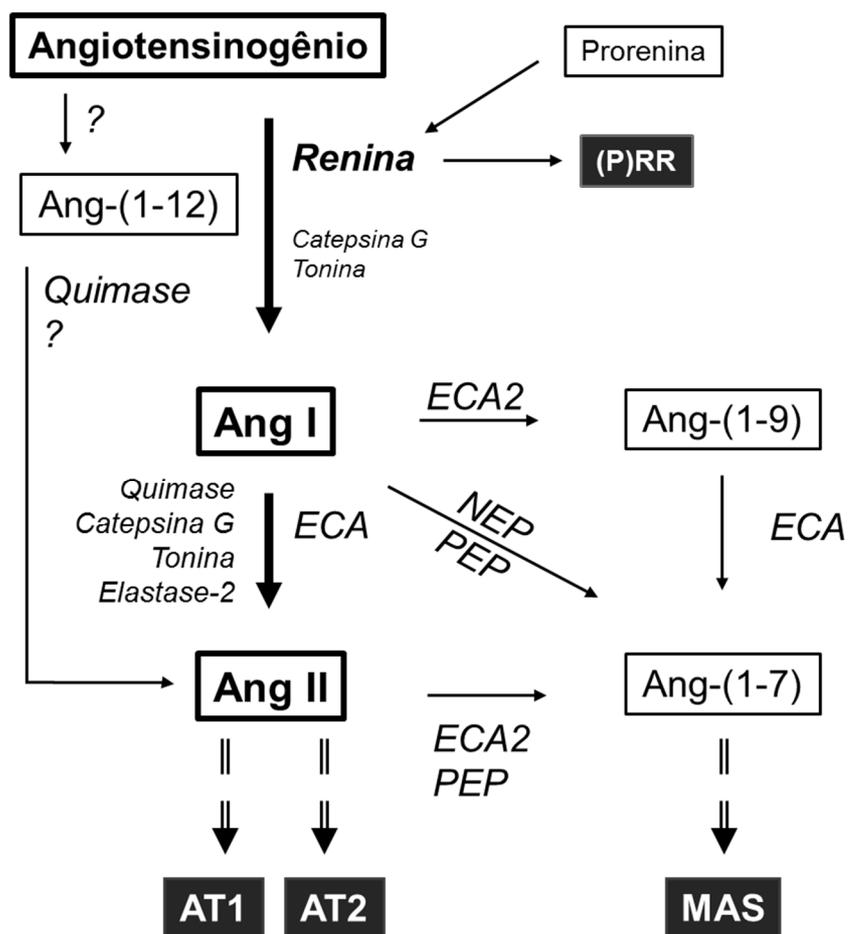
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ang(1-12)	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu	Leu	Tyr
AngI	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu		
Ang(1-9)	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His			
AngII	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe				
Ang(1-7)	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro					

**Figura 1.** Sequência de aminoácidos de angiotensinas mencionadas no estudo.

No estudo, o peptídeo foi denominado proangiotensina-12 (Ang-(1-12)), uma vez que sua ação pressora foi abolida por bloqueadores dos receptores AT1 e inibidores da ECA, sugerindo que se tratava de um precursor da AngII. Posteriormente, ficou demonstrado que a Ang-(1-12) é degradada por uma via independente de renina, em um ponto da cascata acima da AngI, indicando uma via alternativa para a formação da AngII<sup>54,55</sup>. Foi sugerido, também, que a concentração de Ang-(1-12) é maior nos tecidos e com respostas independentes da circulação<sup>56</sup>, e recentemente

descrito que sua degradação se dá principalmente pela Quimase<sup>57,58</sup>. Pouco se sabe sobre esse peptídeo, mas surge o interesse pelos fatores que poderiam influenciar sua concentração e degradação, e mesmo sua relevância na formação de AngII<sup>59</sup>, uma vez que o seu metabolismo parece independente das terapias farmacológicas de atenuação do SRA atualmente empregadas.

O segundo ponto envolve o que se convencionou chamar de nova via ou “braço” do SRA, que é o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas. A grande importância desse novo “braço” é que a sua ativação provoca resposta vasodilatadora, antiproliferativa, antifibrótica e antiarritmogênica, cujos efeitos se opõem àqueles mediados pela elevação crônica do eixo ECA/AngII/AT1<sup>45</sup>. Uma visão ampla da complexa relação do SRA atualmente pode ser apreciada na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema atualizado do Sistema Renina-Angiotensina. Em negrito a visão clássica do SRA, e as demais possibilidades de formação das angiotensinas biologicamente mais ativas, a AngII e a Ang-(1-7). (P)RR, Receptor de Renina/Prorenina; ECA, Enzima conversora de Angiotensina, NEP, Neprilissina, PEP, Prolilendopeptidase.

As principais ações desse eixo envolvem a Angiotensina 1 a 7 (Ang-(1-7)), um heptapeptídeo descoberto há 25 anos que chamou a atenção da comunidade científica por provocar uma ação diurética quando injetada no cérebro de ratos<sup>60</sup>. Isto é, uma ação contrária ao que se conhecia de uma angiotensina. Posteriormente, observou-se que a infusão de Ang-(1-7) gerava vasodilatação e bradicardia<sup>61</sup>. Além disso, associou-se à Ang-(1-7) o

aumento da produção de óxido nítrico e prostaciclina<sup>62</sup> e a redução da atividade proliferativa, apoptótica, arritmogênica e a melhora da resistência à insulina, exatamente contrárias às ações da AngII<sup>45</sup>.

A formação da Ang-(1-7) se dá a partir da degradação de outras angiotensinas por ações da ECA e de uma enzima conversora homóloga à ECA humana, recentemente descrita como ECA2<sup>63,64</sup>. Trata-se de uma zinco metaloproteinase com atividade carboxipeptidase em apenas um sítio catalítico, que apresenta ~40% de homologia com a ECA somática sem ser influenciada pelos seus inibidores. Sugere-se que ela seja secretada e clivada na superfície celular para hidrolisar o resíduo -Leu da AngI e gerar angiotensina 1-9 (Ang-(1-9)), peptídeo biologicamente inativo cuja degradação de dois resíduos terminais gera a Ang-(1-7)<sup>64</sup>. Posteriormente, foi demonstrado um efeito ainda mais importante da ECA2. Ele consiste na remoção do resíduo -Phe da AngII, com uma eficiência catalítica 400 vezes maior que a degradação da AngI<sup>65</sup>. Ou seja, além da formação da Ang-(1-7), a ECA2 degrada AngII. Para melhor compreensão dos pontos de degradação das angiotensinas mencionadas nesse estudo, a sequência de aminoácidos das principais angiotensinas foi listada na Figura 1.

As principais ações da Ang-(1-7) se dão pela sua ligação com o proto-oncogene Mas, que é um receptor com 325 aminoácidos e 7 domínios transmembrânicos acoplado à proteína G, inicialmente descrito como sendo expresso principalmente no cérebro e testículos, e em menor quantidade nos rins, coração e vasos sanguíneos<sup>66,67</sup>. Posteriormente, o Dr. Robson Santos e colaboradores identificaram a Ang-(1-7) como provável ligante do receptor

Mas. E, além disso, este grupo mostrou que a deleção do receptor elimina as ações da Ang-(1-7)<sup>68</sup>.

O efeito cardioprotetor do aumento do eixo ECA- Ang-(1-7)-Mas tem sido demonstrado na IC através de diferentes manipulações de seus componentes. A superexpressão da ECA2 previne hiperatividade simpática<sup>69</sup> e a formação de colágeno<sup>70</sup>, conseqüentemente atenuando o desenvolvimento de fibrose miocárdica e deterioração da função sistólica<sup>71</sup>. Mesmo a administração farmacológica de DIZE, um ativador da ECA2, previne o remodelamento associado à disfunção após o IAM<sup>72</sup>. Da mesma forma, tanto a administração oral de Ang-(1-7)<sup>73</sup> quanto o aumento das concentrações mediadas por lentivirus<sup>74</sup> previnem o desenvolvimento de IC após IAM experimental. Mesmo a administração de agonistas sintéticos do receptor Mas, como o AVE-0991, e mais recentemente o CGEN-856S, mantém esses efeitos cardioprotetores análogos à administração de Ang-(1-7) após dano miocárdico farmacológico ou IAM<sup>75,76</sup>.

### **1.3. Sistema Renina-Angiotensina e Exercício Físico na Insuficiência Cardíaca**

Com a constatação de que o SRA é um sistema muito mais complexo do que se imaginava e de que a ativação crônica do eixo ECA/AngII/AT1 não pode ser completamente controlada por ação farmacológica em seus componentes, novas estratégias tem sido buscadas para atenuar o SRA na IC. Neste sentido, o treinamento físico tem emergido como uma importante

conduta não-farmacológica. Os seus efeitos de caráter sistêmico, cujos benefícios incluem a redução da vasoconstrição e a melhora da tolerância ao esforço são fundamentais no tratamento da IC<sup>77-79</sup>.

Em relação ao SRA, o treinamento físico modula o eixo clássico desse sistema, isto, é a ECA/AngII/AT1. Sabe-se também que a melhora no balanço autonômico mediada pelo exercício na IC está associada a uma redução da ECA/AngII/AT1<sup>80</sup>, especialmente dos níveis plasmáticos de AngII<sup>81,82</sup>. No tecido cardíaco, a redução local desse eixo atenua a hipertrofia e o conteúdo de colágeno<sup>83,84</sup>. Embora se conheça que a AngII gerada localmente exerça um papel mais importante na vasoconstrição periférica do que a AngII sistêmica<sup>85</sup>, e que a AngII provoque efeitos deletérios musculatura esquelética, como, por exemplo, a geração de espécie reativas de oxigênio, associados à fibrose<sup>86</sup>, apoptose<sup>34</sup> e atrofia<sup>87</sup>, os níveis e as implicações da AngII na musculatura esquelética na IC ainda são desconhecidos.

Os efeitos do treinamento físico no eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, mais recentemente descrito, são bem menos conhecidos. O nosso grupo mostrou que o treinamento físico, além de reduzir a ECA/AngII, aumenta ECA2/Ang-(1-7) cardíaca em animais saudáveis<sup>88</sup>. Em condições patológicas, a única informação disponível é que o treinamento físico aumenta a Ang-(1-7) no coração de animais espontaneamente hipertensos<sup>89</sup> e normaliza a expressão da ECA e ECA2 cerebral, que estavam aumentadas e diminuídas, respectivamente, em animais com IC<sup>90</sup>. Entretanto, os efeitos do treinamento físico no balanço da ECA2/Ang-(1-7) na circulação e na musculatura

esquelética na IC crônica não são conhecidos. Considerando que o treinamento físico reduz a AngII na circulação e modula o balanço desses eixos no músculo estriado cardíaco, é possível antecipar que ele também atue no esquelético modulando o eixo ECA2/Ang-(1-7), tanto na circulação quanto na musculatura esquelética.

Nesta etapa da presente investigação, nós descrevemos os efeitos do treinamento físico no balanço do SRA na circulação e na musculatura esquelética, em ratos com IC crônica de etiologia isquêmica.

## 2. OBJETIVOS

Testar a hipótese de que:

- 1) A IC provocada por isquemia do músculo cardíaco altera o SRA circulante e muscular esquelético;
- 2) As alterações no SRA circulante provocada pela IC de modelo isquêmico podem ser distintas daquelas no músculo esquelético;
- 3) O treinamento físico corrige as alterações no SRA circulante e muscular esquelético provocadas pela IC de modelo isquêmico.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Amostra**

Foram estudados ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Os animais chegaram com 3 semanas e foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em sala com temperatura entre 22<sup>o</sup>-24<sup>o</sup> C, em gaiolas com 4 animais cada e ciclo claro-escuro de 12-12 horas invertido ao ciclo regular durante todo o protocolo. O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq 149/09) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC/FMUSP).

#### **3.2. Indução da Insuficiência Cardíaca**

Para indução do infarto, os ratos foram anestesiados com solução em bolus de quetamina e xilazina (50 e 10 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente; *i.p.*), em procedimento adaptado da técnica descrita por Johns e Olson<sup>91</sup>. Brevemente, o animal anestesiado foi tricotomizado na região do tórax, e foi conduzida a toracotomia lateral esquerda, entre o terceiro e quarto espaço intercostal. O músculo peitoral foi divulsionado e as costelas expostas. O coração foi exteriorizado e a artéria coronária descendente anterior foi

enlaçada com fio mononylon 6.0 a aproximadamente 3mm distalmente à sua origem e, então, sutilmente foi atada permanentemente. Imediatamente, o coração foi recolocado na cavidade torácica, que foi rapidamente fechada. Esse procedimento causava uma clara e demarcada área cianótica de isquemia miocárdica aguda, correspondente à área irrigada pela artéria coronária esquerda, e permitiu o desenvolvimento de infartos transmurais. Quatro semanas após a cirurgia, assumimos que os ratos infartados com fração de encurtamento (FS) menor do que 20% haviam desenvolvido insuficiência cardíaca, e seguiriam no estudo.

### **3.3. Avaliação da Função Ventricular**

A função do ventrículo esquerdo foi avaliada por meio da técnica de ecocardiografia, em colaboração com a Dra. Vera Maria Cury Salemi, médica cardiologista da Unidade de Cardiomiopatia do InCor-HC/FMUSP. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia<sup>92,93</sup>. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com solução em bolus de quetamina e xilazina (50 e 10 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente; *i.p.*). O animal anestesiado foi tricotomizado em toda a região torácica, e então colocado em decúbito dorsal, em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizado o equipamento Sequóia (Siemens, Mountain View, CA, EUA) com transdutor de 5,5 a 10 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. Foram obtidas vistas longitudinais e transversais do para-esternal e vista apical da cavidade 2 e 4 do coração,

para a avaliação do fluxo mitral e da velocidade da fração de ejeção do ventrículo esquerdo através do Doppler. As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete ou em discos ópticos, para análise posterior. A função sistólica foi avaliada pela mudança da área fracional, que corresponde à diferença da área diastólica pela área sistólica, dividida pela área diastólica e multiplicada por 100, para representação em porcentagem de três regiões (basal, média e apical) e pela fração de ejeção utilizando o método de Simpson. A função diastólica foi avaliada pelos valores derivados da curva de velocidade do enchimento na diástole pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo realizado pelo Doppler. O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado após 4 semanas de cirurgia de indução do infarto ou cirurgia fictícia (Sham), e após o período experimental. Em cada exame foi coletado um total de três medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente as médias dessas medidas.

### **3.4. Avaliação da Capacidade Funcional**

A capacidade funcional foi determinada pelo consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ), medido durante um teste escalonado progressivo em esteira rolante (adaptado de Brooks e White<sup>94</sup>). O teste teve início com a velocidade de 6m/min e incrementos de 3 m.min<sup>-1</sup> a cada 3 minutos até que o animal não conseguisse manter a velocidade de corrida.

A medida do consumo de oxigênio foi feita por meio de um sistema de análise metabólica, que consistiu na utilização de uma caixa metabólica

conectada a um analisador de oxigênio, fornecendo a concentração de oxigênio no interior da caixa. Foi utilizada uma caixa metabólica de 3,5L. A essa câmara foi conectado um tubo na forma de “Y” de onde parte da amostra era retirada por uma bomba (Fanem, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo, por uma bomba do analisador de gases (Sable Systems SubSamplerVersion3, SS-3). A caixa possui um acesso para a entrada de um fluxo de ar unidirecional, que é sugado pelas bombas aspiradoras. A caixa metabólica possui internamente uma esteira, permitindo a realização do exercício físico em um ambiente fechado e, no final do tapete da esteira, há uma grade metálica que permite uma área de estímulo intermitente através de choque elétrico, variando de 0 a 1,5mA e 160V, em frequência de repetição de até 3Hz. Os animais foram adaptados ao estímulo elétrico previamente, e durante o teste o mesmo foi utilizado apenas nos estágios finais. No caso de o animal entrar em fadiga antes de completar o último estágio, o tempo e a distância percorrida foram calculados relativamente a esse estágio, quando ao menos 30 dos 180s fossem completados. No mesmo teste progressivo, a razão entre o produto da massa corporal (kg) e da distância total percorrida (m), e a aceleração vertical ( $10\text{m}\cdot\text{s}^2$ ), forneceu o trabalho realizado até a exaustão, em J. O  $\text{VO}_{2\text{max}}$  foi definido como o maior consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ) atingido antes da exaustão, calculado pela fórmula  $\text{VO}_{2\text{max}}=[(\text{pO}_2 \text{ ambiente} - \text{pO}_2 \text{ estágio}) \times \text{F}] \times \text{m}^{-1}$ , onde o  $\text{pO}_2$  é a pressão parcial de oxigênio medida no ambiente antes do teste e continuamente em cada estágio dentro da câmara, F é o fluxo dentro da câmara ( $3500 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e m é a massa corporal do rato, em kg.

### **3.5. Protocolo de Treinamento Físico**

O treinamento foi realizado em esteira rolante, com duração de 60 minutos por sessão, 5 dias por semana ao longo de 8 semanas. O treinamento ocorreu numa intensidade correspondente moderada, a 60% do  $VO_{2max}$  atingido no teste, até atingir gradativamente 60min por sessão, o que ocorria em 2 a 3 semanas de treinamento. Na metade do protocolo experimental, ao fim da 4ª semana, os animais dos grupos treinados fizeram novamente o teste para reajuste da carga de treinamento<sup>95</sup>.

### **3.6. Sacrifício e Coleta dos Tecidos**

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento físico, os animais foram eutanasiados por decaptação, através de guilhotina específica e sem anestesia prévia. O sangue foi coletado em 3 tubos de ensaio, sendo um tubo seco, um com ácido etilenodinitrilotetraacético a 7,5 (EDTA) e um contendo EDTA e coquetel inibidor de proteases (*Complete Mini Tablets*, Roche, EUA). Assim que possível, o sangue foi centrifugado a 3000rpm durante 15min, a 4°C, e o soro (tubo seco) ou plasma (coletados com EDTA) foram separados e estocados em freezer -80°C para posterior análise.

Os tecidos provenientes destes animais foram excisados, lavados em solução salina, imediatamente pesados em balança analítica e descartados, à exceção dos músculos sóleo e plantar, que foram colocados em microtubos individuais, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e estocados para análises posteriores. As cavidades cardíacas foram

dissecadas e pesadas separadamente, sendo o peso do coração a soma de suas cavidades.

O pulmão foi pesado e a massa encontrada correspondeu ao peso úmido do órgão (PU). Em seguida, foi colocado em estufa a 50°C por 48h, sendo novamente pesado para obtenção do peso seco (PS). De posse desses valores, foi possível calcular o teor de água (% água) presente nesse órgão, através da fórmula  $\% \text{ água} = [(PU - PS) \times PU^{-1}] \times 100^{96}$ .

### **3.7. Expressão Gênica**

Para extração do RNA total, cerca de 40mg de tecido foram homogeneizados com o reagente TRIZOL (Invitrogen, USA). O homogeneizado foi transferido para tubos de 1,5mL e centrifugados por 5 minutos a 10.000rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo 1,5mL, onde foi adicionado 200µL de clorofórmio. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, e novamente centrifugados por 15min a 12000rpm à 4°C. Após a centrifugação, observou-se 3 fases, que consistiam no RNA, DNA e proteína respectivamente. O RNA foi retirado e transferido para novos tubos. Em temperatura ambiente, foi acrescentado 1mL de álcool isopropílico. Novamente, os tubos foram centrifugados por 10min à 12000rpm e 4°C. Foi observada a formação de um precipitado. O sobrenadante foi retirado e a ele acrescentado 1mL de etanol 75% para que o precipitado perdesse a aderência com o tubo. Os tubos foram centrifugados novamente por 5min a 12000rpm e 4°C. O etanol

foi retirado dos tubos e, uma vez seco, o precipitado foi ressuspensão em H<sub>2</sub>O DEPC, agitando os tubos serão para dissolvê-lo. Para confirmação da qualidade do processo de extração, foi utilizada uma relação RNA/DNA, determinada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA), entre os comprimentos de onda de 260 e 280nm, sendo somente utilizadas amostras que atingirem o intervalo de onde entre 1,6 a 2,0. A partir disto, foi verificada a integridade do RNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A transcrição reversa (cDNA) foi confeccionada com RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, EUA). Para isso, 2µg de RNA total foram adicionados num tubo contendo 0,5µg de oligo dT, 20u de RiboLock™ RNase inhibitor, 1mM de dNTP mix, 200µ de RivertAid™ Reverse transcriptase, totalizando uma solução final de 20µL (Fermentas, EUA), que foi incubada a 42°C por uma hora e mais 10min a 70°C para o término da transcrição reversa. A expressão do RNA mensageiro foi avaliada por *polimerase chain reaction* (PCR) em tempo real, utilizando uma alíquota de cDNA, primers específicos para os genes estudados (Tabela 1) e o marcador fluorescente SYBR Green qPCR (Fermentas, EUA), que se liga à dupla-fita amplificada.

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para avaliação da expressão gênica de RNA mensageiro em ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR).

	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
<b>Ciclofilina</b>	TGG CAA GCA TGT TGG GTC TTT GGG AAG	GGT GAT CTT CTT GCT GCT CTG CCA TTC
<b>Mas</b>	GAC CAG CCC ACA GTT ACC AGT T	CCA GGG TTC CCC TTC TGA CT
<b>AT1a</b>	CAC AAC CCT CCC AGA AAG TG	AGG GCC ATT TTG TTT TTC TG
<b>AT2</b>	GAA CAG AAT TAC CCG TGA CC	ATG AAT GCC AAC ACA ACA GC

As reações de PCR se deram em tempo real, através da ciclagem a 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s cada ciclo e 60°C por 1min. A quantificação da fluorescência emitida pela amplificação dos genes foi detectada pelo Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA). O método de limiar comparativo de ciclos (Ct) foi adotado, conforme recomendação do fabricante, utilizando um limiar de 0,12. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e cada gene como o Ct do gene menos o gene normalizador, nesse caso a ciclofilina. O cálculo das mudanças relativas à expressão de RNAm em cada grupo foi realizado pela subtração do DCt pelo DCt do grupo controle (SHSD) (DDCt), e os resultados apresentados em % do controle.

### 3.8. Expressão Proteica

Os níveis proteicos de AT1, AT2, ECA e ECA2 nos músculos esqueléticos foram analisados por *western blot*. Porções (aproximadamente 50mg) foram homogeneizadas em tampões de lise celular contendo 100mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1% Triton X-100 e inibidores de protease e fosfatase (1:100; Sigma-Aldrich, USA). Os detritos insolúveis dos músculos foram removidos por centrifugação a 3000xg, a 4°C por 10min. Foi adicionado às amostras uma tampão de carga (Laemmli, 1:1 à quantidade de proteína, Sigma-Aldrich, EUA), e 30µg de proteína para cada amostra foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (10%). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas eletricamente para membrana de nitrocelulose (BioRad Biosciences, EUA). Em seguida, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (5% BSA) por 2h em temperatura ambiente e, então, incubada durante a noite a 4°C com os anticorpos primários para mouse anti-AT1 (ab9391, Abcam, EUA), rabbit anti-AT2 (sc-9040, Santa Cruz, EUA), mouse anti-ECA (ab11734, Abcam, EUA) e rabbit anti-ECA2 (sc-20998, Santa Cruz, EUA). No dia seguinte, as membranas foram lavadas (0.1% Tween 20) e incubadas por 1h30 com os anticorpos secundários, quando foram novamente lavadas e reveladas. A ligação do anticorpo primário foi detectada pela atividade peroxidase do anticorpo secundário, enaltecidas por substratos ECL (Thermo Scientific, EUA), sendo a quimioluminescência detectada pelo aparato ChemiDoc (BioRad Bioscience, EUA). As membranas foram reincubadas com mouse anti-GAPDH (Abcam, EUA) seguindo os mesmos passos já descritos, e os níveis

de expressão dessa proteína nos músculos esqueléticos foram utilizados para normalizar os resultados obtidos para cada amostra. As análises foram realizadas utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Health, EUA).

### **3.9. Determinação da Atividade da ECA e da ECA2**

Para a atividade da ECA, foram 5 $\mu$ l de soro ou 20 $\mu$ L de homogenato de tecido muscular foram incubados com 10 $\mu$ L do substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz, ácido ortoaminobenzóico; Dnp, dinitrofenil) e tampão Tris (HCl 1mM, NaCl 50mM e ZnCl<sub>2</sub> 10 $\mu$ M, pH 7,0) completando um volume final de 200 $\mu$ l em cada poço de uma placa escura. Para cada amostra, foi utilizado um controle negativo (0,5 $\mu$ l de Captopril, inibidor específico da ECA, reduzido do volume de tampão). A atividade enzimática foi determinada em fluorímetro ( $\lambda_{em}$ =420nm e  $\lambda_{ex}$ =320nm), em 90 ciclos de leitura. A atividade da ECA2 foi conduzida seguindo-se os mesmos passos da ECA, mas utilizando-se como substrato fluorescente o YVADAPK(Dnp) (7-etoxyumarina-4yl acetil), e o DX600 1mM como inibidos específico.

As leituras geraram uma curva de fluorescência por unidade de tempo, que foi convertida em  $\mu$ mol de substrato hidrolisado por minuto, e expressa em uF.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> no caso das amostras séricas, e uF.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> para as amostras de tecido<sup>97</sup>.

### 3.10. Determinação das Concentrações de Angiotensinas

A determinação das concentrações plasmáticas e teciduais (sóleo e plantar) de Ang I, AngII e Ang-(1-7) foram realizadas através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em colaboração com a Dra. Dulce Elena Casarini, Departamento de Nefrologia da Unifesp.

A extração das angiotensinas plasmáticas foi realizada através de colunas Oasis C<sub>18</sub> (Waters, MA, USA), previamente ativadas com metanol (5mL), tetraiodofurano (5mL), hexano (5mL), metanol (5mL) e água (10mL). Após ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas em etanol / ácido acético / água na proporção 90% / 4% / 6%. As frações eluídas foram liofilizadas e redissolvidas em 500µL de veículo em fase A (5% acetonitrila em 0,1% ácido ortofosfórico) e filtradas em membranas de 0,22mm para análise no cromatógrafo (HPLC, ShimadzuSystem, Japão). As angiotensinas de cada amostra foram separadas em coluna de fase reversa ODS Aquapor 300 (250x4,6mm), 7µ (Colunas Browlee, PerkinElmer), usando um gradiente de 5 a 35% de fase móvel B (95% de acetonitrila em 0,1% de ácido fosfórico) sob um fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> por 40min. As angiotensinas foram identificadas por comparação com o tempo de retenção amostras padrão de angiotensinas, e os resultados expressos em pmol.mL<sup>-1</sup> de plasma.

Já os tecidos foram pesados e homogeneizados em 100mM de tampão de fosfato de sódio pH 7,2, 340mM de sucrose e 300mM de cloreto de sódio, contendo o mesmo inibidor de proteases descrito na coleta de sangue. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg a 4°C, por 20min e, então,

passaram pela coluna de extração, seguindo a mesma sequência descrita para o plasma, e os resultados expressos em  $\text{pmol.g}^{-1}$  de tecido.

### **3.11. Análise Estatística**

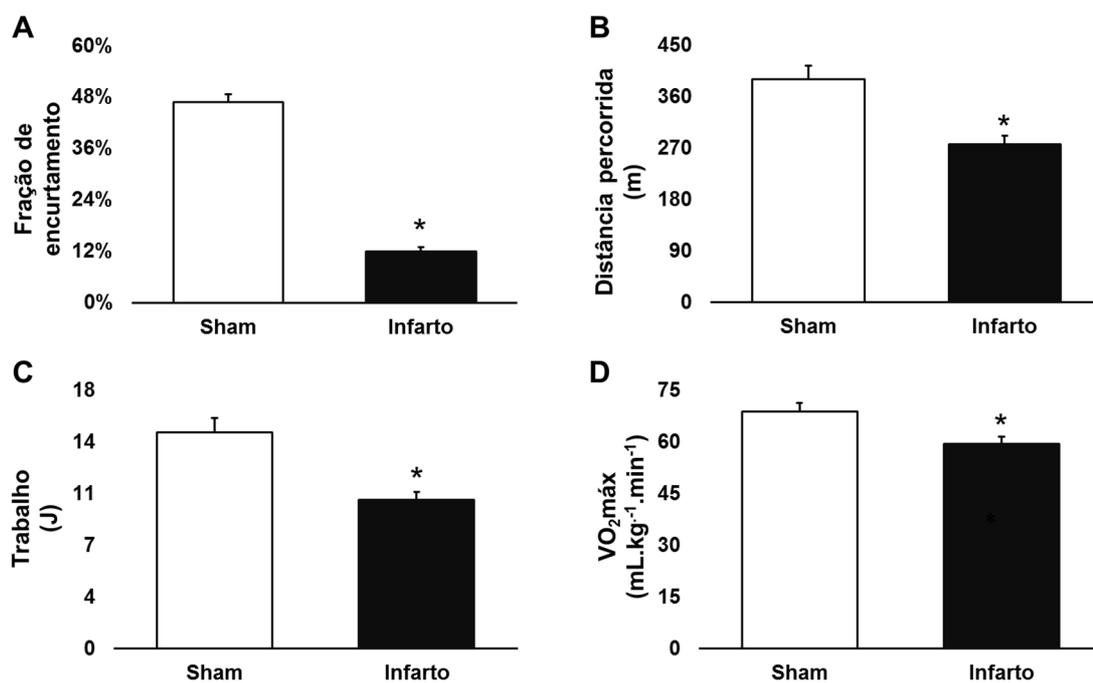
A normalidade dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade pelo método de Levene. Confirmando-se a distribuição normal e variâncias homogêneas, seguiram-se análises paramétricas para comparação entre os grupos. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias, tendo o efeito do tratamento (treinamento físico) e síndrome (IC) como variáveis independentes, comparadas pelo *post-hoc* de Sheffé quando necessário. A correlação entre as variáveis foi verificada pela análise de regressão linear. Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foi adotado um  $p \leq 0,05$  como significativo.

## **4. RESULTADOS**

A seguir, descreveremos os resultados referentes ao Capítulo 1. No primeiro momento, serão descritas as características fenotípicas dos animais dos grupos Sham e dos animais infartados, antes de iniciar o protocolo experimental.

### **4.1. Resultados Basais**

Após 4 semanas da cirurgia, não houve diferença na massa corporal entre do grupos Sham ( $386,51 \pm 14,46g$ ) e infartados ( $377,01 \pm 11,70g$ ). Os animais infartados apresentaram redução significativa na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ( $p < 0,001$ , Figura 3A). Além disso, estes animais apresentaram redução da capacidade funcional, evidenciadas pela distância percorrida ( $p < 0,001$ , Figura 3B), trabalho até a exaustão ( $p < 0,001$ , Figura 3C) e consumo máximo de oxigênio ( $p = 0,005$ , Figura 3D) em relação aos animais do grupo Sham.



**Figura 3.** Função Ventricular e Capacidade Funcional Basal. Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (A), distância percorrida (B), trabalho até a exaustão (C) e consumo máximo de oxigênio (D) em ratos Sham controles (n=18 a 19 por grupo) e infartados. (n=22 a 24 por grupo). \*  $p < 0,05$  vs. Sham.

Os animais infartados também apresentaram alterações no diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo e na parede posterior em diástole e tempo de relaxamento isovolumétrico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características ecocardiográficas do ventrículo esquerdo basais de ratos Sham controles e infartados.

	Sham	Infarto	p
DDVE, mm	7,36±0,16	9,92±0,22	<0,0001
DSVE, mm	4,01±0,20	9,75±0,45	<0,0001
SIVE, mm	1,23±0,06	1,20±0,06	0,32
PPVE, mm	1,11±0,06	0,92±0,05	0,05
FEVE, %	81,70±2,46	28,75±2,18	<0,0001
TRIV, ms	33,37±1,35	43,32±2,44	0,13
E/A	1,69±0,13	1,48±0,24	0,33

Diâmetro diastólico (DDVE) e Sistólico (DSVE), espessura do septo em diástole (SIVE), espessura da parede posterior em diástole (PPVE), fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e relação entre o pico de velocidade de entrada das ondas E e A no fluxo de entrada ventricular (E/A). (Sham, n=19; Infarto, n=22).

Após a avaliação ecocardiográfica, os animais infartados com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo <30% foram aleatoriamente alocados para os grupos com insuficiência cardíaca sedentário (ICSD) e treinado (ICTR). O mesmo procedimento foi seguido no grupo de animais com saudáveis. Eles foram aleatoriamente divididos em sedentários (SHSD) e treinados (SHTR).

## 4.2. Efeito do Treinamento Físico

### 4.2.1. *Massa Corporal e Capacidade Funcional*

Após oito semanas de protocolo experimental, não observamos diferença na massa corporal entre os grupos SHSD, SHTR, ICSD e ICTR estudados ( $452,13 \pm 11,96$ ,  $424,97 \pm 7,93$ ,  $451,83 \pm 17,21$  e  $423,59 \pm 13,47$ g, respectivamente).

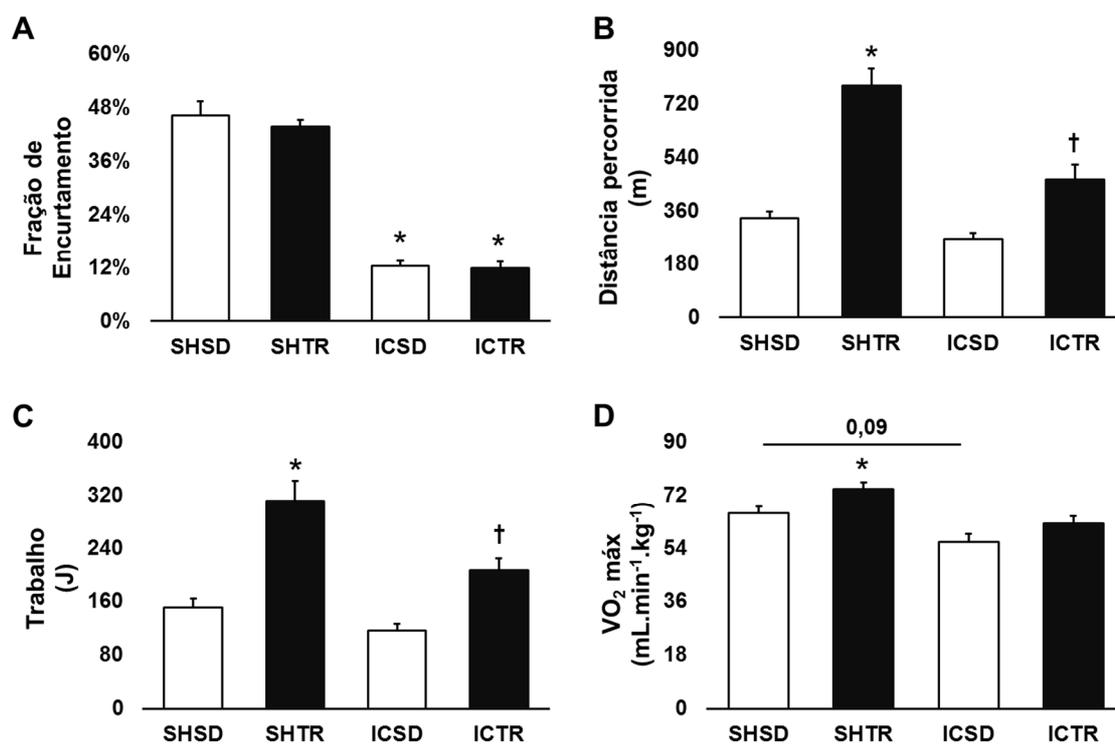
Como podemos observar na Tabela 3, os animais com IC continuaram apresentando importantes alterações na função e estrutura cardíaca, tais como, maior diâmetro sistólico e diastólico e menor fração de encurtamento e de ejeção do ventrículo esquerdo ( $p < 0,001$  vs. SHSD). Entretanto, o treinamento físico preveniu o desenvolvimento de uma disfunção diastólica mais significativa, conforme observada na relação E/A entre os grupos ICTR e ICSD ( $p = 0,01$ ).

**Tabela 3.** Características ecocardiográficas do ventrículo esquerdo de ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários.

	SHSD	SHTR	ICSD	ICTR
DDVE, mm	7,24±0,24	7,70±0,21	11,55±0,32*	11,30±0,32*
DSVE, mm	3,72±0,25	4,54±0,19	10,13±0,36*	9,43±0,60*
SIVE, mm	1,27±0,06	1,18±0,11	1,13±0,11	1,23±0,04
PPVE, mm	1,19±0,06	1,04±0,09	0,95±0,07	1,03±0,07
FEVE, %	81,83±2,73	79,92±1,42	29,73±2,69*	28,37±3,18*
TRIV, ms	45,90±6,17	38,30±3,40	43,70±3,85	50,50±6,50
E/A	1,62±0,12	1,50±0,07	3,85±0,69*	2,70±0,48

Diâmetro diastólico (DDVE) e Sistólico (DSVE), espessura do septo em diástole (SIVE), espessura da parede posterior em diástole (PPVE), fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e relação entre o pico de velocidade de entrada das ondas E e A no fluxo de entrada ventricular (E/A). (n=10 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD.

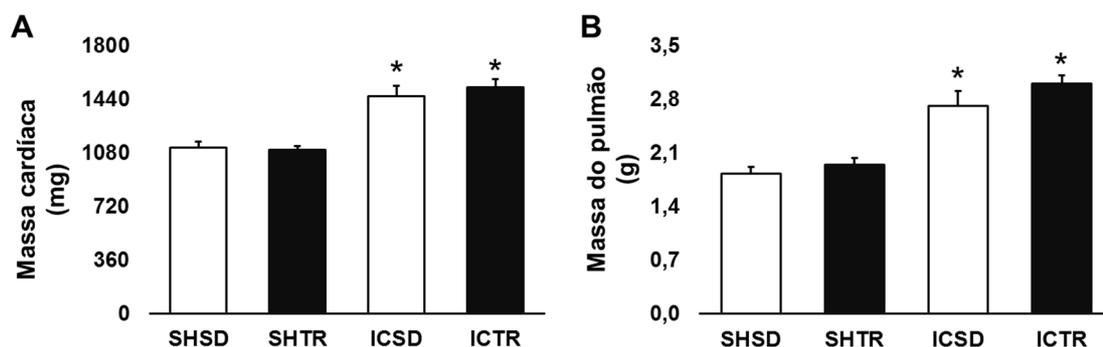
O treinamento físico aumentou significativamente a distância percorrida e o trabalho até a exaustão em ambos os grupos treinados. O aumento estatístico do consumo máximo de oxigênio ocorreu apenas nos grupo SHTR (Figura 4).



**Figura 4.** Função Ventricular e Capacidade Funcional. Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (A), distância percorrida (B), trabalho até a exaustão (C) e consumo máximo de oxigênio (D) em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários. (n=9 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD; † p<0,05 vs. ICSD.

#### 4.2.2. Massa tecidual

A IC provocou aumento da massa cardíaca e pulmonar (vs. SHSD,  $p \leq 0,001$ , Figura 5). O treinamento físico não alterou esses parâmetros. Em relação ao teor de água do pulmão, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SHSD, SHTR, ICSD, ICTR ( $76,99 \pm 2,58$ ,  $77,21 \pm 2,95$ ,  $78,17 \pm 7,19$ ,  $78,49 \pm 2,12\%$ , respectivamente).



**Figura 5.** Massa cardíaca (A) e massa do pulmão (B) em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários. (n=10 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD.

A massa dos átrios e do ventrículo direito foram significativamente maiores nos animais com IC que nos animais Sham (Tabela 4,  $p \leq 0,001$ ). O treinamento físico não modificou estes parâmetros.

Em relação aos músculos esqueléticos, não se observaram diferenças significativas entre os animais saudáveis e com IC. O treinamento físico não modificou a massa dos músculos sóleo e plantar nem nos animais saudáveis nem nos animais com IC.

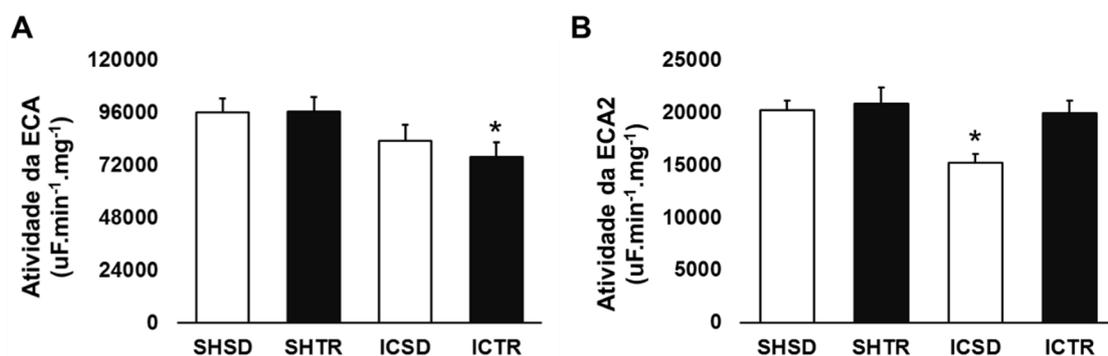
**Tabela 4.** Massa tecidual das câmaras cardíacas e dos músculos sóleo e plantar em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários.

	SHSD	SHTR	ICSD	ICTR
Átrios, mg	67,34±4,57	67,52±4,01	140,39±16,60*	154,63±12,96*
VD, mg	226,07±8,36	226,12±9,90	423,49±51,60*	431,08±17,59*
VE, mg	825,97±27,39	808,40±19,06	899,23±33,18	937,98±43,71
Sóleo, mg	153,11±5,38	164,69±4,47	153,53±7,93	161,58±8,13
Plantar, mg	407,02±11,62	395,67±18,11	400,02±17,22	373,74±23,35

Ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE). (n=10 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD.

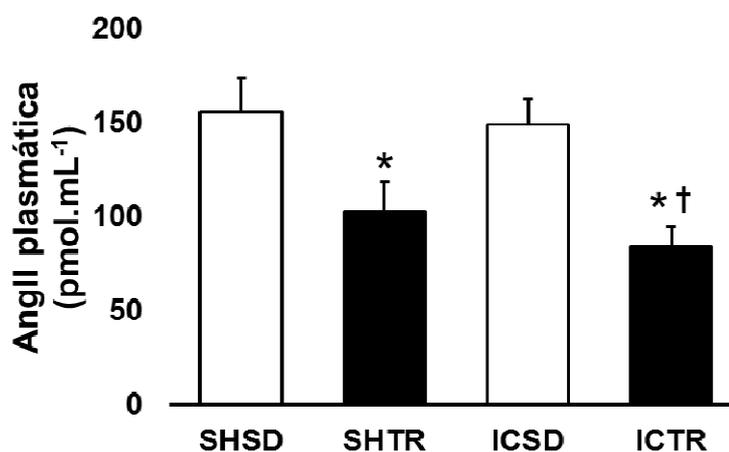
#### **4.2.3. Sistema Renina-Angiotensina Sistêmico**

Na Figura 6, é mostrada a atividade sérica das enzimas ECA (A) e ECA2 (B). A IC não alterou a atividade da ECA. Entretanto, a IC diminuiu a atividade da ECA2 em 25% (p=0,04). O treinamento reduziu significativamente a atividade da ECA no grupo ICTR (p=0,05), e restaurou a atividade da ECA2 para os níveis verificados nos animais saudáveis.



**Figura 6.** Atividade sérica das enzimas ECA (A) e ECA2 (B) em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários. (n=7 a 11 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD.

Em relação às angiotensinas plasmáticas, não houve diferença na concentração de AngII no grupo ICSD e no SHDS (p=0,74, Figura 7).



**Figura 7.** Concentração plasmática de Angiotensina II em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários. (n=10 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD; † p<0,05 vs. ICSD.

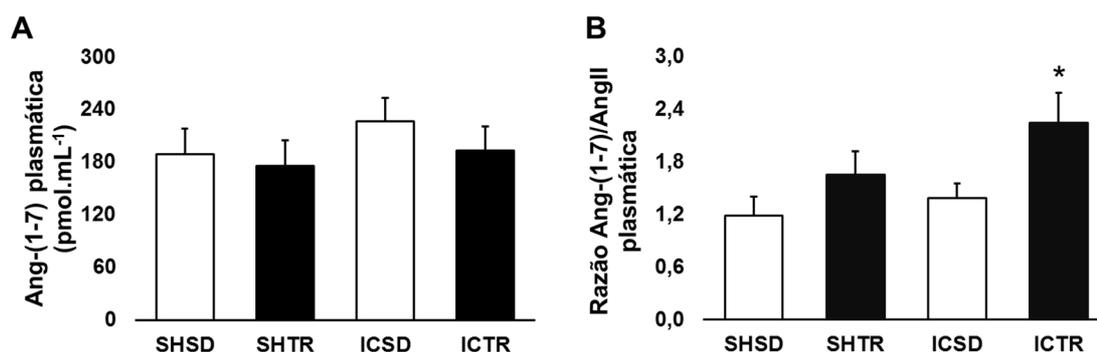
O treinamento físico reduziu substancialmente as concentrações desse peptídeo no grupo SHTR (33%,  $p=0,03$ ) e ICTR (43%,  $p=0,007$ ) em relação aos seus congêneres sedentários (Figura 7). Quanto aos níveis de AngI, não foram observadas diferenças significativas entre os quatro grupos estudados. Resultados semelhantes foram verificados na razão AngII/AngI (Tabela 5). Não foram observadas diferenças na razão AngII/AngI entre os quatro grupos estudados.

**Tabela 5.** Angiotensina I e razão AngII/AngI no plasma em animais saudáveis e com insuficiência cardíaca sedentários e treinados.

	SHSD	SHTR	ICSD	ICTR
AngI, pmol.mL <sup>-1</sup>	89,80±10,83	83,52±7,79	102,03±11,92	71,75±11,50
Razão AngII/AngI	1,85±0,20	1,38±0,27	1,73±0,28	1,34±0,17

Angiotensina I (AngI), Angiotensina II (AngII). (n=10 a 12 por grupo).

Os níveis de Ang-(1-7) entre os quatro grupos estudados são mostrados na Figura 8. A IC não alterou esses níveis. O treinamento físico não modificou significativamente os níveis de Ang-(1-7) nos animais saudáveis e com IC. Analisando a razão Ang-(1-7)/AngII, verificou-se que o treinamento físico causou um aumento significativo nessa razão nos animais com insuficiência cardíaca (Figura 8B).



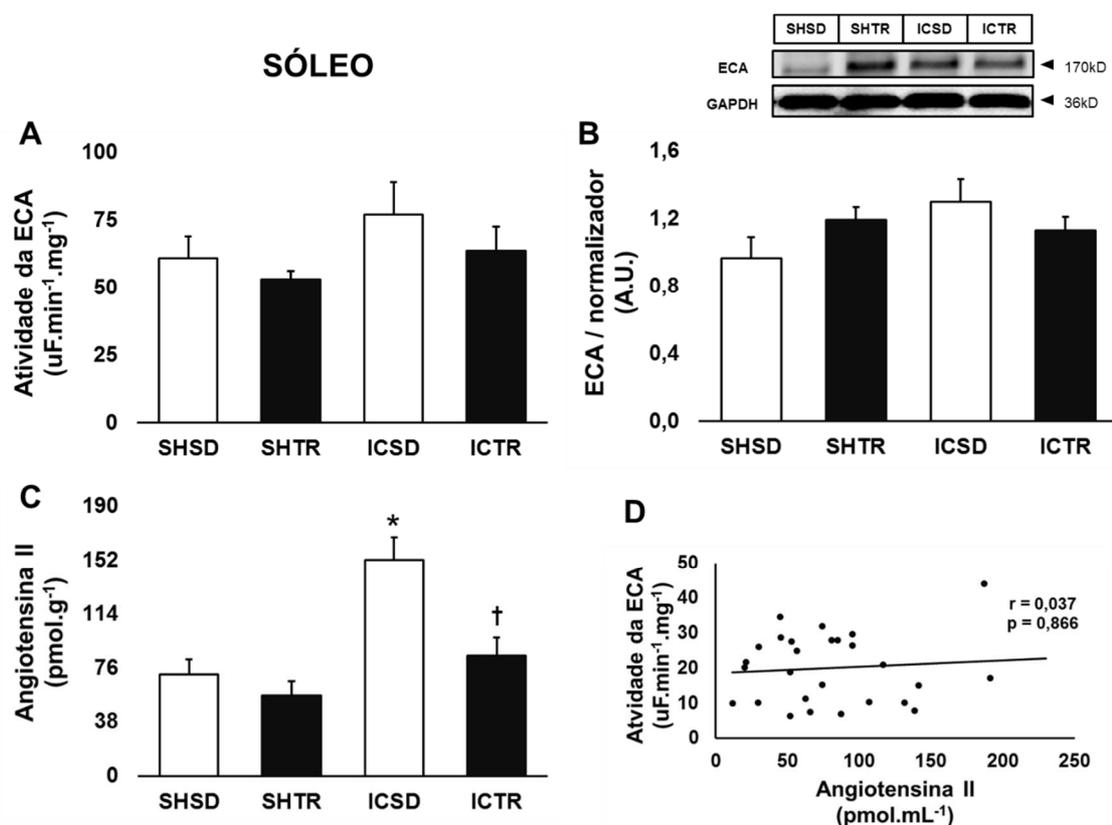
**Figura 8.** Concentração plasmática de Angiotensina (1-7) (A) e Razão Angiotensina (1-7)/Angiotensina II em ratos com insuficiência cardíaca treinados e sedentários e ratos saudáveis treinados e sedentários. (n=10 a 12 por grupo). \* p<0,05 vs. SHSD.

#### 4.2.4. Sistema Renina-Angiotensina Tecidual

A seguir, serão apresentados os resultados referentes ao SRA da musculatura esquelética, isto é, do músculo sóleo e do músculo plantar.

##### 4.2.4.1. Músculo Sóleo

A Figura 9 mostra os resultados referentes ao eixo ECA-AngII. Como podemos observar, a IC não modificou a atividade nem a expressão proteica da ECA, embora os níveis locais de AngII estivessem aumentados em relação aos animais saudáveis (p<0,001 vs. SHSD). O treinamento físico também não alterou a atividade nem a expressão proteica da ECA, mas reduziu as concentrações de AngII para níveis de normalidade (p=0,007 vs. ICSD). Análises adicionais não mostraram correlação entre os níveis de AngII e a atividade da ECA.



**Figura 9.** Atividade (A) e Expressão Proteica (B) de ECA, concentração de Angiotensina II (C) e correlação entre a atividade da ECA e os níveis de AngII (D,  $n=28$ ) no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). ( $n=7$  a  $12$  por grupo). \* $p<0,05$  vs. SHSD; † $p<0,05$  vs. ICSD.

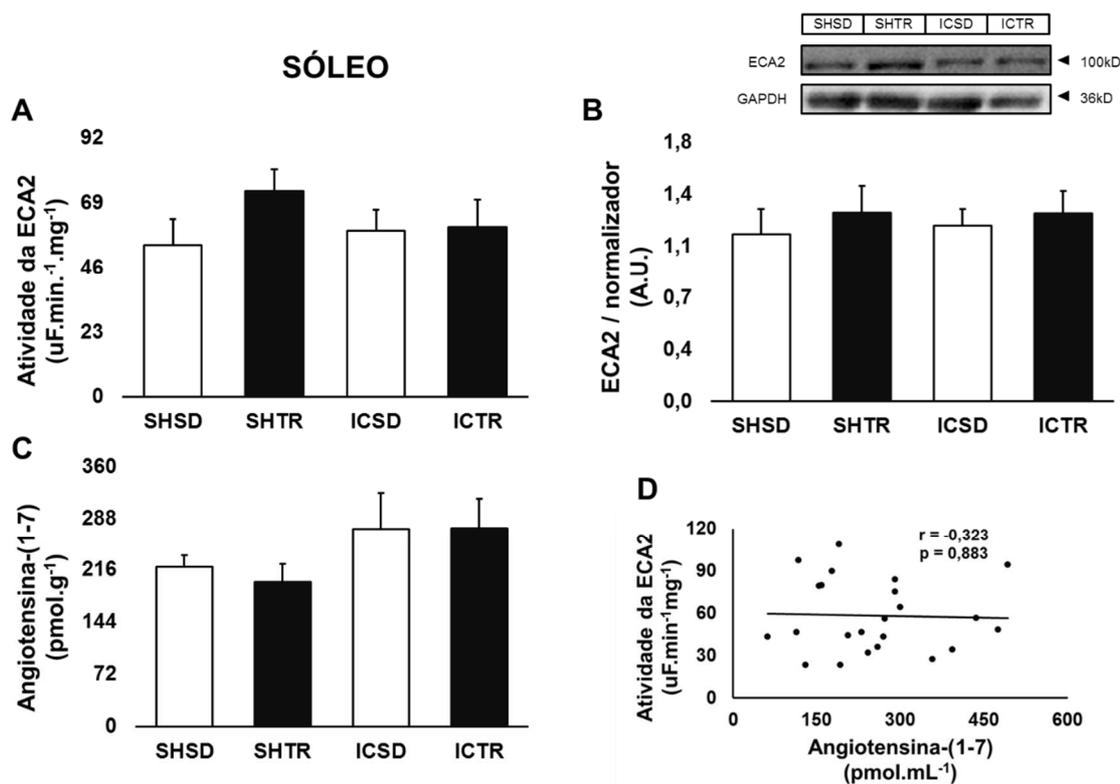
Não foram encontrados níveis estatisticamente diferentes de AngI entre os grupos estudados (Tabela 6). Entretanto, a razão AngI/AngII foi menor que o ICSD ( $p=0,014$ ) e apresentou tendência de ser menor que o SHSD ( $p=0,061$ ).

**Tabela 6.** Angiotensina I e razão AngII/AngI no músculo sóleo em animais saudáveis e com insuficiência cardíaca sedentários e treinados.

	<b>SHSD</b>	<b>SHTR</b>	<b>ICSD</b>	<b>ICTR</b>
AngI, pmol.g <sup>-1</sup>	31,03±5,78	28,50±2,97	43,61±6,28	46,47±8,84
Razão AngII/AngI	2,71±0,43	2,01±0,32	3,41±0,44	1,19±0,10 <sup>†</sup>

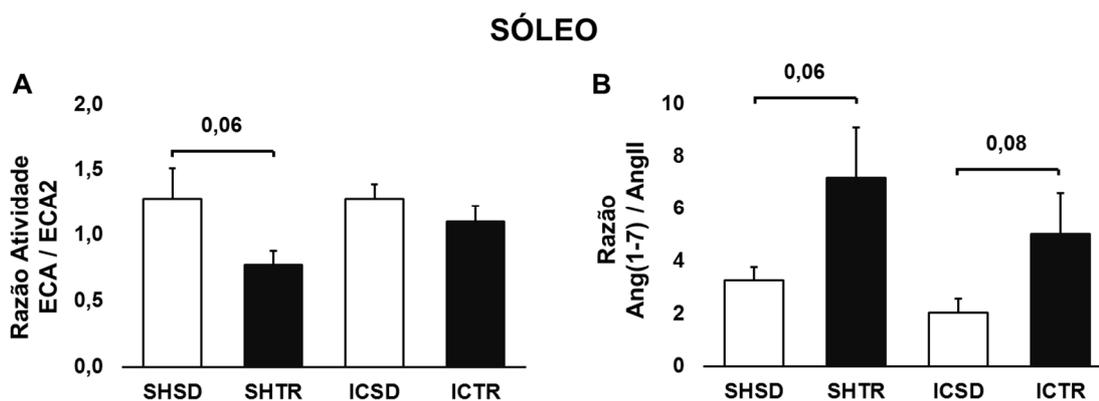
Angiotensina I (AngI), Angiotensina II (AngII). (n=7 a 12 por grupo). <sup>†</sup> P < 0,05 vs. ICSD.

Em relação ao eixo ECA2-Ang-(1-7), não houve modificação na atividade ou na expressão proteica da ECA2 nos grupos estudados (Figura 10, A e B, respectivamente). As concentrações locais de Ang-(1-7) (Figura 10C) também não foram estatisticamente diferentes, apesar de forte tendência de aumento nos grupos com IC em relação aos grupos saudáveis (p=0,06). Análises adicionais não mostraram correlação entre a atividade da ECA2 e a concentração de Ang-(1-7) (Figura 10D).



**Figura 10.** Atividade (A) e Expressão Proteica (B) de ECA2, concentração de Angiotensina-(1-7) (C) e correlação entre a atividade da ECA2 e os níveis de Angiotensina-(1-7) (D, n=23) no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 12 por grupo).

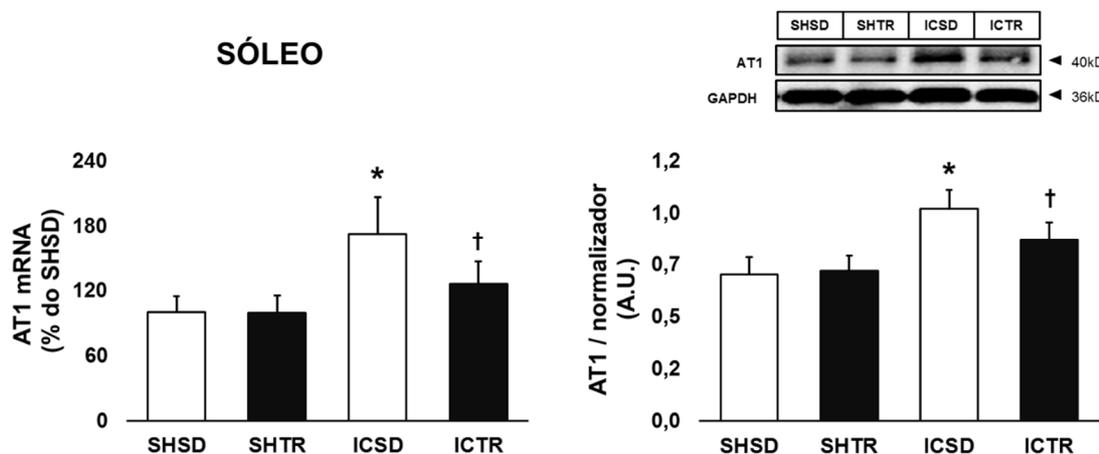
Outras análises do balanço entre os eixos ECA-AngII e ECA2-Ang-(1-7) são apresentadas na Figura 11. Como pode ser observado, a IC não modificou o balanço entre a atividade da ECA e da ECA2 (Figura 11A), nem a razão Ang-(1-7)/AngII. Em relação ao treinamento físico, observa-se forte tendência de redução da relação entre ECA/ECA2 no grupo SHTR e uma aumento da razão Ang-(1-7)/AngII nos grupos treinados quando comparados com o seus congêneres sedentários.



**Figura 11.** Razão entre a atividade da ECA e da ECA2 (A) e razão entre a Angiotensina-(1-7)/Angiotensina II (B) no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 11 por grupo).

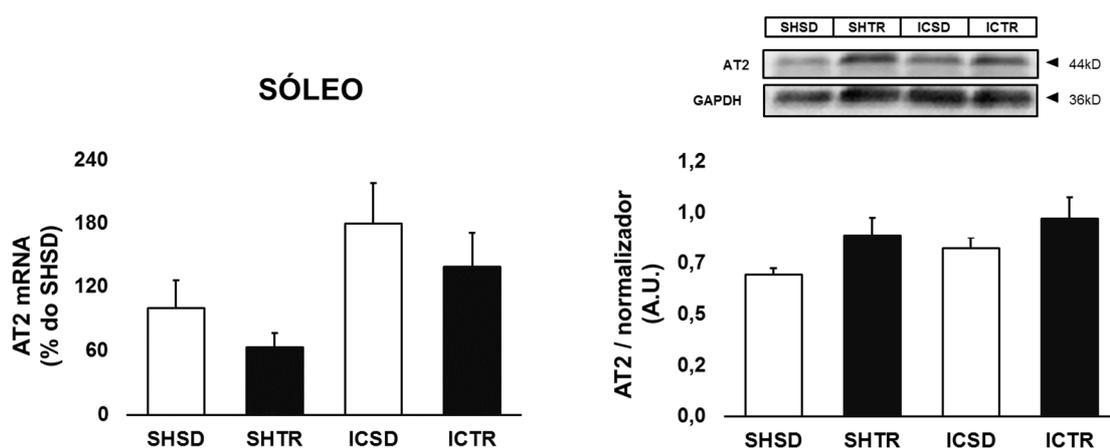
Apronfundando mais os eixos de ativação do SRA, apresenta-se a seguir o nível de expressão dos principais receptores de angiotensina II (AT1 e AT2).

Na Figura 12, pode-se verificar um aumento expressivo tanto da expressão gênica quanto proteica do receptor AT1 no músculo sóleo de animais com IC ( $p=0,04$  vs. SHSD). O treinamento físico restaurou a expressão gênica e de proteína desse receptor nos animais com IC.



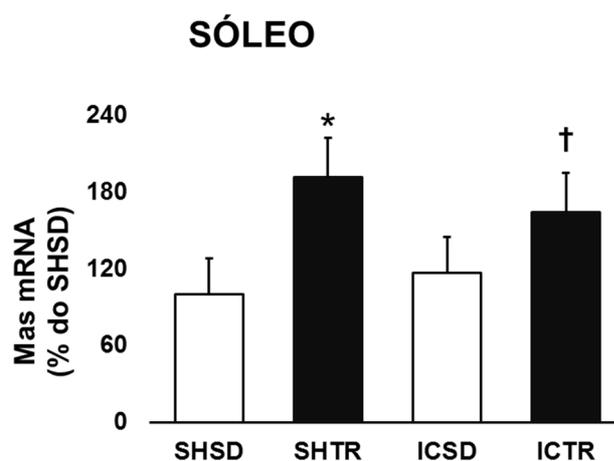
**Figura 12.** Expressão gênica (A) e proteica (B) do receptor AT1 no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD; †p<0,05 vs. ICSD.

Em relação ao receptor AT2, a IC tendeu a aumentar os níveis de expressão gênica elevados desse receptor (Figura 13A). Entretanto, também não foram encontradas diferenças estatísticas em relação à expressão proteica desse receptor (Figura 13B).



**Figura 13.** Expressão gênica (A) e proteica (B) do receptor AT2 no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=6 a 12 por grupo).

Finalmente, observa-se na Figura 14 a expressão gênica do receptor Mas, descrito como ligante e principal responsável por desencadear as ações da Ang-(1-7). A IC não provocou alterações significativas nesse receptor. Entretanto, o treinamento físico aumentou significativamente a expressão gênica desse receptor em relação aos seus congêneres sedentários ( $p=0,02$ ).

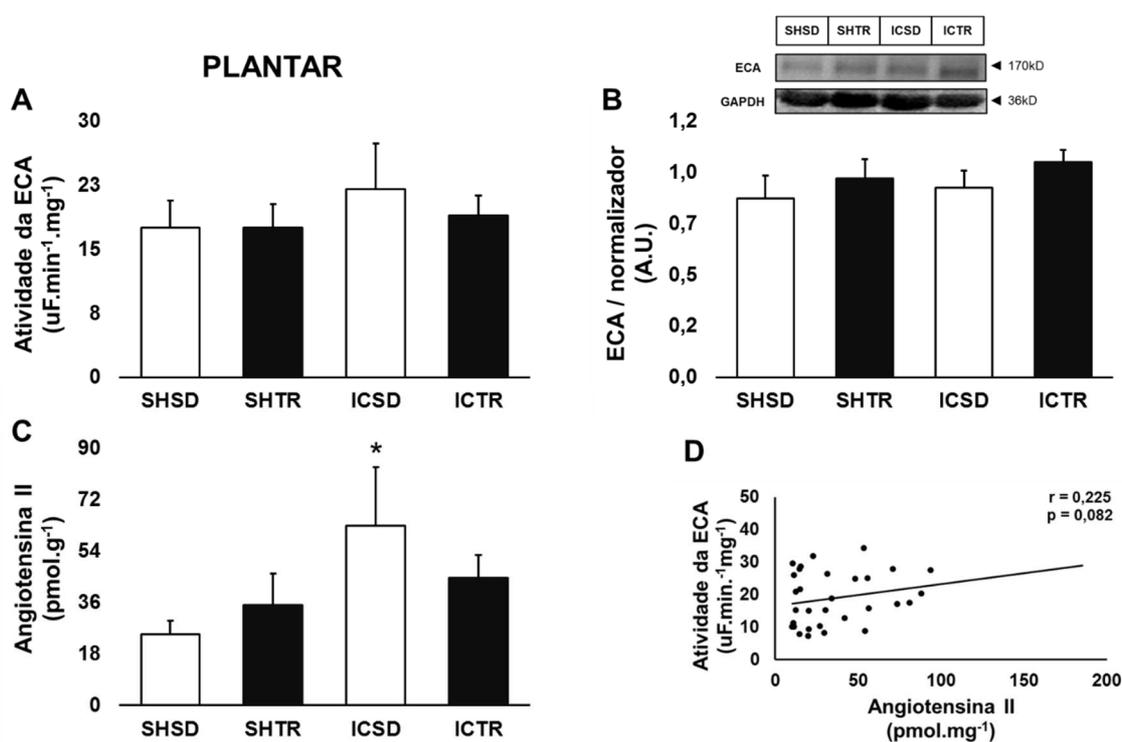


**Figura 14.** Expressão gênica do receptor Mas no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=8 a 10 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD; †p<0,05 vs. ICSD.

#### 4.2.4.2. *Músculo Plantar*

Em seguida, serão apresentados os dados referentes ao músculo plantar.

Conforme observado na Figura 15, não houve alteração na atividade ou expressão proteica da ECA. A IC aumentou significativamente os níveis de AngII no músculo plantar (Figura 15; p=0,026). Não se observou correlação entre os níveis de Angiotensina II e a atividade da ECA. O treinamento físico restaurou os níveis de AngII.



**Figura 15.** Atividade (A) e expressão proteica (B) da ECA, concentração de AngII (C) e correlação entre a atividade da ECA e a concentração de Angiotensina II (D, n=30) no músculo plantar de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD.

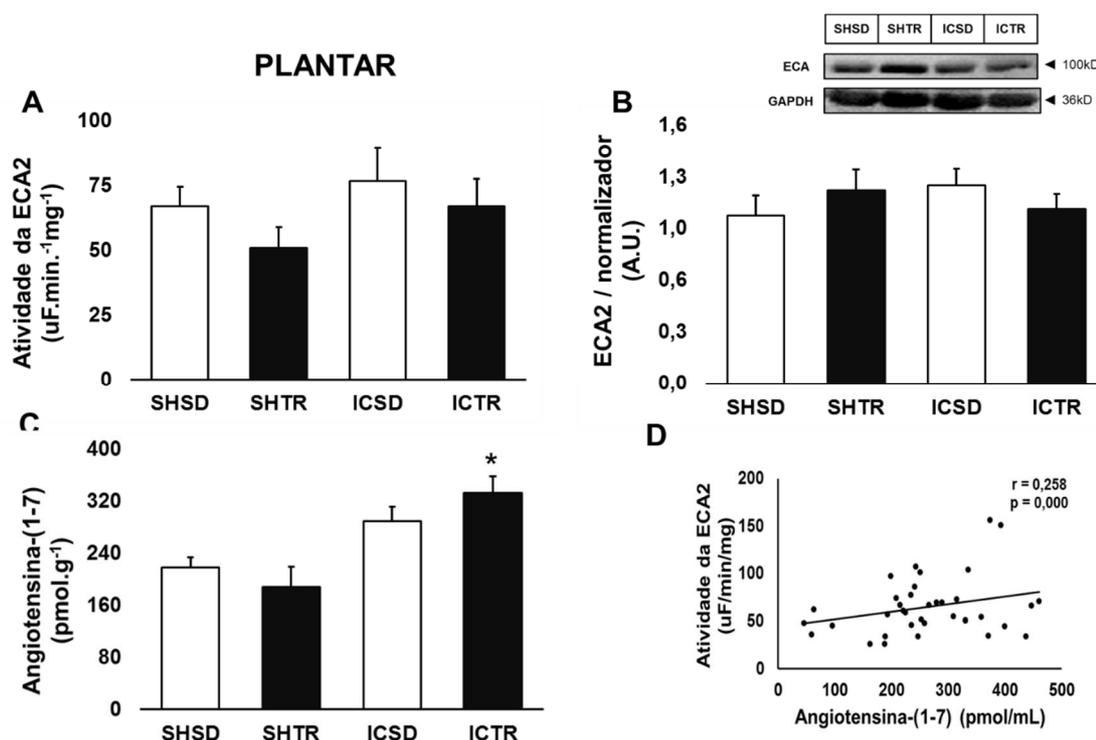
A Tabela 7 apresenta os dados de AngI e a razão AngII/AngI. Os níveis absolutos de AngI foram significativamente aumentados nos animais com IC (p=0,035), e normalizados com o treinamento físico. Não foram encontradas diferenças estatísticas na razão AngII/AngI entre os grupos no músculo plantar.

**Tabela 7.** Angiotensina I e razão AngII/AngI no músculo plantar em animais saudáveis e com insuficiência cardíaca sedentários e treinados.

	SHSD	SHTR	ICSD	ICTR
AngI, pmol.mL <sup>-1</sup>	38,81±6,92	29,37±7,65	67,71±14,91*	33,99±3,58†
Razão AngII/AngI	0,71±0,22	0,37±0,14	0,63±0,10	1,01±0,30

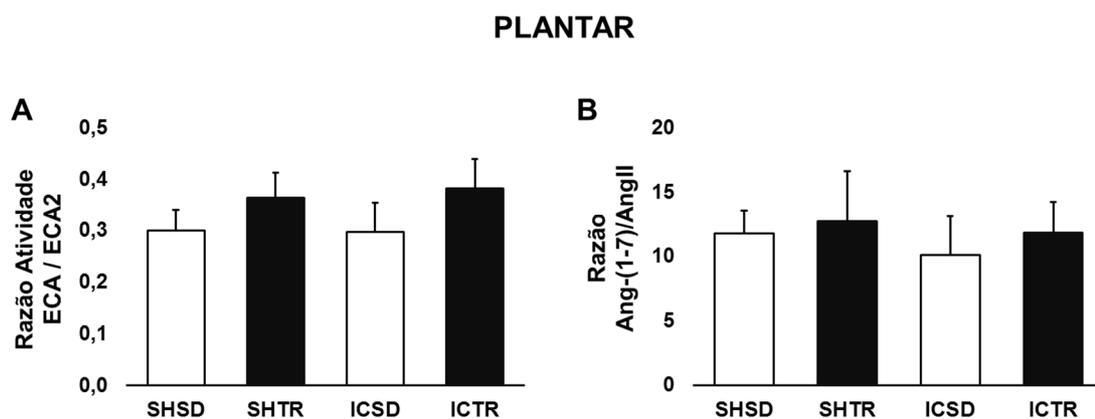
Angiotensina I (AngI), Angiotensina II (AngII). (n=8 a 12 por grupo). \*p<0,05 vs. SHSD; †p<0,05 vs. ICSD.

Em relação ao eixo ECA2-Ang-(1-7) (Figura 16), nem a IC nem o treinamento físico alteraram a atividade e a expressão proteica da ECA2. A IC não alterou os níveis de Ang-(1-7), mas o treinamento físico aumentou significativamente os níveis de Ang-(1-7) treinados com IC. Não foi encontrada correlação entre a atividade da ECA2 e a concentração de Ang-(1-7) (Figura 16D).



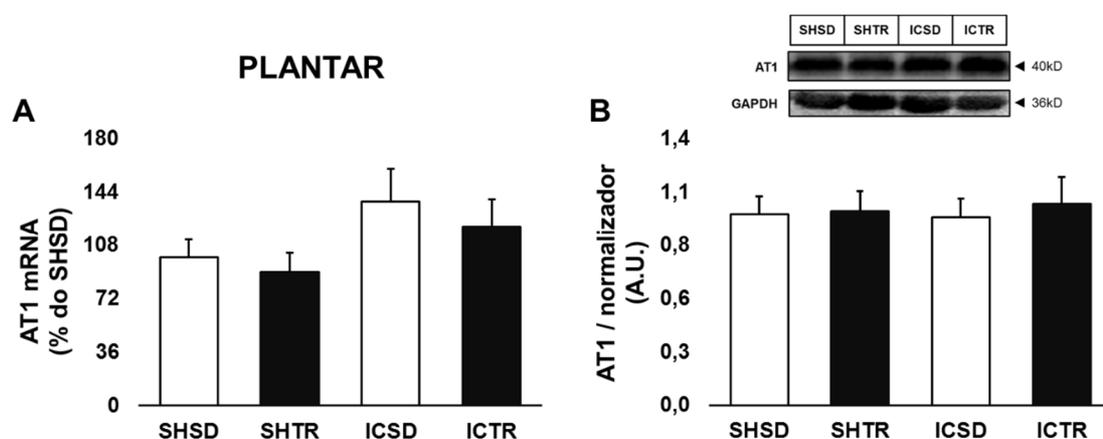
**Figura 16.** Atividade (A) e expressão proteica (B) da ECA2, concentração de Angiotensina-(1-7) (C) e correlação entre a atividade da ECA2 e a concentração de Angiotensina-(1-7) (D, n=35) no músculo plantar de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 12 por grupo) \*p<0,05 vs. SHSD.

O balanço entre os eixos ECA/ECA2 e Ang-(1-7)/AngII no músculo plantar, não foram influenciados pela IC nem pelo treinamento físico (Figura 17).



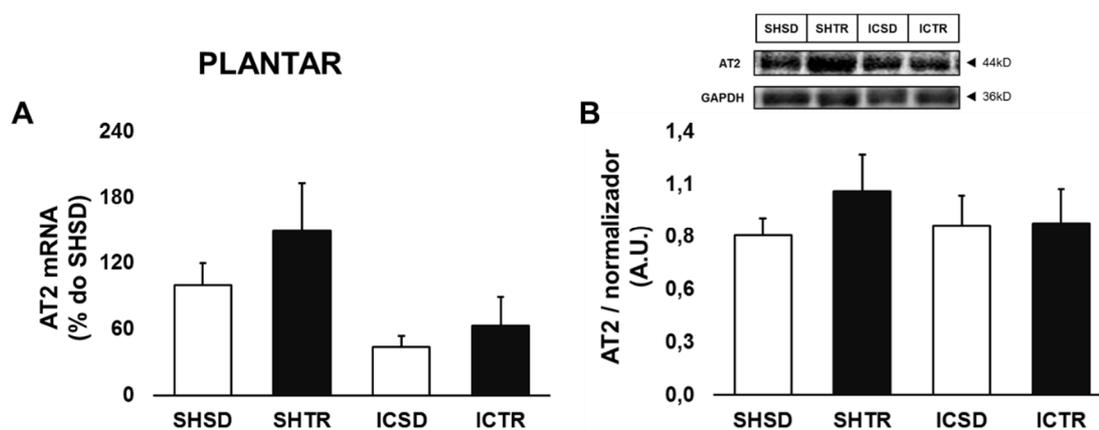
**Figura 17.** Razão entre a atividade da ECA e da ECA2 (A) e razão entre a Angiotensina-(1-7)/ Angiotensina II (B) no músculo plantar de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=7 a 12 por grupo).

A IC provocou forte tendência de aumento na expressão gênica dos receptores AT1 do músculo plantar ( $p=0,054$ ) (Figura 18A). Não foi observada diferença estatística entre os grupos na expressão proteica do receptor (B).



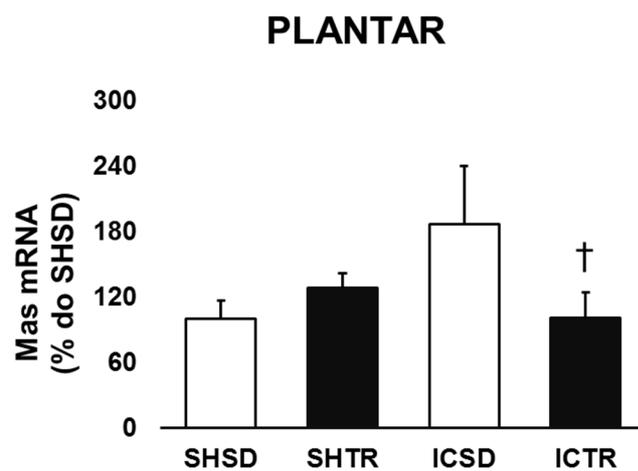
**Figura 18.** Expressão gênica (A) e proteica (B) do receptor AT1 no músculo plantar de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=6 a 11 por grupo).

Em relação ao outro ligante da AngII, o receptor AT2, nem a IC nem o treinamento físico provocaram alterações na expressão gênica ou proteica desse receptor (Figura 19).



**Figura 19.** Expressão gênica (A) e proteica (B) do receptor AT2 no músculo plantar de ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). (n=6 a 11 por grupo).

Quanto ao receptor Mas, o treinamento físico diminuiu os níveis de expressão gênica desse receptor na IC (Figura 20,  $p=0,014$ ).



**Figura 20.** Expressão gênica do receptor Mas no músculo plantar de em ratos com insuficiência cardíaca sedentários (ICSD) e treinados (ICTR) e ratos saudáveis sedentários (SHSD) e treinados (SHTR). † $p < 0,05$  vs. ICSD. (n=6 a 8 por grupo).

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são que o modelo isquêmico de IC em ratos provoca: 1) Diminuição na atividade sérica de ECA2; 2) Aumento nos níveis de AngII nos músculos sóleo e plantar, mas não na circulação; 3) Aumenta a expressão gênica e proteica do receptor AT1 no músculo sóleo, mas não no músculo plantar; 5) O treinamento físico reduz a atividade sérica da ECA e restaura a atividade da ECA2; 6) O treinamento físico reduz na circulação e normaliza nos músculos sóleo e plantar os níveis de AngII; 7) O treinamento físico aumenta a razão AngII/Ang-(1-7) na circulação e músculo sóleo e 8) O treinamento físico aumenta a expressão gênica do receptor Mas no músculo sóleo.

### 5.1. Caracterização morfofuncional do modelo de insuficiência cardíaca Crônica e o efeito do treinamento físico

A etiologia de IC mais frequente no Brasil e no mundo é a de origem isquêmica. Ela é responsável por mais de 60% dos casos de IC<sup>98,99</sup>. Na década de 1950 foi estabelecido um modelo de infarto do miocárdio em pequenos animais<sup>91</sup> que tem sido utilizado até os dias atuais como um modelo experimental de IC<sup>100</sup>.

A IC não é uma doença, mas uma síndrome multifatorial, sem sintomas patognomônicos, fazendo com que a IC seja diagnosticada através de critérios clínicos. Na suspeita de etiologia isquêmica, a recomendação

para humanos é verificar a presença de disfunção segmentar cardíaca<sup>99</sup>. Usando estes conhecimentos de humanos, 4 semanas após o indução do infarto, os animais do presente estudo foram submetidos a análise ecocardiográfica, onde constatamos uma redução significativa na função ventricular esquerda, com fração de encurtamento reduzida para valor médio de 11,97%, quando o valor em animais saudáveis é de 46%. Foi também observada uma disfunção diastólica, evidenciada pelo maior tempo de relaxamento isovolumétrico. A análise morfológica indicou uma dilatação das câmaras cardíacas, verificadas pelo aumento do diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, e do estreitamento da parede posterior.

O impacto da IC foi também observado na capacidade funcional. Nós verificamos que os animais com IC apresentavam redução na distância percorrida, no trabalho até a exaustão e no consumo máximo de oxigênio, corroborando resultados de outros estudos<sup>95,101</sup>.

Após 8 semanas de tratamento experimental, com os animais alocados em grupo sedentário e grupo treinado, com e sem IC, verificamos que o treinamento físico não alterou a função cardíaca, diferentemente dos resultados encontrados em outros estudos<sup>102-105</sup>. Esta controvérsia pode ser devida ao modelo de IC empregado no presente estudo. Em modelos de miocardiopatias não isquêmicas, como o genético e o farmacológico<sup>42,103-105</sup>, embora os cardiomiócitos estejam alterados pela síndrome, o tecido cardíaco está preservado. Neste caso, o exercício físico provoca melhora nas vias relacionadas ao remodelamento descompensado e ao maquinário contrátil<sup>104,105</sup>. Um cenário bem diferente ocorre no modelo de infarto, em

que grande parte da área necrótica do tecido miocárdico, causada pela falta de irrigação, é completamente substituída por tecido conectivo<sup>106</sup>, formando um tecido cicatrizado não contrátil, com menos cardiomiócitos para serem regenerados. Há de se considerar também que a função sistólica dos animais com IC do presente estudo é expressivamente menor que a de outros estudos de IC por infarto<sup>82,102</sup>, o que sugere que os nossos animais possuíam uma função sistólica mais grave que a de outros estudos. Este argumento parece plausível na medida em que em um estudo cujos animais com IC apresentaram fração de encurtamento semelhante à do nosso, o treinamento físico não provocou melhora na função cardíaca<sup>107</sup>. Ademais, uma recente meta-análise mostrou que os efeitos do treinamento físico sobre a função sistólica de repouso em pacientes com IC e fração de ejeção reduzida não são conclusivos<sup>108</sup>.

A eficácia do treinamento físico no nosso estudo pode ser confirmada pela melhora na capacidade funcional. Isto é, o treinamento físico aumentou o trabalho até a exaustão e a distância total percorrida em ambos, os grupos treinados saudáveis e doentes com IC<sup>109–111</sup>.

## **5.2. Sistema Renina-Angiotensina Circulante**

A cascata bioquímica clássica do SRA na circulação envolve a clivagem do angiotensinogênio em AngI e a formação de AngII dependente da ação sistêmica da ECA. Embora o bloqueio da ECA circulante seja uma das principais condutas farmacológicas na IC<sup>40</sup>, ela pode não ser suficiente

para controlar a exacerbação neuro-humoral na IC estável crônica<sup>112,113</sup>. Por outro lado, sabe-se que o treinamento físico pode exercer um papel muito importante na ECA<sup>82</sup>, o que confere a esta conduta não farmacológica uma estratégia muito atraente no tratamento da IC. O nosso estudo confirma estes resultados. O treinamento físico diminuiu a atividade sérica da ECA em animais com IC.

Evidências recentes mostram que a atividade da ECA2 está aumentada logo após o infarto<sup>112-114</sup>. Em humanos, a magnitude de aumento até uma semana após o infarto está associada à diminuição da função sistólica e à extensão do infarto, predizendo o remodelamento associado à disfunção e ao desenvolvimento de IC<sup>114</sup>. Uma vez estabelecida a IC, a atividade sérica da ECA2 continua elevada e se correlaciona positivamente com a severidade da síndrome, aumentando progressivamente de acordo com o agravamento da classe funcional<sup>115</sup>. A ECA2 é uma proteína integral de membrana e a sua forma solúvel existe por ação de proteínas com propriedades desintegrinas. Uma possível responsável pela solubilização da ECA2 é a protease ADAM17<sup>116</sup>. A expressão da ADAM17 está aumentada no coração de indivíduos com cardiomiopatia dilatada<sup>117</sup>, e considerando que ela é ativada pela citocina TNF- $\alpha$ , cujos níveis circulantes também aumentam com a severidade da IC<sup>118</sup>, é possível especular um possível efeito compensatório do aumento da atividade da ECA2 em pacientes com IC. Entretanto, a atividade da ECA2 em animais infartados é o oposto do que se observa em humanos. A atividade da ECA2 sistêmica apresenta clara redução após 8 semanas<sup>112</sup>. Os nossos achados corroboram

estes resultados anteriores. Nós verificamos uma redução de aproximadamente 25% na atividade da ECA2 nos animais ICSD 12 semanas após o infarto. Essa diferença entre os achados em humanos e animais de experimentação pode ser explicada pela ação farmacológica que não foi usada nos estudos experimentais. Há evidências de que a administração de Enalapril em animais infartados restaura a atividade da ECA2<sup>112</sup>.

Em nosso estudo, o treinamento físico reduziu a atividade sérica da ECA nos animais IC e normalizou a atividade da ECA2. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos do treinamento físico fogem ao escopo desse estudo, mas é legítimo inferir que essa conduta não farmacológica mimetiza os efeitos medicamentosos convencionais no tratamento da IC.

Outro resultado importante do presente estudo foi em relação à redução em mais de 30% nos níveis circulantes de AngII após o treinamento físico, tanto em animais com IC como em animais saudáveis. Estes nossos achados confirmam outros estudos que mostraram que o treinamento físico reduz ou preveni o aumento plasmático de AngII<sup>81,82,119</sup>. Esta redução nas concentrações plasmáticas de AngII provocou um aumento a razão Ang(1-7)/AngII, o que pode ser entendido como um efeito benéfico do exercício no balanço do SRA na IC.

### **5.3. Sistema Renina-Angiotensina Muscular Esquelético**

O sistema muscular esquelético é composto por fibras com diferentes características metabólicas. No presente estudo, o músculo sóleo representa

o de característica oxidativa, enquanto o músculo plantar o de característica glicolítica. A seguir, nós descreveremos os principais componentes do SRA no músculo sóleo e no músculo plantar.

Há evidências de que a ECA é expressa no músculo esquelético de humanos, animais de experimentação e linhagens celulares de músculo esquelético<sup>97,120,121</sup>. Sabe-se também que a atividade muscular esquelética da ECA não se correlaciona com a atividade sérica da ECA<sup>121</sup>. Recentemente, o nosso grupo caracterizou a expressão proteica e a atividade da ECA2 no músculo esquelético de ratos<sup>97</sup>. O objetivo desse nosso estudo foi investigar essas enzimas na musculatura esquelética de um modelo crônico de IC isquêmica e, sobretudo, verificar se o treinamento físico influencia a atividade dessas enzimas na musculatura nesse modelo. Para nossa surpresa, nem a expressão proteica nem a atividade enzimática da ECA e da ECA2 estavam alteradas na IC. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Schaufelberger e colaboradores em humanos, que não encontraram diferenças na expressão gênica da ECA no músculo de pacientes com IC e indivíduos saudáveis<sup>122</sup>. O treinamento físico também não alterou a ECA e ECA2 nos músculos sóleo e plantar de animais com IC. Não há informações sobre a influência do exercício físico nos níveis ECA muscular na IC, mas a estimulação mecânica por alongamento em células C2C12, que pode mimetizar os efeitos da contração muscular, também não mostrou alteração na expressão gênica dessa enzima<sup>123</sup>. Portanto, nem o modelo isquêmico de IC crônica nem o treinamento físico

influenciam a expressão gênica e proteica da ECA e ECA2 nos músculo sóleo e plantar.

A AngII, conhecida como principal efector do SRA, pode ser classificada como um hormônio de resposta ao estresse agudo. Quando cronicamente elevada na circulação, a AngII pode aumentar também nos tecidos<sup>124</sup>. Enquanto na circulação a meia-vida da AngII é bastante reduzida (15 a 30s, dependendo do território), na célula, onde está mais protegida da degradação de peptidases endoteliais, sua meia-vida aumenta em 30 vezes, atingindo 15 minutos<sup>49</sup>. O resultado desta cinética é a potencialização da ação local do SRA. A localização dos níveis intracelulares de AngII não está muito clara, mas técnicas de imunohistoquímica mostram que em células cardíacas neonatais a região de acúmulo citosólico depende do tipo do estímulo externo, sendo mais próxima ao núcleo em resposta a altos níveis de glicose, e de filamentos contráteis de actina em resposta simpatomimética<sup>125</sup>. Estas características provavelmente influenciam as respostas intrácrina e autócrina/parácrina diferenciadas desse hormônio.

Os nossos dados não permitem diferenciar a localização ou a forma de geração da AngII local, uma vez que a quantificação de angiotensinas foi realizada em homogenato de tecidos. Apesar dessa limitação, o nosso estudo mostra pela primeira vez que há um aumento expressivo nas concentrações de AngII nos músculos sóleo e plantar de ratos com IC. Ademais, é possível reverter esse aumento tecidual muscular de AngII com o treinamento físico, o que contribui para uma melhora da miopatia esquelética na IC, que será tratado no Capítulo 2.

Evidências recentes mostram que a ligação da AngII ao receptor AT1 e ao receptor AT2 desencadeiam respostas distintas. Enquanto o receptor AT1, responsável pela maior parte das ações do SRA, media a internalização de AngII e desencadeia respostas proliferativa, apoptótica e atrófica<sup>42,49,126</sup>, o receptor AT2, expresso no músculo esquelético<sup>127</sup>, desencadeia efeitos exatamente opostos aos do receptor AT1<sup>18</sup>. No nosso estudo, nós encontramos um aumento da expressão gênica e proteica do receptor AT1 no músculo sóleo em animais com IC. Este resultado não ocorreu no músculo plantar. Em relação ao receptor AT2, nem a expressão gênica nem a expressão de proteica desse receptor foram alterados nos músculos sóleo e plantar nos animais com IC. Os nossos dados são insuficientes para explicar o aumento da expressão gênica e proteica do receptor AT1 no músculo sóleo e, sobretudo, a sua normalização com o treinamento físico. Entretanto, esses achados abrem uma interessante perspectiva de investigação.

Conhecimentos mais recentes evidenciam que os efeitos deletérios do SRA podem ser contrabalanceados por um eixo identificado pelas ações da Ang-(1-7)<sup>128</sup>. No músculo sóleo, os níveis absolutos de Ang-(1-7) não foram influenciados pela IC ou treinamento físico, mas a razão de Ang-(1-7)/AngII aumentou significativamente nos grupos treinados. Isso quer dizer que, para a mesma quantidade de AngII, havia mais Ang-(1-7), indicando um balanço compensatório mediado pelo treinamento físico na atenuação de processos fisiopatológicos envolvendo a hiperativação do SRA.

A expressão gênica do receptor Mas no músculo sóleo seguiu o mesmo padrão da razão Ang-(1-7)/AngII. Isto é, ela foi significativamente aumentada pelo treinamento físico. Estes resultados são expressivos na medida em que a interação Ang-(1-7)-Mas gera uma ação antiapoptótica e vasodilatadora, opostas às da AngII<sup>128</sup>. Ademais, no músculo esquelético, ela provoca a fosforilação da Akt, melhorando a sensibilidade à insulina<sup>129,130</sup> e, possivelmente, contrabalanceando os efeitos negativos da AngII na regulação de massa muscular na IC.

No músculo plantar, encontramos um aumento nos níveis absolutos de Ang-(1-7) nos animais ICTR, sem alteração significativa na razão Ang-(1-7)/AngII. Por um mecanismo de *feedback* negativo, o aumento de Ang-(1-7) pode explicar a redução na expressão do receptor Mas nos animais ICTR.

#### **5.4. Limitações**

Nós reconhecemos limitações em nosso estudo. A falta de análises de cinética enzimática e da localização e do papel dos receptores extracelulares e intracelulares podem limitar as nossas interpretações sobre o balanço do SRA sistêmico e muscular esquelético nos desfechos fisiopatológicos da IC. Entretanto, a interdependência do SRA muscular, que parece modular de modo diferente as concentrações de angiotensinas de acordo com as características metabólicas do músculo e, sobretudo, a influência do treinamento físico nessa problemática, trazem novos conhecimentos sobre a função e a participação do SRA na IC.

## **5.5. Perspectivas**

Os nossos achados confirmam a hipótese inicial do estudo, de que a IC provoca alterações no balanço sistêmico e muscular esquelético do SRA que, por vezes, atuam independentemente um do outro. Esta independência do SRA na circulação e no músculo esquelético deve ser considerada para evitar extrapolações da circulação para os diferentes territórios, em especial, o músculo esquelético. O presente estudo fortalece a ideia de que o treinamento físico é uma conduta não farmacológica que deve ser utilizada no sentido de auxiliar na correção do sistema neuro-humoral na IC.

## 6. CONCLUSÕES

Em modelo isquêmico de IC crônica em ratos, há uma clara diferença entre o SRA no músculo esquelético e o SRA sistêmico. Os níveis de AngII estão aumentados no tecido muscular independentemente da característica metabólica do músculo, mas não na circulação. O treinamento físico reduz os níveis plasmáticos de AngII e normaliza os níveis desse peptídeo nos músculos sóleo e plantar. Essa redução é acompanhada de um aumento de Ang-(1-7) no músculo plantar, e um aumento na razão Ang-(1-7)/AngII na circulação e no músculo sóleo, indicando que o treinamento físico atenua a ativação deletéria do SRA na IC.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gibbons GH, Dzau VJ, Farhi ER, Barger AC. Interaction of signals influencing renin release. *Ann Rev Physiol.* 1984; 46:291-308.
2. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leilor LF MJ. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 1940; 98:283-98.
3. Page IH; Holman OM. A crystalline pressor substance (Angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med.* 1940; 71:29-43.
4. Braun-Menendez E, Page IH O. Suggested revision of nomenclature - Angiotensin. *Science* 1958; 80:242.
5. Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, et al. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation* 1997; 96:220-6.
6. Scott B, McGeehan G, Harrison R. Development of Inhibitors of the Aspartyl Protease Renin for the Treatment of Hypertension. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006; 7:241-54.
7. Skinner SL, Mccubbin JW, Page IH. Control of Renin Secretion. *Circ. Res.* 1964; 15:64-76.

8. Opong SY, Hooper NM. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem. J.* 1993; 292:597-603.
9. Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86:7741-5.
10. Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:13398-405.
11. Massey TH, Fessler DC O. Substrate binding properties of converting enzyme using a series of p-nitrophenylalanyl derivatives of angiotensin I. *Biochemistry.* 1976; 15:4906-12.
12. Al-Merani SA, Brooks DP, Chapman BJ, Munday KA O. The half-lives of angiotensinII, angiotensinII-amide, angiotensin III, Sar1,-Ala8-AngiotensinII and renin in the circulatory system of the rat. *J. Physiol.* 1978; 278:471-90.
13. Iwai N, Inagami T, Ohmichi N, Nakamura Y, Saeki Y, Kinoshita M. Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 188:298-303.

14. Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci. (Lond)*. 2007; 112:417-28.
15. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52:415-72.
16. Hunyady L, Catt KJ, Clark a J, Gáborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul. Pept.* 2000; 91:29-44.
17. Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11:1266-77.
18. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab a M, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:39721-6.
19. Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N. Engl. J. Med.* 1972; 286:441-9.
20. Page IH. Heart attacks: possible risk factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972; 69:1813-5.
21. McMurray JJ V, Pfeffer M a. Heart failure. *Lancet* 2005; 365:1877-89.

22. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2013; 128:1810-52.
23. Kemp CD, Conte J V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Pathol.* 2013; 21:365-71.
24. Middlekauff HR, Nguyen AH, Negrao CE, Nitzsche EU, Hoh CK, Natterson BA, et al. Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure: implications for “triggering” adverse cardiac events. *Circulation* 1997; 96:1835-42.
25. Opie LH. The neuroendocrinology of congestive heart failure. *Cardiovasc. J. S. Afr.* 2002; 13:171-8.
26. Sabbah HN. Effects of cardiac support device on reverse remodeling: molecular, biochemical, and structural mechanisms. *J. Card. Fail.* 2004; 10:S207-14.
27. Dhalla NS, Afzal N, Beamish RE, Naimark B, Takeda N, Nagano M. Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Can. J. Cardiol.* 1993; 9:873-87.

28. Franciosa JA, Park M, Levine TB. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1981; 47:33-9.
29. Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson P a, et al. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 30:1758-64.
30. Dunnigan A, Staley NA, Smith SA, Pierpont ME, Judd D, Benditt DG, et al. Cardiac and skeletal muscle abnormalities in cardiomyopathy: comparison of patients with ventricular tachycardia or congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1987; 10:608-18.
31. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85:1751-9.
32. Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA. Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27:140-5.
33. Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L, et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29:1067-73.

34. Burniston JG, Saini A, Tan L-B, Goldspink DF. Angiotensin II induces apoptosis in vivo in skeletal, as well as cardiac, muscle of the rat. *Exp. Physiol.* 2005; 90:755-61.
35. Russell ST, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. *Cell. Signal.* 2006; 18:1087-96.
36. Brink M, Wellen J, Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* 1996; 97:2509-16.
37. Kato M, Kinugawa T, Omodani H, Osaki S, Ahmmed GU, Ogino K, et al. Responses of plasma norepinephrine and renin-angiotensin-aldosterone system to dynamic exercise in patients with congestive heart failure. *J. Card. Fail.* 1996; 2:103-10.
38. Vidal B, Roig E, Pérez-villa F, Orús J, Pérez J, Jiménez V, et al. Valor pronóstico de los niveles de citocinas y neurohormonas en la insuficiencia cardíaca severa. *Rev. Esp. Cardiol.* 2002; 55:481-6.
39. Roig E, Perez-Villa F, Morales M, Jiménez W, Orús J, Heras M, et al. Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur. Heart J.* 2000; 21:53-7.
40. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study

(CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316:1429-35.

41. Anker SD, Negassa A, Coats AJS, Afzal R, Poole-Wilson P a, Cohn JN, et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 2003; 361:1077-83.

42. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini a., Rossini K, Sandri M, Thiene G, et al. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation* 2001; 103:2195-200.

43. Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield MM, Bailey JE, Sandberg SM, et al. Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension* 1996; 28:472-7.

44. Paul M, Mehr ALIP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.* 2006; 86:747-803.

45. Santos R a S, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J. Endocrinol.* 2013; 216:R1-17.

46. Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM. The intracrine renin-angiotensin system. *Clin. Sci. (Lond).* 2012; 123:273-84.

47. Batenburg WW, Krop M, Garrelds IM, de Vries R, de Bruin RJA, Burcklé CA, et al. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J. Hypertens.* 2007; 25:2441-53.
48. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, et al. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul. Pept.* 2004; 120:5-13.
49. Van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension* 1997; 30:42-9.
50. Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57:529-39.
51. Uehara Y, Miura S, Yahiro E, Saku K. Non-ACE pathway-induced angiotensin II production. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19:3054-9.
52. Kinoshita a, Urata H, Bumpus FM, Husain a. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:19192-7.

53. Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 350:1026-31.
54. Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. Angiotensin-(1-12) is an alternate substrate for angiotensin peptide production in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294:H2242-H2247.
55. Ferrario CM, Varagic J, Habibi J, Nagata S, Kato J, Chappell MC, et al. Differential regulation of angiotensin-(1-12) in plasma and cardiac tissue in response to bilateral nephrectomy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296:H1184-92.
56. Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Asami M, Kitamura K. Plasma and tissue concentrations of proangiotensin-12 in rats treated with inhibitors of the renin-angiotensin system. *Hypertens. Res.* 2012;35:234-8.
57. Ahmad S, Simmons T, Varagic J, Moniwa N, Chappell MC, Ferrario CM. Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. *PLoS One* 2011; 6:e28501.
58. Ahmad S, Wei C-C, Tallaj J, Dell'Italia LJ, Moniwa N, Varagic J, et al. Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2013; 7:128-36.
59. Dell'Italia LJ, Ferrario CM. The Never-ending Story of Angiotensin Peptides: Beyond Angiotensin I and II. *Circ. Res.* 2013; 112:1086-7.

60. Ferrario CM, Santos RA, Brosnihan KB, Block CH, Schiavone MT, Khosla MC, et al. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. *Clin. Exp. Hypertens.* 1988; 1:107-21.
61. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am. J. Physiol.* 1989; 257:H324-9.
62. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antithrombotic Effect of Captopril and Losartan Is Mediated by Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002; 40:774-9.
63. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner a J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:33238-43.
64. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 2000; 87:e1-9.
65. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:14838-43.

66. Zohn IE, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, Westwick JK, Der CJ. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18:1225-35.
67. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*; 45:711-9.
68. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100:8258-63.
69. Zheng H, Liu X, Patel KP. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression improves central nitric oxide-mediated sympathetic outflow in chronic heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2013; 301:H2402-12.
70. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292:H736-42.
71. Zhao YX, Yin HQ, Yu QT, Qiao Y, Dai HY, Zhang MX, et al. ACE2 overexpression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21:1545-54.
72. Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M, et al. Diminazene aceturate enhances Angiotensin-converting enzyme 2 activity

and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension* 2013; 62:746-52.

73. Marques D, Melo MB, Souza LE, Irigoyen MC, Sinisterra D, et al. Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in infarcted rats. *Int. J. Hypertens.* 2012; 2012: 795452.

74. Qi Y, Shenoy V, Wong F, Li H, Afzal A, Mocco J, et al. Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1-7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology. *Exp. Physiol.* 2011; 96:863-74.

75. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CAA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, et al. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292:H1113-9.

76. Savergnini SQ, Ianzer D, Carvalho MB, Ferreira AJ, Silva GAB, Marques FD, et al. The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PLoS One* 2013; 8:e57757.

77. Conraads VM, Van Craenenbroeck EM, De Maeyer C, Van Berendoncks AM, Beckers PJ, Vrints CJ. Unraveling new mechanisms of exercise intolerance in chronic heart failure: role of exercise training. *Heart Fail. Rev.* 2013; 18:65-77.

78. Negrao CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2008; 13:51-60.
79. Brum PC, Bacurau AV, Medeiros A, Ferreira JC, Vanzelli AS, Negrão CE. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011; 44:827-35.
80. Liu JL, Irvine S, Reid IA, Patel KP, Zucker IH. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: A role for angiotensin II. *Circulation* 2000; 102:1854-62.
81. Mousa TM, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J. Appl. Physiol.* 2008; 5850:616-24.
82. Wan W, Powers AS, Li J, Ji L, Erikson JM, Zhang JQ. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *Am. J. Med. Sci.* 2007; 334:265-73.
83. Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR, Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009; 105:843-50.

84. Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78:523-32.
85. Saris JJ, van Dijk M a, Kroon I, Schalekamp M a, Danser a H. Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension* 2000; 35:764-8.
86. Cabello-Verrugio C, Acuña MJ, Morales MG, Becerra A, Simon F, Brandan E. Fibrotic response induced by angiotensin-II requires NAD(P)H oxidase-induced reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 410:665-70.
87. Eley HL, Tisdale MJ. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:7087-97.
88. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011; 58:182-9.
89. Filho a. G, Ferreira a. J, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor

in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp. Physiol.* 2008; 93:589-98.

90. Kar S, Gao L, Zucker IH. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *J. Appl. Physiol.* 2010; 108:923-32.

91. JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* 1954; 140:675-82.

92. Shiota T, Jones M, Chikada M, Fleishman CE, Castellucci JB, Cotter B, et al. Real-time three-dimensional echocardiography for determining right ventricular stroke volume in an animal model of chronic right ventricular volume overload. *Circulation* 1998; 97:1897-900.

93. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1989; 2:358-67.

94. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.* 1978; 45:1009-15.

95. Rondon E, Brasileiro-Santos MS, Moreira ED, Rondon MU Mattos KC, Coelho MA, et al. Exercise training improves aortic depressor nerve

sensitivity in rats with ischemia-induced heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291:H2801-6.

96. Portes LA, Tucci PJ. Swim training attenuates myocardial remodeling and the pulmonary congestion in wistar rats with secondary heart failure to myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol.* 2006;87:54-9.

97. Fernandes T, Hashimoto NY, Oliveira EM. Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2010; 43:837-42.

98. Tavares LR, Victor H, Linhares JM, Barros CM De, Oliveira MV, Pacheco LC, et al. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca Descompensada em Niterói - Projeto EPICA. *Arq. Bras. Cardiol.* 2004; 82:121-4.

99. Bocchi EA, Braga FGM, Ferreira SMA, Rohde LEP, Oliveira WA de, Almeida DR de, et al. III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure. *Arq. Bras. Cardiol.* 2009; 93:3-70.

100. Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ. Heart Fail.* 2009; 2:138-44.

101. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LM, Oliveira S, Campos DH, Lima AR, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J. Appl. Physiol.* 2011; 111:543-51.

102. Campos JC, Queliconi BB, Dourado PM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LR, et al. Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PLoS One* 2012; 7:e52764.
103. Serra AJ, Higuchi ML, Ihara SS, Antônio EL, Santos MH, Bombig MT, et al. Exercise training prevents beta-adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions. *Eur. J. Heart Fail.* 2008; 10:534-9.
104. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics* 2007; 29:246-52.
105. Oliveira RS, Ferreira JC, Gomes ER, Paixão N, Rolim NP, Medeiros A, et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J. Physiol.* 2009; 587:3899-910.
106. Fishbein MC, McLean D, Maroko PR. The Histopathologic Evolution of Myocardial Infarction. *Chest* 1978; 73:843-9.
107. Aït Mou Y, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2009; 81:555-64.
108. Haykowsky MJ, Timmons MP, Kruger C, McNeely M, Taylor DA, Clark AM. Meta-analysis of aerobic interval training on exercise capacity and

systolic function in patients with heart failure and reduced ejection fractions.

*Am. J. Cardiol.* 2013; 111:1466-9.

109. Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JBN, Paixão N a, Campos JC, Ferreira JCB, et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One* 2012; 7:e41701.

110. Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, et al. Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302:H1202-10.

111. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2007; 14:753-60.

112. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension* 2006; 48:572-8.

113. Burchill LJ, Velkoska E, Dean RG, Griggs K, Patel SK, Burrell LM. Combination renin-angiotensin system blockade and angiotensin-converting enzyme 2 in experimental myocardial infarction: implications for future therapeutic directions. *Clin. Sci. (Lond).* 2012; 123:649-58.

114. Ortiz-Pérez JT, Riera M, Bosch X, De Caralt TM, Perea RJ, Pascual J, et al. Role of circulating angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: a prospective controlled study. *PLoS One* 2013; 8:e61695.
115. Epelman S, Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52:750-4.
116. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith a I, et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J. Biol. Chem.* 2005; 280:30113-9.
117. Fedak PWM, Moravec CS, McCarthy PM, Altamentova SM, Wong AP, Skrtic M, et al. Altered expression of disintegrin metalloproteinases and their inhibitor in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 113:238-45.
118. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27:1201-6.

119. Braith RW, Welsch M a, Feigenbaum MS, Kluess H a, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34:1170-5.
120. Mori S, Tokuyama K. Variation in ACE activity affects myogenic differentiation in C2C12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 353:369-75.
121. Reneland R, Lithell H. Angiotensin-converting enzyme in human skeletal muscle. A simple in vitro assay of activity in needle biopsy specimens. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1994; 54:105-11.
122. Schaufelberger M, Drexler H, Schieffer E, Swedberg K. Angiotensin-converting enzyme gene expression in skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *J. Card. Fail.* 1998; 4:185-91.
123. Johnston APW, Baker J, De Lisio M, Parise G. Skeletal muscle myoblasts possess a stretch-responsive local angiotensin signalling system. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst.* 2011;12:75-84.
124. Yang G, Xi ZX, Wan Y, Wang H, Bi G. Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biol. Signals* 1993; 2:166-72.
125. Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293:H939-48.

126. Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013; 45:2322-32.
127. Linderman JR, Greene AS. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. *Microcirculation* 2001; 8: 275-81.
128. Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RAS. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci. (Lond)*. 2013; 124:443-56.
129. Prasannarong M, Santos FR, Henriksen EJ. Ang-(1-7) reduces AngII-induced insulin resistance by enhancing Akt phosphorylation via a Mas receptor-dependent mechanism in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 426:369-73.
130. Muñoz MC, Giani JF, Burghi V, Mayer M a, Carranza A, Taira C a, et al. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). *Regul. Pept.* 2012; 177:1-11.

**Modulação da angiotensina II na melhora  
da miopatia esquelética provocada pelo  
treinamento físico na insuficiência  
cardíaca crônica**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Insuficiência Cardíaca e Miopatia Esquelética

A diminuição da ejeção cardíaca inerente à insuficiência cardíaca (IC) levou ao conceito de que a intolerância aos esforços nessa síndrome era devida ao baixo débito cardíaco. Entretanto, estudos posteriores mostraram que não há correlação entre a função ventricular esquerda e a capacidade de realizar esforço em pacientes com IC<sup>1</sup>, tão pouco melhora na capacidade funcional após o uso de inotrópicos ou de transplante cardíaco<sup>2,3</sup>.

Esses resultados levaram alguns investigadores a voltarem à atenção para o caráter sistêmico da síndrome e às possíveis repercussões periféricas, especialmente na estrutura e função da musculatura esquelética<sup>4,5</sup>, dando origem à hipótese de *miopatia muscular* da IC<sup>6</sup>. Isto é, foi possível identificar que pacientes com IC apresentam desde alterações no arranjo macroscópico, com perda de massa muscular<sup>4</sup>, até mudanças no perfil histológico<sup>5</sup> e ultraestrutural<sup>7,8</sup>, como mudanças do perfil metabólico e das fibras oxidativas do tipo I para fibras glicolíticas do tipo II<sup>9</sup>.

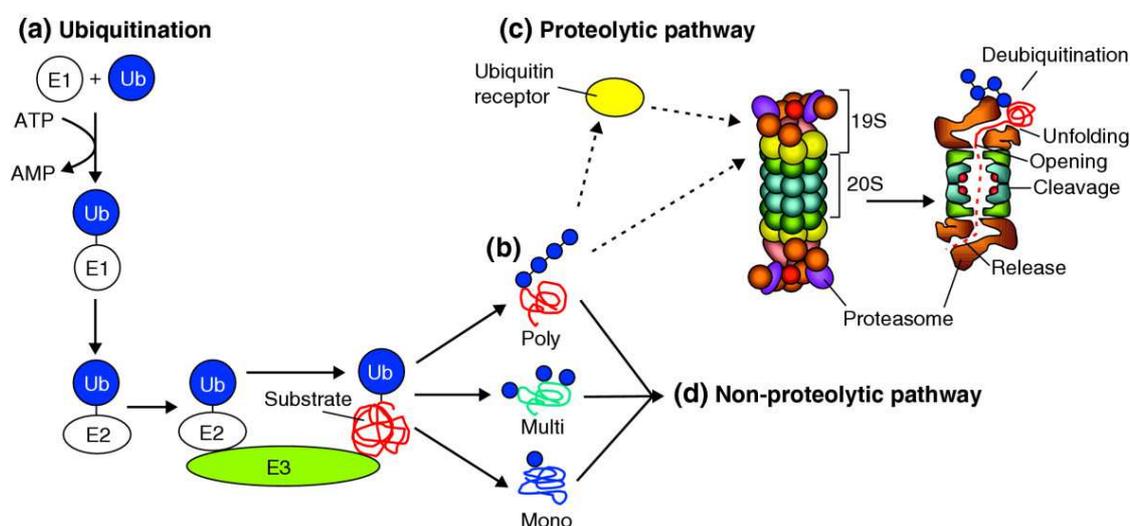
Todas essas alterações são determinantes da redução da força muscular e da intolerância ao esforço<sup>4</sup>, contribuindo para a fadiga precoce. Em pacientes com IC grave, essa perda de massa muscular pode atingir um nível tão acentuado que resulta num processo conhecido como caquexia, semelhante àqueles observados em pacientes com câncer, AIDS e

septicemia e insuficiência, que reduz expressivamente a sobrevida nesses pacientes<sup>10</sup>.

O músculo esquelético é o tecido mais abundante em vertebrados. Ele exerce diversas funções, sendo a locomoção a mais importante delas. É um tecido com elevada plasticidade e *turnover* proteico, e sua massa reflete o balanço entre a síntese e a degradação de proteínas<sup>11</sup>. Durante a atrofia, os sistemas proteolíticos estão ativados, e tanto as organelas quanto as proteínas contráteis são removidas, resultando na diminuição desse tecido<sup>12</sup>. O principal sistema proteolítico e responsável por ~80% da degradação de proteínas celulares é o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP)<sup>13</sup>. Este sistema está envolvido em um processo de controle de qualidade de proteínas e degrada seletivamente aquelas que foram previamente sinalizadas ou ubiquitinadas.

Essa sinalização ocorre sequencialmente em três etapas. Ela se inicia com a ação de enzimas E1, que ativam ubiquitinas, em um processo dependente de ATP, seguida da conjugação dessas ubiquitinas por uma enzima do tipo E2 e, por fim, a ligação dessas cadeias ubiquitinadas (ou poliubiquitinadas) à proteína a ser degradada por enzimas E3, que permite que essa proteína seja reconhecida e degradada em peptídeos menores pela porção 26S do proteassoma<sup>13</sup>. O genoma humano codifica mais de 650 ligases<sup>14</sup>, mas as E3, MuRF e Atrogin são expressas somente no músculo esquelético e estão envolvidas com a atrofia muscular<sup>15,16</sup>. Essas E3 ligases levam a proteína a ser degradada até o proteassoma, uma organela ou

protease multicatalítica, composta por um complexo catalítico central, o 20S, em forma cilíndrica composta por quatro anéis empilhados, sendo duas porções  $\alpha$  externas e duas porções  $\beta$  catalíticas internas, formada pela subunidade  $\beta 1$  ou peptilglutamina, a  $\beta 2$  ou tripsina, e a  $\beta 5$  ou quimiotripsina<sup>17</sup>. O complexo 20S degrada, em peptídeos menores, as proteínas que são marcadas pelas E3 ligases e têm essa cauda poliubiquitinada reconhecida pela partícula regulatória do proteassoma, a 19S. Essas duas partes (20S e 19S) constituem o complexo proteassomal 26S, denominados assim por seus diferentes coeficientes de sedimentação<sup>13</sup>.



**Figura 1.** Esquema representativo do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP). A ubiquitinação de proteínas envolve sua ativação por uma E1, seguido pela conjugação dessas ubiquitinas por enzimas E2 em policaudas e a ligação dessas caudas poliubiquitinadas à proteína a ser degradada (substrato) por uma E3 ligase, para ser reconhecida pela porção 19S e degradada pela 20S (18).

## 1.2. Sistema Renina-Angiotensina e Miopatia Esquelética

Estudos recentes caracterizam o papel do SRA no balanço de síntese e degradação de proteína muscular. A infusão de AngII induz a morte celular programada ou apoptose<sup>19</sup>. Além disso, estudos *in vitro*<sup>20-22</sup> e *in vivo*<sup>23-25</sup>, mostram que a AngII modula a degradação de proteínas musculares. A AngII, agindo no receptor AT1, aumenta o transiente intracelular de cálcio que, por sua vez, ativa caspases, desencadeando a degradação de macroproteínas musculares<sup>26</sup>. Mas o principal fato relacionado ao papel da AngII na miopatia muscular é indução intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)<sup>27</sup>.

Na IC, ROS tem sido relacionada à intolerância ao esforço<sup>28</sup>. Proteínas contráteis do músculo sóleo que foram oxidadas apresentaram elevados níveis de peroxidação associada à disfunção contrátil do músculo isolado, o que foi revertido com agentes antioxidantes<sup>29</sup>. Foi descrito, também, que o estresse oxidativo mediado pela AngII acelera a atividade proteolítica do proteassoma, podendo degradar proteínas oxidadas sem prévia ubiquitinação<sup>30</sup>.

ROS podem ser produzidas em qualquer tipo de célula, e as principais fontes geradoras dessas espécies reativas no músculo são a mitocôndria e a NADPH oxidase<sup>31</sup>. Sabe-se também que a AngII aumenta a atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, a geração de ROS em miotúbulos<sup>32</sup> e que a geração de ROS e a degradação de proteína mediada por AngII é eliminada pela administração de antioxidantes<sup>33</sup>. Além disso, evidências

mostram que a dependência de sinalização redox para ativação do SUP dá através da ativação da NADPH oxidase por mediação da AngII. Essa relação pode ser comprovada por meio de um modelo genético com deleção do p47phox (um constituinte da NADPH oxidase), sem o qual não há ativação desse complexo. Nesse estudo, a administração exógena de AngII, que provoca ativação do SUP e redução da massa muscular não ocorreu nos animais *knockout* do p47phox<sup>34</sup>.

Existem duas teorias pelas quais a AngII, via sinalização redox, induz à atrofia muscular. A primeira considera a ativação de fatores pró-inflamatórios, como o fator nuclear de transcrição kappa B (NFκB). Esta via envolve um complexo inativo no citosol que inclui a proteína I-κB. Quando essa proteína é fosforilada, em um processo envolvendo a ativação citosólica do IKK, ocorre liberação do NFκB e sua translocação para o núcleo, onde ele aumenta a expressão de diversos fatores de transcrição, entre eles as enzimas E3 ligases, especialmente a MuRF<sup>35</sup>. O IKK pode ser ativado por ROS. Sabe-se também que a administração de antioxidantes inibe a proteína I-κB e, com isso, a translocação nuclear do NFκB e a atrofia muscular<sup>33</sup>. O outro mecanismo descrito de atrofia mediado pela AngII envolve a redução do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).

O IGF-1 é um fator de crescimento circulante, produzido em diversos tecidos, inclusive o músculo esquelético<sup>36</sup>, com papel importante na síntese proteica. Alguns investigadores demonstraram que aumentos plasmáticos da concentração de AngII eram acompanhados de redução dos níveis de IGF-1

plasmáticos e de seu receptor celular, o que provocava redução na massa corporal, independente da redução na ingestão calórica<sup>24</sup>. O mesmo grupo de investigadores demonstrou que a AngII causa tanto aumento na degradação, quanto redução na síntese proteica muscular<sup>23</sup>, e que a superexpressão de IGF-1 muscular bloqueia a atrofia mediada pela AngII circulante<sup>37</sup>, em um processo que envolve a supressão da expressão de E3 ligases. Mais recentemente, foi demonstrado que a infusão de AngII também produz degradação de proteínas diafragmáticas<sup>38</sup>, o que poderia ajudar a explicar a disfunção respiratória na IC.

O IGF-1 também tem um papel importante na modulação de processos atroficos, suprimindo a degradação de proteínas<sup>39</sup>. O IGF-1 age no seu receptor específico, onde ativa, através de IP3, a fosforilação da Akt, que gera tanto a síntese de proteínas, via mTOR, quanto a atenuação da degradação, via fosforilação da FoxO. Uma vez defosforilada, essa proteína permanece no citoplasma, impedida de translocar para o núcleo celular, onde provoca aumento da expressão de E3 ligases, especialmente a Atrogin<sup>40</sup>. Animais modificados que superexpressam o IGF-1 na musculatura esquelética são resistentes à atrofia<sup>37</sup>. Em pacientes com IC, os níveis musculares de IGF-1 apresentam elevada correlação com a área de secção transversa, e o decréscimo da expressão gênica desse hormônio precede alterações morfológicas mais pronunciadas nesses pacientes<sup>41</sup>.

Em resumo, mediada pela AngII, a sinalização redox pode tanto atenuar via IGF-1/Akt/FoxO, quanto ativar via do NFkB. Entretanto, ambas

resultam em aumento da expressão de E3 ligases e da hiperativação da proteólise mediada pelo SUP.

### **1.3. Sistema Renina Angiotensina, Miopatia Esquelética e Treinamento Físico**

Conforme abordado no Capítulo 1, o SRA exerce um papel muito importante na IC. Além de mediar a vasoconstrição periférica, com implicações clínicas para o paciente com IC, ele modula alterações na musculatura esquelética. Estudos recentes mostram que o tratamento com inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT1 previnem a redução de massa corporal<sup>42</sup> e de atrofia muscular relacionada à apoptose na IC<sup>43</sup>.

Conforme antecipado no Capítulo 1, o treinamento físico constitui-se numa importante conduta não farmacológica no tratamento da IC. Alguns estudos mostram que o treinamento físico diminui os níveis plasmáticos de Ang II e receptores AT1 de AngII no sistema nervoso central<sup>44,45</sup>, o que parece explicar, pelo menos em parte, a diminuição do tráfico eferente simpático na IC. Na musculatura esquelética, alguns estudos mostram que o desequilíbrio redox, o aumento nos níveis de marcadores de ROS, o aumento na proporção de fibras glicolíticas e a atrofia na musculatura esquelética podem ser prevenidos pelo treinamento físico, em modelo genético de IC por hiperativação simpática<sup>46</sup>. Além disso, o treinamento físico reverte o estresse oxidativo, melhora a expressão de E3 ligases e

diminui a atividade catalítica do proteassoma<sup>47</sup> e, com isso, a atrofia muscular em animais com IC.

Em pacientes com IC, alguns investigadores demonstraram recentemente que o exercício físico atenua a expressão da MuRF, independentemente da idade<sup>48</sup>. O que não se conhece é se esses efeitos do treinamento físico na musculatura esquelética dependem da redução da Ang II. Neste estudo, nós investigamos o papel da AngII na miopatia esquelética em animais com IC de etiologia isquêmica submetidos a treinamento físico. Para abordar este assunto, nós administramos AngII em animais com IC submetidos a treinamento físico, para evitar a sua queda com esse tratamento não farmacológico e, com esse planejamento experimental, verificar se as mudanças na musculatura esquelética ocorriam apesar dos níveis elevados de AngII.

## 2. OBJETIVOS

Testar a hipótese de que:

- 1) A atenuação do SUP provocadas pelo treinamento físico na IC dependem da queda das concentrações plasmáticas de AngII;
  
- 2) O papel da AngII depende da característica metabólica do músculo esquelético.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Amostra**

Conforme descrito no Capítulo 1.

#### **3.2. Delineamento Experimental**

Para verificar se os benefícios do exercício físico na miopatia esquelética dependem da queda das concentrações de AngII na insuficiência cardíaca experimental, utilizamos um delineamento experimental que consistiu na manutenção das concentrações de AngII elevadas, em um grupo IC submetido ao treinamento físico. Assim, tínhamos um grupo controle sedentário, um grupo treinado e um grupo treinado com o “clameamento” de AngII. Além disso, incluímos no estudo um grupo saudável como controle interno.

Controle saudável sedentário (SHSD)

IC Sedentário (ICSD)

IC Treinado (ICTR)

IC Treinado + Ang II (ICTRAII)

Os animais foram operados no término da 6ª semana do período experimental, após procedimento anestésico de solução em bolus de quetamina e xilazina (50 e 10 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente; *i.p.*), para implantação da bomba de infusão (*minipumps* osmóticas, Alzet, ALZA Corp., Palo Alto, CA, EUA), na região subcutânea, área subescapular. A *minipump* continha solução salina (grupos ICDS e ICTR) ou uma quantidade pré-estabelecida de AngII (ICTRAII) (ver delineamento experimental na Figura 2).

A bomba osmótica liberava a solução de forma contínua e homogênea durante 2 semanas (na 7ª e 8ª semanas, conforme a figura 2). A concentração de AngII “clampeada” foi determinada por um estudo piloto, com o objetivo de manter os níveis de AngII elevados, mesmo na vigência do treinamento físico.

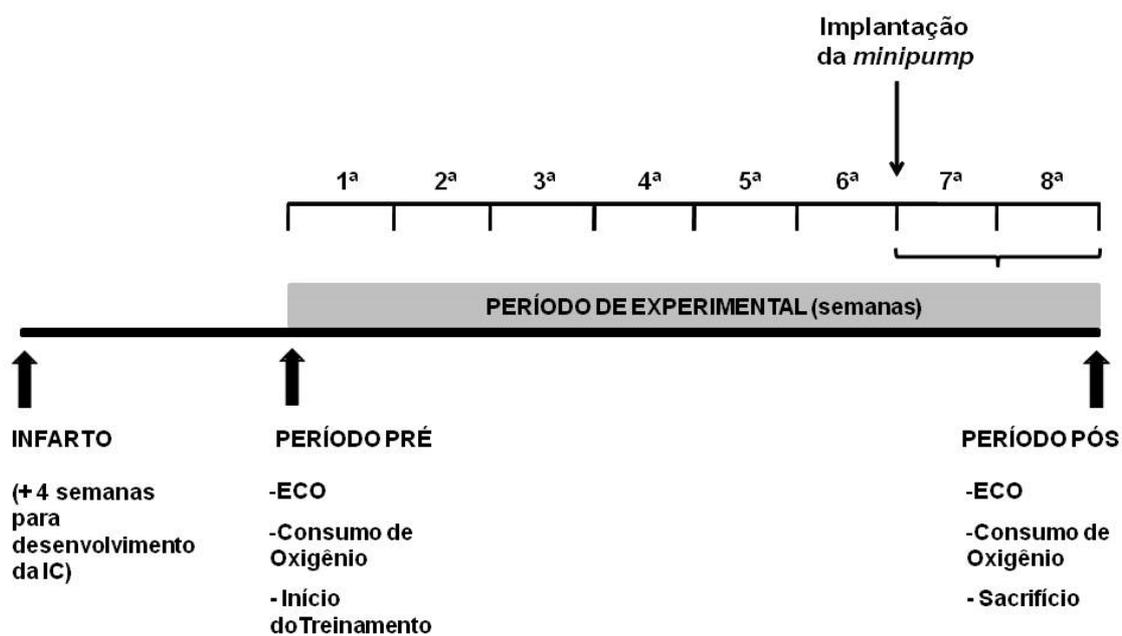


Figura 2. Delineamento experimental

### 3.3. Indução da Insuficiência Cardíaca

Conforme descrito no Capítulo 1.

### 3.4. Avaliação da Função Ventricular

Conforme descrito no Capítulo 1.

### 3.5. Avaliação da Capacidade Funcional

Conforme descrito no Capítulo 1.

### 3.6. Protocolo de Treinamento Físico

Conforme descrito no Capítulo 1.

### 3.7. Sacrifício e Coleta dos Tecidos

Conforme descrito no Capítulo 1.

### 3.8. Expressão Gênica

Conforme descrito no Capítulo 1. Os genes estudados e a sequência dos primers sense e antisense encontram-se na Tabela 1, abaixo. O mesmo gene normalizador descrito no Capítulo 1 (ciclofilina) foi utilizado.

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para avaliação da expressão gênica de RNA mensageiro.

	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
MuRF	GTG TGA GGT GCC TAC TTG CT	ACT CAG CTC CTC CTT CAC CT
Atrogin	TAC TAA GGA GCG CCA TGG ATA CT	GTT GAA TCT TCT GGA ATC CAG GAT
E3 $\alpha$	ACG TGT GTG CTC TGT ATG GA	GCT TGA GCA ATC ACC TCT TC

### **3.9. Expressão Proteica**

Conforme descrito no Capítulo 1. Para quantificação das proteínas poliubiquitinadas, foi utilizado um anticorpo primário para proteínas ubiquitinadas (sc8017, Santa Cruz Biotechnology, EUA), com quantificação do “arrasto” entre as bandas de ~30 a 135kDa. A mesma proteína normalizadora descrita no Capítulo 1 (GAPDH) foi utilizada.

### **3.10. Proteínas Carboniladas**

A quantificação de proteínas carboniladas foi avaliada através da utilização de grupos carbonils, utilizando o OxyblotProteinDetection Kit (s7150, Millipore, EUA). Proteínas solúveis do homogenato destinado à expressão proteica foram denaturadas em 6% SDS e derivadas 1,2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) por 15min. A reação foi inibida por solução neutralizadora e submetida à eletroforese (SDS-PAGE), conforme descrito no item Expressão Proteica. As membranas foram então bloqueadas por 1h em 1% BSA e encubadas em anticorpo primário (RabbitAnti-DNP) e secundário (GoatAnti-RabbitIgG – HRP conjugado), e a atividade quimioluminescente foi detectada conforme descrito anteriormente, com quantificação do “arrasto” entre as bandas de ~30 a 135kDa.

### 3.11. Determinação da Atividade do Proteassoma

Foi conduzida a homogeneização da amostra no mesmo tampão descrito para Expressão Proteica, mas sem a adição de inibidores de proteases e fosfatases. Para quantificação da atividade da porção 26S do proteassoma, 5 $\mu$ L de amostra foram adicionados à placa escura juntamente com 0,0025mM de substrato fluorescente específico do sítio catalítico da quimiotripsina (LLVY-AMC, Enzo Life Sciences, EUA), 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,025mM de ATP e o volume de 200 $\mu$ L foi completado por tampão Tris-HCl (pH 7,6). As amostras foram analisadas em duplicata e para cada amostra foi utilizado um controle inibido (Epoxomicina 1 $\mu$ M, Enzo Life Sciences, EUA). A cinética foi detectada em fluorímetro ( $\lambda_{em} = 440\text{nm}$  e  $\lambda_{ex} = 325\text{nm}$ ), em 90 min, a 37°C, e a atividade do proteassoma foi identificada pela diferença entre a inclinação da amostra e da amostra inibida e corrigida pela concentração de proteína, expressa em uF.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

### 3.12. Análise Estatística

A normalidade dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade pelo método de Levene. Confirmando-se a distribuição normal e variâncias homogêneas, seguiram-se análises paramétricas para comparação entre os grupos. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de dois fatores para as variáveis relacionadas à Capacidade Funcional e Dados Ecocardiográficos (Pré e Pós, respectivamente antes e após o período de protocolo experimental). Para as

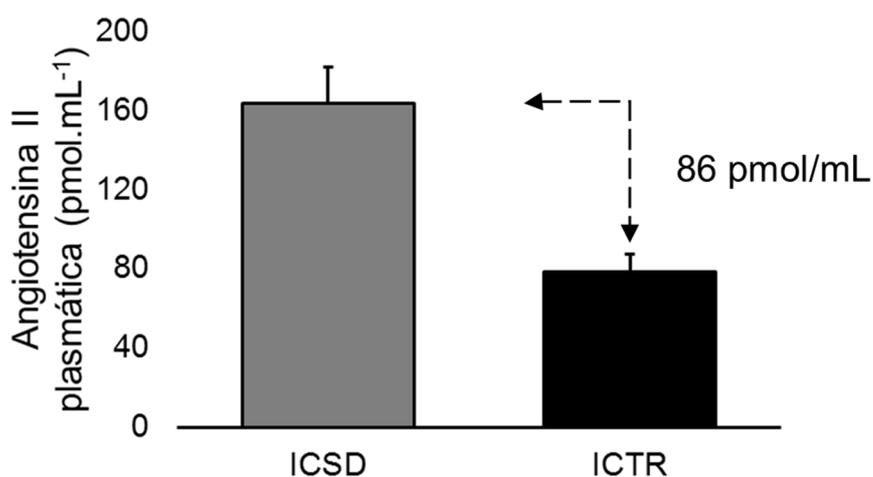
demais comparações entre grupos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de um fator. Em caso de significância estatística, o post-hoc de Tuckey foi aplicado. Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e foi adotado como significativo um  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudo Piloto

A primeira fase do estudo consistiu de um piloto para verificar o efeito do treinamento nas concentrações plasmáticas de AngII em animais com IC. Foram utilizados os mesmos critérios de inclusão e distribuição dos animais com IC e Sham descritos no Capítulo 1.

Após 8 semanas de treinamento físico, verificou-se uma redução de  $86\text{pmol.mL}^{-1}$  nas concentrações plasmáticas de AngII em animais com IC. Essa quantidade de AngII foi utilizada como referência a ser infundida nos animais treinados com IC, para impedir a queda da AngII com o treinamento físico (Figura 3).



**Figura 3.** Modelo de Clampeamento. Redução da concentração plasmática de AngII após treinamento físico em ratos com insuficiência cardíaca ( $n=6$ , ICSD) e ratos com insuficiência cardíaca treinados ( $n=8$ , ICTR). A linha tracejada representa a quantidade de angiotensina II a ser “clampeada” no protocolo experimental.

Considerando que a meia-vida sistêmica da AngII é bastante curta, variando de ~15s a menos de 2min<sup>49,50</sup>, foi assumido que esse valor de 86pmol/mL deveria ser mantido a cada minuto. Considerando o peso molecular da AngII (1.046 g.mol<sup>-1</sup>), o valor foi convertido para pg.mL<sup>-1</sup> e, em seguida, a µg, chegando-se à concentração de 0,0053 µg.mL<sup>-1</sup>. Este valor foi infundido ao longo das 24 horas do dia, por 14 dias, totalizando 1,17808 µg.mL<sup>-1</sup>. Foi considerado, também, que esse valor representava a concentração por mL, e não no volume sanguíneo. Foi, então, considerado como fator de correção um valor aproximado de 6mL de plasma, estimado para a massa corporal média dos animais durante o estudo, o que gerou o valor de 10,6848 µg.mL<sup>-1</sup>, que foi convertido para microlitros (unidade da *minipump*), em um valor aproximado de 0,011µg.µL<sup>-1</sup>, que foi, então, finalmente ajustado para a capacidade reservatória da *minipump* (~200µL), fornecendo a quantidade de AngII por *minipump*, por animal. Um lote intermediário de animais teve os níveis de AngII analisados para verificação da eficácia do “clampeamento”, que foi constatada e mantida nos lotes subsequentes.

#### **4.2. Capacidade Funcional, Parâmetros Ecocardiográficos e Dados Fisiológicos**

Após 4 semanas da cirurgia, não foi observada diferença significativa na massa corporal entre os grupos (SHSD 385,17±12g, ICSD 393,31±14,07, ICTR 363,69±11,40g e ICTRAII 371,57±9,08g). Os dados ecocardiográficos

do período Pré, 4 semanas após a cirurgia, e do período Pós, 8 semanas após o período experimental, são apresentados na Tabela 2.

Em relação aos dados estruturais do ventrículo esquerdo, não foram verificadas alterações na parede posterior (PPVE) e no septo intraventricular (SIVE) em nenhuma das fases do estudo. Entretanto, os grupos com IC apresentaram um aumento no diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (DSVE) e em diástole (DDVE), tanto no período Pré ( $p \leq 0,0001$ ) quanto no período Pós ( $p \leq 0,009$ ). Não houve influência do treinamento físico ou do clampeamento com AngII.

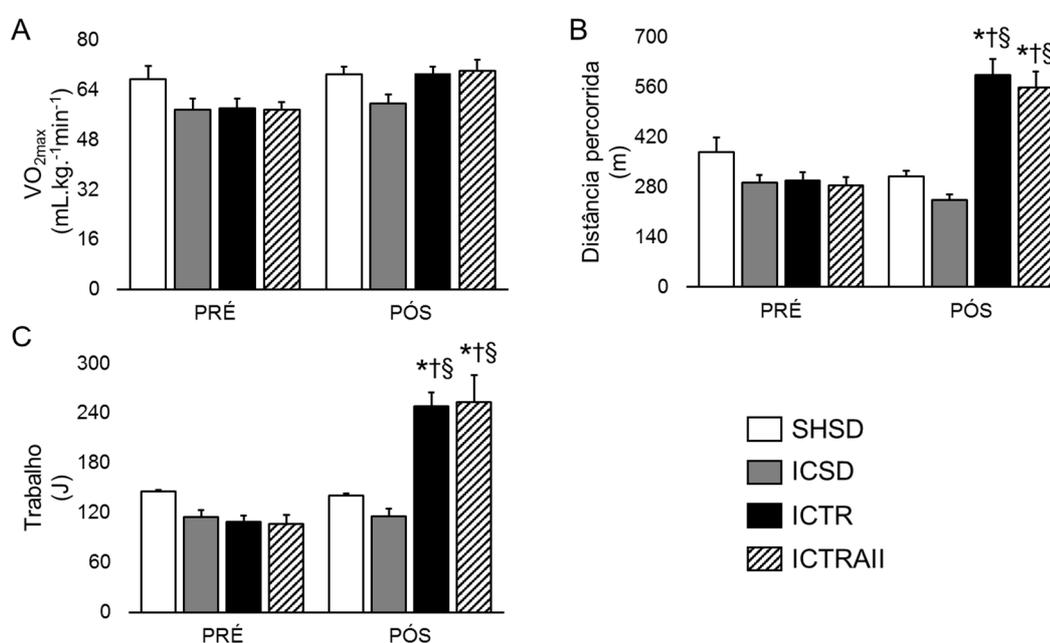
**Tabela 2.** Características ecocardiográficas do ventrículo esquerdo em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II.

	SHSD		ICSD		ICTR		ICTRAII	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Morfometria</b>								
<b>PPVE (mm)</b>	10,3 ±0,8	11,3 ±0,5	9,3 ±0,5	10,2 ±0,8	9,3 ±0,5	14,0 ±5,1	9,0 ±0,4	14,0 ±5,1
<b>SIVE (mm)</b>	11,5 ±0,7	12,4 ±0,5	11,3 ±1,0	12,0 ±1,0	12,3 ±0,6	12,2 ±0,4	12,2 ±0,9	10,1 ±0,7
<b>DSVE (mm)</b>	38,0 ±3,9	35,5 ±3,0	93,4 ±2,8*	100,0 ±4,2*	89,8 ±6,9*	84,9 ±9,9*	89,3 ±2,2*	95,4 ±3,8*
<b>DDVE (mm)</b>	72,2 ±2,8	71,4 ±2,6	106,9 ±2,5*	113,1 ±4,52*	107,1 ±2,9*	109,6 ±3,7*	104 ±1,7*	97,4 ±10,5*
<b>Função Sistólica</b>								
<b>FS (%)</b>	48,4 ±3,8	50,4 ±3,4	12,6 ±1,3*	11,57 ±1,1*	11,5 ±1,2*	13,62 ±2,16*	12,5 ±1,3*	12,58 ±1,7*
<b>FE (%)</b>	78,9 ±4,5	84,5 ±2,9	30,3 ±2,8*	27,9 ±2,6*	27,9 ±2,8*	31,78 ±4,5*	30,2 ±2,8*	29,96 ±3,79*
<b>Função Diastólica</b>								
<b>TRIV (ms)</b>	33,4 ±1,9	44,1 ±6,0	45,7 ±4,0	41,7 ±4,5	38,2 ±2,7	52,5 ±7,6	39,5 ±1,7	40,9 ±2,1
<b>E/A (razão)</b>	1,83 ±0,2	1,59 ±0,1	2,09 ±0,9	3,70 ±0,6	2,03 ±1,03	2,91 ±0,5	2,00 ±0,5	4,65 ±1,6

SHSD, Controle saudável sedentário; ICSD, insuficiência cardíaca sedentário; ICTR, insuficiência cardíaca treinado; ICTRAII, insuficiência cardíaca treinado + Angiotensina II. PPVE, parede posterior em diástole; SIVE, septo intraventricular; DSVE, diâmetro sistólico; DDVE, diâmetro diastólico; FS, fração de encurtamento; FE, fração de ejeção; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico; E/A, razão entre as ondas E e A. n=10 por grupo para todas as variáveis, exceto razão E/A (3 a 9 por grupo) \* p<0,05 vs. SHSD no mesmo período.

A função diastólica, avaliadas pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e relação entre as ondas E e A (razão E/A) não foi alterada nem pelo treinamento físico nem pela infusão de AngII. Cabe ressaltar que devido à impossibilidade de detecção da onda A em grande parte dos animais com IC, não foi possível detectar a relação E/A na maior parte dos animais estudados, reduzindo o poder estatístico para análise dessa variável.

A Figura 4 mostra os dados de capacidade funcional. Em relação à variável  $VO_{2max}$  (A), não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos períodos estudados.



**Figura 4.** Capacidade funcional.  $VO_{2max}$  (A), distância percorrida (B) e trabalho realizado (C) em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \* $p < 0,05$  vs. SHSD no mesmo período; † vs. ICSD no mesmo período; § vs. mesmo grupo no período Pré.

Não houve diferença significativa no período Pré em relação à distância percorrida (B) e ao trabalho realizado (C). Entretanto, no período Pós, o grupo ICSD apresentou redução na distância percorrida e desempenho de corrida em relação ao SHSD ( $p \leq 0,0002$  e  $0,0003$  respectivamente). O treinamento físico provocou uma melhora expressiva em ambos os grupos treinados nesses parâmetros em comparação com o período Pré ( $p \leq 0,0002$ ), e em relação aos grupos SHSD e ICSD ( $p \leq 0,0002$ ) no mesmo período. Essa melhora mediada pelo treinamento físico não foi influenciada pelo clampeamento de AngII.

A Tabela 3 apresenta os dados relativos à massa corporal e de tecidos. O treinamento físico reduziu a massa corporal em ambos os grupos treinados em relação ao ICSD ( $p=0,01$ ). Quanto aos parâmetros anatomo-patológicos, não houve diferença estatística entre os grupos na massa pulmonar úmida ou no teor de água dos pulmões.

Em relação às alterações cardíacas, os animais com IC apresentaram maior massa atrial (ICSD  $p=0,02$ , ICTR  $p=0,01$  e ICTRAII  $p=0,002$ ) do ventrículo direito ( $p=0,009$ ,  $0,004$  e  $0,008$ ) e, também, maior massa cardíaca total ( $p \leq 0,0005$  nos 3 grupos IC). Em relação ao VE, apenas o grupo ICTR apresentou um aumento em relação aos outros grupos ( $p=0,0004$ ), que não ocorreu no grupo ICTRAII.

**Tabela 3.** Características morfológicas em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II.

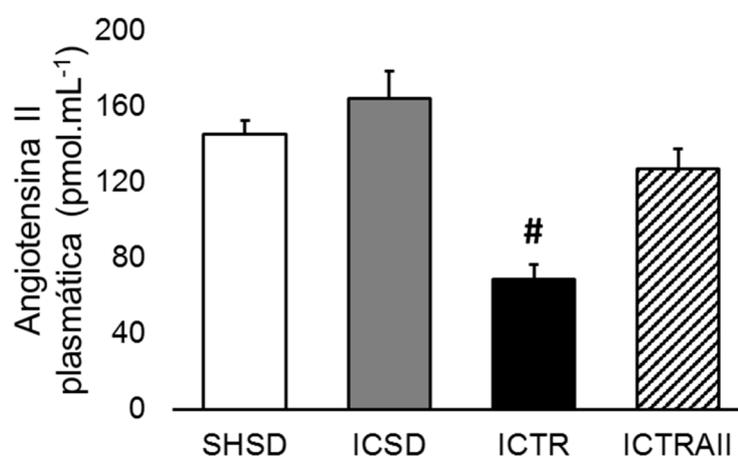
	SHSD	ICSD	ICTR	ICTRAII
<b>MC (g)</b>	455,08 ±13,1	472,72 ±16,8	417,87 ±15,5 <sup>†</sup>	411,58 ±9,51 <sup>†</sup>
<b>Pulmão úmido (g)</b>	1,76±0,0	3,00±0,2	2,88±0,1	3,31±0,3
<b>TAP (%)</b>	77,13±0,2	78,58±0,7	79,14±0,5	78,0±0,5
<b>AT (mg/g)</b>	0,14±0,1	0,31±0,0*	0,33±0,0*	0,38±0,1*
<b>VD (mg/g)</b>	0,50±0,2	0,94±0,1*	0,97±0,0*	0,94±0,1*
<b>VE (mg/g)</b>	1,80±0,1	1,98±0,1	2,19±0,0*	2,01±0,1
<b>MCar (mg/g)</b>	2,44±0,1	3,23±0,1*	3,49±0,1*	3,33±0,1*
<b>Sóleo (mg)</b>	155,0±4,4	159,11±8,9	162,92±9,5	145,74±4,8
<b>Sóleo (mg/g)</b>	0,34±0,0	0,34±0,0	0,39±0,0	0,35±0,0
<b>Plantar (mg)</b>	402,40±13,4	416±0,06	393,94±19,0	369,14±16,0
<b>Plantar (mg/g)</b>	0,88±0,0	0,84±0,0	0,90±0,0	0,90±0,0

SHSD, Controle saudável sedentário; ICSD, insuficiência cardíaca sedentário; ICTR, insuficiência cardíaca treinado; ICTRAII, insuficiência cardíaca treinado + Angiotensina II. MC, massa corporal; TAP, teor de água do pulmão; AT, átrios; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; MCar, massa cardíaca. n=10 por grupo. \*p<0,05 vs. SHSD; † vs. ICSD.

A massa absoluta e relativa dos músculos sóleo e plantar não foi significativamente diferente entre os grupos estudados.

Na Figura 5 são mostrados os dados referentes às concentrações plasmáticas de AngII. O treinamento físico reduziu os níveis plasmáticos de

AngII ( $p < 0,0001$ ). Essa redução foi abolida pela infusão de AngII ( $p = 0,003$ ), demonstrando a efetividade da abordagem experimental utilizada no presente estudo, que consistia em manter os níveis de AngII nos mesmos níveis do grupo ICSD.



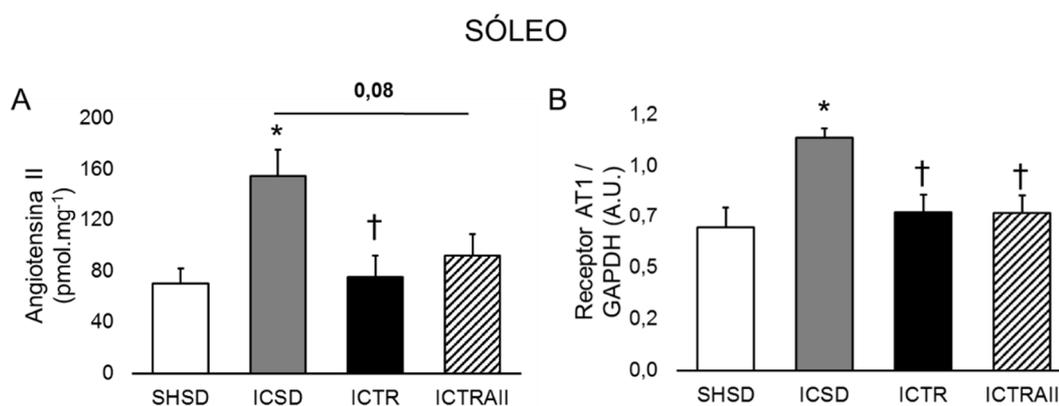
**Figura 5.** Concentração plasmática de angiotensina II em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos à infusão de angiotensina II. # $p < 0,05$  vs. SHSD, ICSD e ICTRAII.

#### **4.3. Resposta Muscular Esquelética ao Treinamento Físico com Infusão de Angiotensina II**

O principal objetivo do estudo foi verificar se os efeitos do treinamento físico na miopatia esquelética, induzida pela ativação do SUP na IC, dependem de redução dos níveis sistêmicos de AngII. Este estudo envolveu os músculo sóleo e plantar.

### 4.3.1 Músculo Sóleo

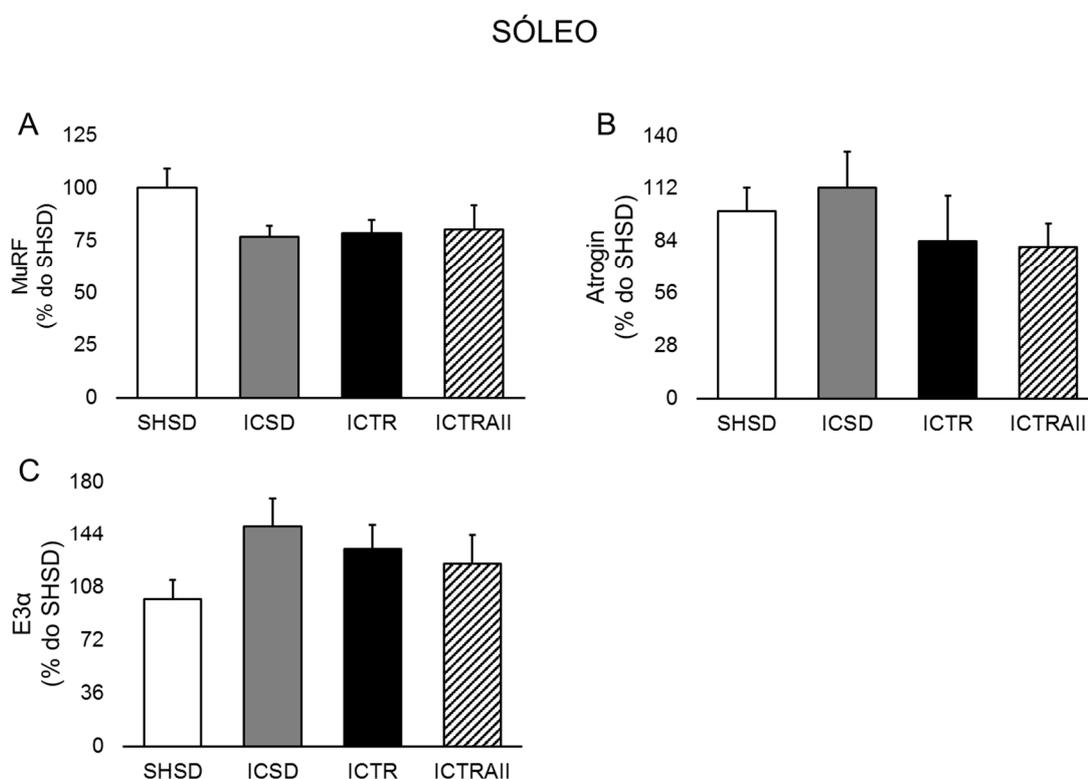
A Figura 6 mostra os níveis de AngII no músculo sóleo (A) e na expressão proteica do receptor AT1.



**Figura 6.** Concentração de angiotensina II (A) e expressão proteica do receptor AT1 (B) no músculo sóleo em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \*p<0,05 vs. SHSD; † vs. ICSD.

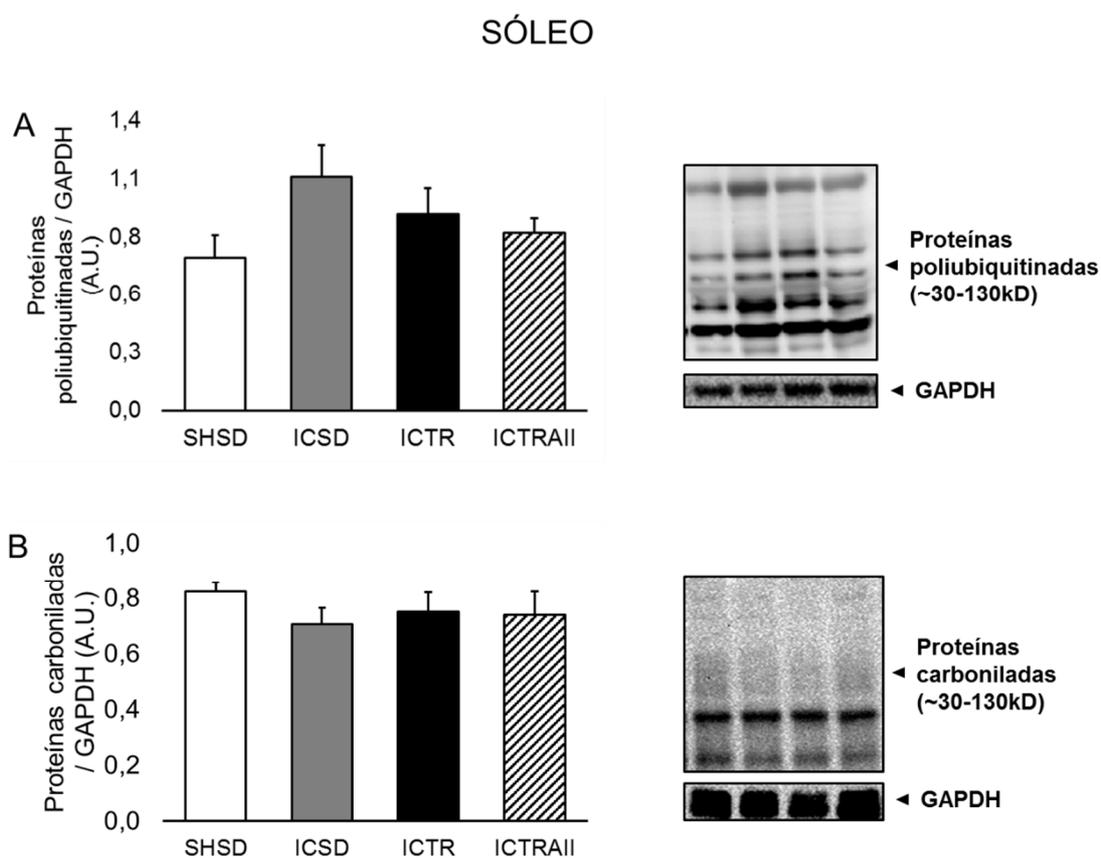
Os animais com IC apresentaram níveis locais de AngII 2,2 vezes maiores que nos animais saudáveis (p=0,005). O treinamento físico diminuiu os níveis de AngII no músculo sóleo (p=0,01), inclusive nos animais submetidos à infusão de AngII (p=0,05). A expressão do receptor AT1 estava aumentada nos animais com IC (p=0,02). O treinamento físico reduziu a expressão desse receptor (p≤0,04), para níveis semelhantes aos da normalidade.

Para estudar o perfil de ativação do SUP, foram quantificados os níveis de expressão do RNA mensageiro das enzimas E3 ligases, MuRF, Atrogin e E3 $\alpha$ . O treinamento físico e a infusão de AngII não alteraram a expressão do RNA mensageiro das enzimas E3 ligases (Figura 7).



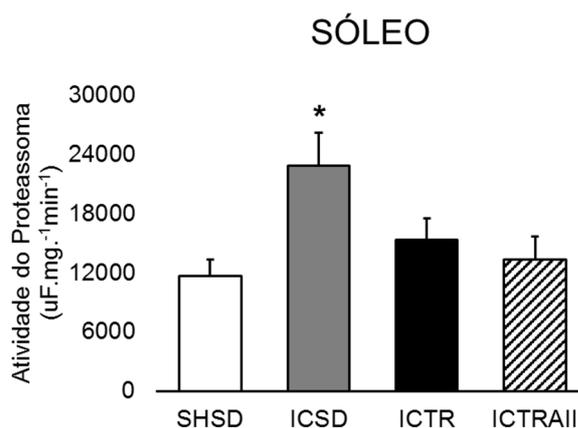
**Figura 7.** Expressão gênica dos atrogenes MuRF (A), Atrogin (B) e E3 $\alpha$  (C) no músculo sóleo em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Da mesma forma, não foi observada diferença significativa na quantificação das proteínas ubiquitinadas e proteínas carboniladas (Figura 8, A e B, respectivamente).



**Figura 8.** Proteínas ubiquitinadas (A) e proteínas carboniladas (B) no músculo sóleo em ratos saudáveis, ratos com insuficiência, ratos com insuficiência cardíaca cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. Imagens representativas dos imunoblots estão à direita dos respectivos gráficos. Não houve diferença estatística entre os grupos.

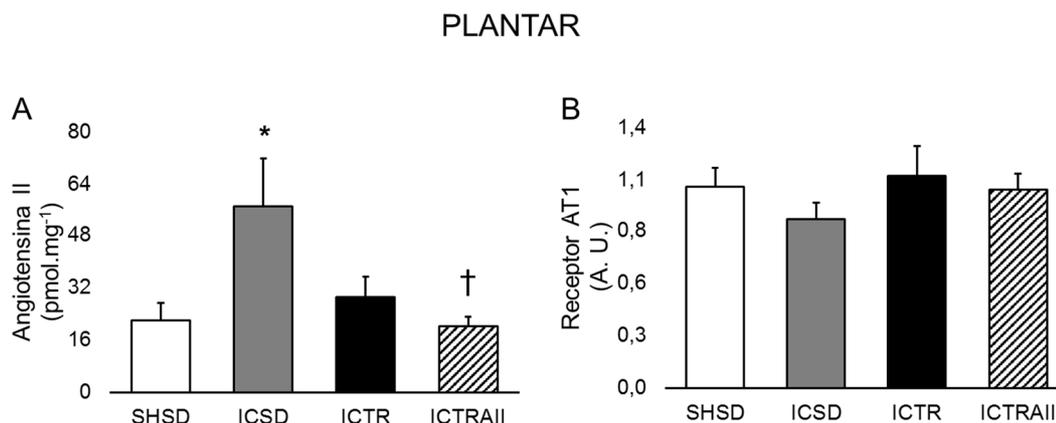
A IC aumentou significativamente a atividade do proteassoma no sítio da quimitripsina ( $p=0,04$ ; Figura 9). O treinamento físico diminuiu a atividade do proteassoma mesmo com a infusão de AngII.



**Figura 9.** Atividade do proteassoma no músculo sóleo de ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \* $p<0,05$  vs. SHSD, † vs. ICSD.

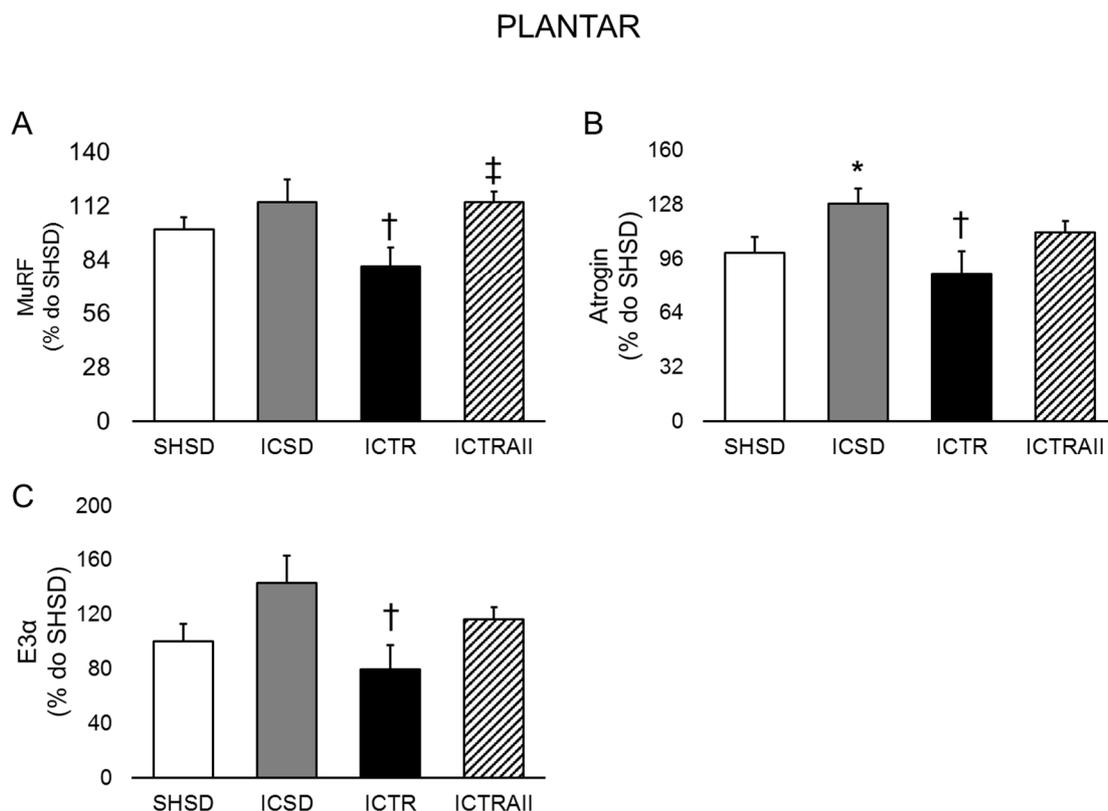
#### 4.3.2 Músculo Plantar

Na figura 10, são mostrados os valores de AngII no músculo plantar e a expressão proteica do receptor AT1. Os animais com IC apresentaram níveis de AngII 2,6 vezes maior que no grupo SHSD ( $p=0,02$ ). O treinamento físico preveniu esse aumento em ambos os grupos treinados ( $p=0,05$  e  $0,01$  vs. ICTR e ICTRAII, respectivamente, em relação ao ICSD). Não houve diferença entre os grupos quanto a expressão proteica do receptor AT1.



**Figura 10.** Concentração de angiotensina II (A) e expressão proteica do receptor AT1 (B) no músculo plantar em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \* $p < 0,05$  vs. SHSD; † vs. ICSD.

Em relação ao perfil de ativação do SUP, a expressão gênica das enzimas E3 ligases (Figura 11) aumentou na IC, atingindo significância na expressão do Atrogin ( $p=0,03$ ). O treinamento físico diminuiu significativamente a expressão gênica da MuRF ( $p=0,002$ ), do Atrogin ( $p=0,003$ ) e da E3 $\alpha$  ( $p=0,04$ ). A redução desses atrogenes foi abolida pela infusão de AngII.

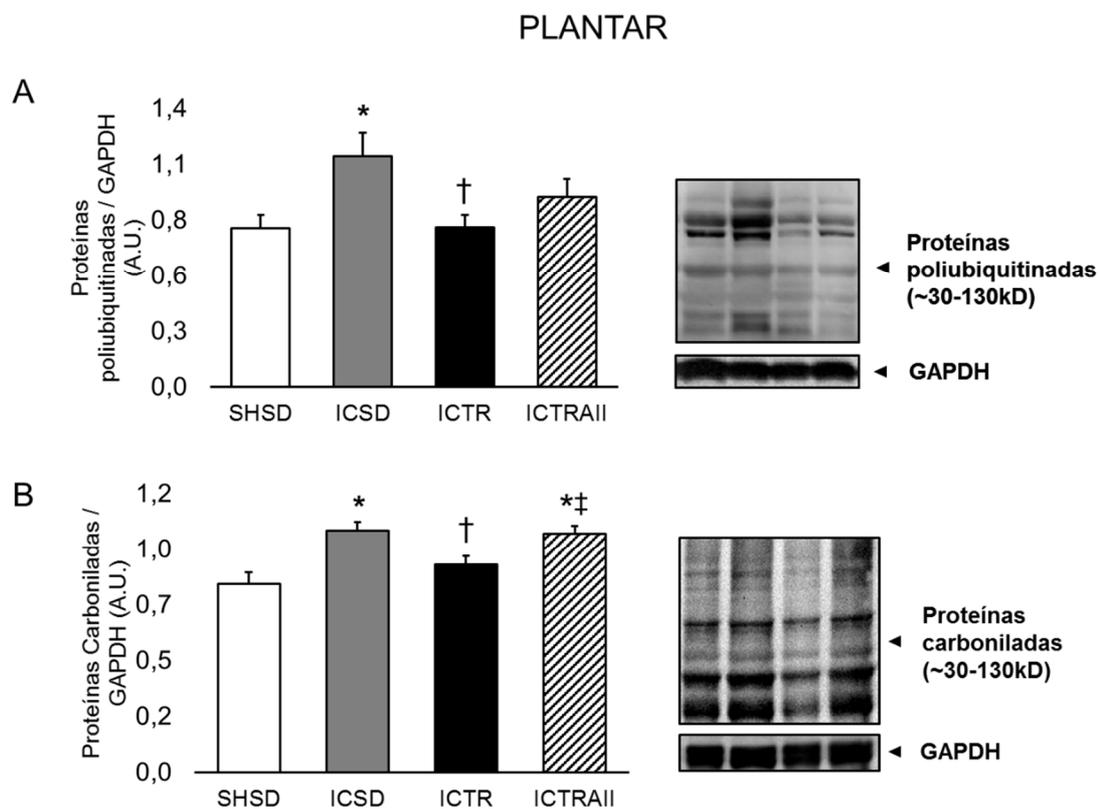


**Figura 11.** Expressão gênica dos atrogenes MuRF (A), Atrogin (B) e E3α (C) no músculo plantar em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \* $p < 0,05$  vs. SHSD, † vs. ICSD e ‡ vs. ICTR.

Na Figura 12, constam os resultados das proteínas ubiquitinadas. A IC provocou um aumento significativo ( $p=0,05$ ) nos níveis de proteínas ubiquitinadas. O treinamento físico normalizou esses níveis ( $p=0,03$ ). Entretanto, esse efeito foi aparentemente perdido com a infusão de AngII.

A quantidade de proteínas carboniladas estava aumentada na IC ( $p=0,003$ ). O treinamento físico normalizou esse marcador ( $p=0,01$ ), efeito

que foi completamente bloqueado pela infusão de AngII ( $p=0,004$  vs. SHSD e  $0,016$  vs. ICSD).



**Figura 12.** Proteínas ubiquitinadas (A) e proteínas carboniladas (B) no músculo plantar em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. Imagens representativas dos imunoblots estão à direita dos respectivos gráficos. \*  $p<0,05$  vs. SHSD, † vs. ICSD, ‡ vs. ICTR.

A atividade do proteossoma no músculo plantar (Figura 13) estava significativamente aumentada na IC ( $p=0,05$ ). O treinamento físico normalizou essa atividade. E, surpreendentemente, a infusão de AngII associada ao treinamento físico potencializou essa queda da atividade do proteossoma ( $p=0,02$ ).

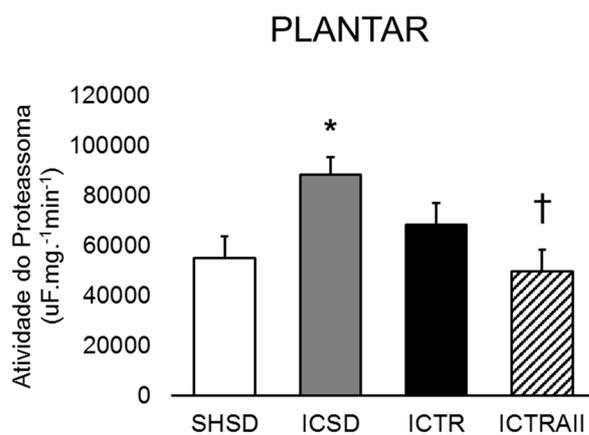


Figura 13. Atividade do proteassoma no músculo plantar em ratos saudáveis, ratos com insuficiência cardíaca, ratos com insuficiência cardíaca treinados e ratos com insuficiência cardíaca treinados submetidos ao *clamp* de angiotensina II. \* $p < 0,05$  vs. SHSD, † vs. ICSD.

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar se os benefícios do treinamento físico dependem da redução dos níveis sistêmicos de AngII em animais com IC crônica. Os principais achados desse estudo são que, independentemente da AngII na circulação, o treinamento provoca: 1) Redução nos níveis locais de AngII nos músculos sóleo e plantar; 2) Redução da expressão proteica do receptor AT1 no músculo sóleo, sem influenciar o músculo plantar. Além disso, o treinamento físico: 1) Reduz a expressão gênica de Atrogin e E3 $\alpha$  e MuRF no músculo plantar, mas no músculo sóleo, o que é abolido pela AngII; e 2) Atenua a redução de proteínas ubiquitinadas e impede a redução de proteínas carboniladas no músculo plantar, mas não no músculo sóleo, o que é abolido pela AngII; e 5) Reduz a atividade do proteossoma em ambos os músculos, sóleo e plantar, independente da AngII.

### 5.1 Efeito do Treinamento Físico na Função Cardíaca e Efeito do Clamp de AngII

A caracterização do modelo de IC e o efeito do treinamento físico foram amplamente discutidos no Capítulo 1, de forma que eles não serão mais abordados nesse capítulo.

A IC provocou um aumento do DSVE e DDVE e redução da FE e FS. O treinamento físico ou a administração da AngII não influenciaram esses

parâmetros. Resultados semelhantes foram verificados na massa dos tecidos cardíacos.

O treinamento físico reduziu a massa corporal, independentemente da administração de AngII. Esse achado é importante na medida em que foi demonstrado que a infusão de AngII diminui a massa corporal por redução na ingestão calórica, associada à diminuição na síntese proteica<sup>24</sup>.

Nós não encontramos redução da massa dos músculos sóleo e plantar, apesar de alterações nas vias de degradação de proteína. Estes resultados não chegam a surpreender, uma vez que estudo prévio mostrou que o processo catabólico na IC se inicia com alterações na sinalização intracelular e molecular que antecedem a atrofia muscular<sup>41</sup>.

Em relação à capacidade funcional, nós não encontramos diferenças no  $VO_{2max}$  entre os grupos estudados, mas a distância percorrida e o trabalho realizado foram significativamente maiores nos grupos treinados, independentemente da administração de AngII. Estudando animais saudáveis não treinados, Inoue e colaboradores<sup>51</sup> encontraram redução na capacidade de exercício após um breve período de infusão de AngII, que foi associado a um aumento do estresse oxidativo e redução da função mitocondrial. Por outro lado, sabe-se que a AngII está relacionada à angiogênese<sup>52</sup> e ao aumento de capilarização<sup>53</sup>. Estes fatores podem ter contrabalanceado os efeitos deletérios da AngII no metabolismo energético em nosso estudo.

O fato de conseguirmos manter os níveis plasmáticos de AngII dos animais treinados próximos daqueles achados nos animais sedentários possibilitou testar a hipótese experimental levantada no presente estudo. Esse modelo, além de inédito para estudo em regulação de massa muscular, é extremamente adequado porque isola a AngII como mediadora da miopatia. E, no nosso caso, possibilitou verificar o papel do treinamento físico em um fenótipo IC. Outros estudos acerca dos efeitos da AngII na musculatura esquelética utilizaram, em animais saudáveis, doses de 50 a 1000ng.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, todas doses subpressoras<sup>23,34,38,51,54</sup>. Entretanto, 4.2ng.kg.<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> já provocam alterações importantes na sinalização hipertrófica e de formação de colágeno<sup>55</sup>. Em nosso estudo, a quantidade de AngII infundida foi de ~15ng.kg.<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, e em uma situação real de IC.

## **5.2 Papel da AngII na miopatia esquelética, e o Papel do Treinamento Físico**

Alterações na ultra-estrutura e função da musculatura esquelética tem sido relacionada a um mal prognóstico na IC<sup>10</sup>. Além disso, sabe-se que pacientes com IC e caquexia associada apresentam um quadro de hiperativação neurohumoral e pró-inflamatório<sup>56</sup>. Estes conhecimentos nortearam os primeiros estudos sobre a miopatia esquelética na IC. Nesse cenário, a partir da observação de que os níveis de AngII estão elevados em fases avançadas da IC<sup>57</sup> e que o aumento nos níveis sistêmicos<sup>23,24,34</sup> e em meio de cultura muscular desse peptídeo provocam proteólise e atrofia

associados à ativação do SUP<sup>20</sup>, levantou-se a hipótese de que a AngII é um importante candidato na miopatia muscular<sup>58,59</sup>. Entretanto, essa relação até o presente momento não foi estudada em modelo experimental com a presença de IC. Ainda, nós decidimos verificar o papel sistêmico da AngII nas mudanças musculares provocadas pelo treinamento físico na IC.

No presente estudo, nós avaliamos as concentrações de AngII tanto na circulação quanto nos músculos sóleo e plantar. A literatura sugere que níveis cronicamente sustentados de AngII na circulação tendem a aumentar a concentração nos tecidos<sup>60</sup>. Os nossos resultados não confirmam essa associação. Primeiro, a concentração plasmática de AngII estava aumentada no músculo, mas não na circulação em ratos com IC. Segundo, o treinamento físico diminuiu os níveis de AngII em ambos, circulação e músculo.

A ativação do SUP é necessária para que ocorra a atrofia muscular, e ela depende em grande parte da ativação das E3 ligases<sup>15</sup>. Recentemente, foi demonstrado em humanos que o treinamento físico aeróbio diminuiu a expressão da MuRF em pacientes com IC independentemente da idade, mas não alterou a expressão da Atrogin no músculo vasto lateral<sup>48,61</sup>. Nosso grupo demonstrou um aumento significativo da expressão das enzimas E3 $\alpha$ , MuRF e Atrogin em um modelo genético de IC no músculo plantar, que foi prevenida pelo treinamento físico<sup>47</sup>. Já no sóleo, a expressão das E3 ligases não estava aumentada em decorrência do infarto. E o treinamento físico

aeróbio moderado diminuiu a expressão da MuRF e a redução da Atrogin só ocorreu com um treinamento aeróbio intervalado de alta intensidade<sup>62</sup>.

É muito provável que as diferenças encontradas devam-se às características do músculo estudado. Em nosso estudo, utilizamos um músculo com predominância de fibras do tipo I, oxidativas (sóleo) e outro com mais fibras do tipo II, glicolíticas (plantar). Nós não encontramos diferenças entre os grupos no que se refere à expressão do RNA mensageiro desses atrogenes no músculo sóleo. Já no músculo plantar, o aumento do Atrogin foi prevenido pelo treinamento físico, que também reduziu a expressão da E3 $\alpha$  e da MuRF. Interessante que a administração de AngII atenuou a redução na E3 $\alpha$  e na Atrogin, e aboliu completamente o efeito do treinamento na expressão da MuRF no músculo plantar.

Essas alterações na expressão das E3 ligases podem ter influenciado a quantidade de proteínas ubiquitinadas. Embora a ubiquinação não seja essencial para a degradação de proteínas pelo SUP, é certo que essa marcação das proteínas a serem degradadas acelera muito o processo de proteólise<sup>63</sup>. No presente estudo, as respostas de proteínas ubiquitinadas foram semelhantes àsquelas encontradas na expressão dos atrogenes. Enquanto no músculo sóleo não houve alteração nas proteínas ubiquitinadas, no músculo plantar elas estavam aumentadas em animais com IC. O treinamento físico reduziu esse valor. Entretanto, a administração de AngII atenuou a redução da quantidade de proteínas marcadas para degradação em animais treinados.

Esses resultados indicam que a sinalização atrófica canônica do SUP parece afetar mais o músculo plantar do que o músculo sóleo. De fato, em doenças sistêmicas, como a IC, fibras glicolíticas são preferencialmente alvo de degradação<sup>64</sup>, possivelmente devido à capacidade diferenciada de resposta dos tipos de fibras ao desequilíbrio redox. Em um elegante estudo, Yu e colaboradores<sup>65</sup> demonstraram que, frente ao estresse oxidativo, o músculo glicolítico é mais susceptível à sinalização atrófica do que o músculo sóleo. Nesse estudo, apenas no músculo sóleo ocorreu uma resposta antioxidante compensatória mediada pelo aumento de óxido nítrico, levando à menor expressão de atrogenes e oxidação de proteínas em comparação com o músculo glicolítico. Mais recentemente, o nosso grupo demonstrou que a atividade da superóxido dismutase (SOD), principal enzima antioxidante, estava reduzida no músculo sóleo de ratos infartados e com forte tendência de redução também no músculo plantar. Entretanto, o aumento da atividade antioxidante da SOD com o treinamento físico só foi observada no músculo sóleo<sup>62</sup>.

As ações atróficas da AngII são mediadas por um aumento nas espécies reativas de oxigênio<sup>25,34</sup>. É consenso que espécies reativas de oxigênio provocam a oxidação de diversos componentes biológicos, incluindo proteínas, DNA, lipídios e pequenas moléculas. A carbonilação é um dos processos de oxidação que podem ocorrer diretamente em proteínas<sup>66</sup>. Essa oxidação provoca redução da função da proteína oxidada e se associa à progressão de doenças crônico-degenerativas, e em acúmulos moderados são degradadas preferencialmente pelo

proteassoma<sup>67</sup>, contribuindo ainda mais para o processo de miopatia. Além disso, a quantidade de proteínas carboniladas se correlaciona inversamente com a capacidade de exercício<sup>68</sup> e tem sido utilizada amplamente como um marcador de proteínas oxidadas na IC<sup>47,68,69</sup>. Em nosso estudo, não houve diferença no nível de carbonilação de proteínas no músculo sóleo. No músculo plantar, três resultados importantes foram verificados. Primeiro, houve um aumento significativo nos níveis de carbonilação em animais com IC. Segundo, o treinamento físico normalizou a carbonilação. Terceiro, o efeito do exercício físico foi completamente abolido pela administração concomitante de AngII.

Embora no músculo sóleo não tenha ocorrido alterações na sinalização atrófica (expressão de atrogenes, proteínas ubiquitinadas e carboniladas), houve um aumento na atividade do proteassoma no grupo ICSD. Não há uma explicação definitiva para esses resultados. Entretanto, é possível inferir que a maior capacidade antioxidante, inerente aos músculos de característica oxidativa, tenha atenuado a sinalização atrófica, mas não a atividade do proteassoma no grupo ICSD. Alternativamente, o aumento na atividade do proteassoma pode ser explicado pela sua associação com o sistema renina angiotensina. Sabe-se que as ações da AngII ocorrem via receptor AT1 e que o comportamento da atividade proteassomal reflete a expressão desse receptor e dos níveis locais de AngII. O presente estudo fortalece essa hipótese. No presente estudo, a AngII, o receptor AT1 e a atividade do proteossoma estavam todos aumentados no músculo sóleo em ratos. E o treinamento físico provocou normalização em todos eles. Além

disso, o efeito do treinamento físico foi verificado em ambos, músculo sóleo e músculo plantar independentemente da administração de AngII.

### **5.3 Limitações**

Nós reconhecemos limitações em nosso estudo. AngII foi infundida apenas nas últimas duas semanas de treinamento físico. Portanto, nós não sabemos se uma infusão mais prolongada de AngII poderia ter outras implicações nos efeitos do treinamento físico na miopatia esquelética na presença de IC. A área de secção transversa do músculo poderia auxiliar na interpretação dos nossos resultados. Também, a AngII modula não só a massa, mas também a capilarização<sup>52</sup> e a homeostase energética<sup>70</sup> do músculo, e não verificamos esses parâmetros.

### **5.4 Perspectivas**

Os nossos achados confirmam a hipótese inicial do estudo de que, ao menos no músculo plantar, os benefícios do treinamento físico na atenuação do SUP dependem da queda da AngII. A modulação dos níveis locais de AngII e a repercussão na miopatia esquelética certamente trazem perspectivas para futuros estudos. O presente estudo fortalece o conceito do treinamento físico como uma conduta não farmacológica na redução dos níveis de AngII e na atenuação da miopatia esquelética na IC.

## 6 CONCLUSÕES

Em modelo isquêmico de IC crônica em ratos, há uma diferença no perfil do SUP no músculo sóleo e no músculo plantar. O treinamento físico reduz a atividade do SUP no músculo plantar. E essa melhora na miopatia esquelética parece depender da redução dos níveis de AngII.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franciosa JA, Park M, Levine TB. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1981; 47:33-9.
2. Kobashigawa JA, Leaf DA, Lee N, Gleeson MP, Liu H, Hamilton MA, et al. A controlled trial of exercise rehabilitation after heart transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340:272-7.
3. Huonker M, Sorichter S, Schmidt-Trucksäss A, Irmer M, Staiger J, Keul J. Effectiveness of digitoxin versus trichlormethiazide/amiloride in congestive heart failure NYHA class II/III and sinus rhythm. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1999; 13:233-41.
4. Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson P a, et al. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 30:1758-64.
5. Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA. Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27:140-5.
6. Lunde PK, Sjaastad I, Schiøtz Thorud HM, Sejersted OM. Skeletal muscle disorders in heart failure. *Acta Physiol. Scand.* 2001; 171:277-94.

7. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85:1751-9.
8. Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L, et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29:1067-73.
9. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 1990; 81:518-27.
10. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 1997; 349:1050-3.
11. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* 2012; 3:163-79.
12. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6:25-39.
13. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002; 82:373-428.

14. Lee D, Goldberg A. Atrogin1/MAFbx: what atrophy, hypertrophy, and cardiac failure have in common. *Circ. Res.* 2011; 109:123-6.
15. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294:1704-8.
16. Kwak KS, Zhou X, Solomon V, Baracos VE, Davis J, Bannion AW, et al. Regulation of protein catabolism by muscle-specific and cytokine-inducible ubiquitin ligase E3alpha-II during cancer cachexia. *Cancer Res.* 2004; 64:8193-8.
17. Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92:367-80.
18. Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol.* 2005; 6:233.
19. Burniston JG, Saini A, Tan L-B, Goldspink DF. Angiotensin II induces apoptosis in vivo in skeletal, as well as cardiac, muscle of the rat. *Exp. Physiol.* 2005; 90:755-61.
20. Russell ST, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. *Cell. Signal.* 2006; 18:1087-96.
21. Eley HL, Tisdale MJ. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:7087-97.

22. Wyke SM, Tisdale MJ. NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Br. J. Cancer* 2005; 92:711-21.
23. Brink M, Price SR, Chrast J, Bailey JL, Anwar a, Mitch WE, et al. Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 2001; 142:1489-96.
24. Brink M, Wellen J, Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* 1996; 97:2509-16.
25. Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013; 45:2322-32.
26. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008; 295:E1417-26.
27. Zhao W, Swanson SA, Ye J, Li X, Shelton JM, Zhang W, et al. Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 2006; 48:637-43.

28. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am. Heart J.* 1998; 135:115-20.
29. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Danieli Betto D, Germinario E, Angelini A, et al. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of Carvedilol. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005; 38:803-7.
30. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:311-8.
31. Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 293:R1159-68.
32. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM-E, Clark SE, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:35137-46.
33. Russell ST, Eley H, Tisdale MJ. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. *Cell. Signal.* 2007; 19:1797-806.
34. Semprun-Prieto LC, Sukhanov S, Yoshida T, Rezk BM, Gonzalez-Villalobos RA, Vaughn C, et al. Angiotensin II induced catabolic effect and

muscle atrophy are redox dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 409:217-21.

35. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004; 119: 285-98.

36. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle* 2011; 1:1-4.

37. Song Y, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II – induced skeletal muscle wasting. 2005; 115:451-8.

38. Rezk BM, Yoshida T, Semprun-Prieto L, Higashi Y, Sukhanov S, Delafontaine P. Angiotensin II infusion induces marked diaphragmatic skeletal muscle atrophy. *PLoS One* 2012; 7:e30276.

39. Satchek JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004; 287:E591-601.

40. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004 30; 117:399-412.

41. Godard MP, Whitman SA, Song Y-H, Delafontaine P. Skeletal muscle molecular alterations precede whole-muscle dysfunction in NYHA Class II heart failure patients. *Clin. Interv. Aging* 2012; 7:489-97.
42. Anker SD, Negassa A, Coats AJS, Afzal R, Poole-Wilson P a, Cohn JN, et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 2003; 361:1077-83.
43. Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, Sandri M, Ceconi C, Lorusso R, et al. Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart* 2000; 84:431-7.
44. Liu JL, Irvine S, Reid IA, Patel KP, Zucker IH. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: A role for angiotensin II. *Circulation* 2000; 102:1854-62.
45. Mousa TM, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J. Appl. Physiol.* 2008; 5850:616-24.
46. Bacurau AVN, Jardim MA, Ferreira JCB, Bechara LRG, Bueno CR, Alba-Loureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J. Appl. Physiol.* 2009; 106:1631-40.

47. Cunha TF, Bacurau AVN, Moreira JBN, Paixão N a, Campos JC, Ferreira JCB, et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One* 2012; 7:e41701.
48. Gielen S, Sandri M, Kozarez I, Kratzsch J, Teupser D, Thiery J, et al. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. *Circulation* 2012; 125:2716-27.
49. Al-Merani SA, Brooks DP, Chapman BJ, Munday KA O. The half-lives of angiotensin II, angiotensin II-amide, angiotensin III, Sar1,-Ala8-angiotensin II and renin in the circulatory system of the rat. *J. Physiol.* 1978 Dec;278:471-90.
50. Boyd GW, Landon J, Peart WS. Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man. *Lancet* 1967; 290:1002-5.
51. Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, et al. Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302:H1202-10.
52. Amaral SL, Papanek PE, Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281:H1163-9.

53. Saltin B, Kiens B, Savard G, Pedersen PK. Role of hemoglobin and capillarization for oxygen delivery and extraction in muscular exercise. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1986; 556:21-32.
54. Yoshida T, Semprun-Prieto L, Sukhanov S, Delafontaine P. IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt- and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogen-1 expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298:H1565-70.
55. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001; 104:346-51.
56. Anker SD, Coats AJ. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 1999; 115:836-47.
57. Roig E, Perez-Villa F, Morales M, Jiménez W, Orús J, Heras M, et al. Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur. Heart J.* 2000; 21:53-7.
58. Delafontaine P, Akao M. Angiotensin II as candidate of cardiac cachexia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2006; 9:220-4.
59. Cabello-Verrugio C, Córdova G, Salas JD. Angiotensin II: role in skeletal muscle atrophy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012; 13:560-9.

60. Van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension* 1997; 30:42-9.
61. Höllriegel R, Beck EB, Linke A, Adams V, Möbius-Winkler S, Mangner N, et al. Anabolic effects of exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb): impact on ubiquitin-protein ligases expression and skeletal muscle size. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167:975-80.
62. Moreira JBN, Bechara LRG, Bozi LHM, Jannig PR, Monteiro AWA, Dourado PM, et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J. Appl. Physiol.* 2013; 114:1029-41.
63. Hershko A, Heller H. Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 128:1079-86.
64. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004; 18:39-51.
65. Yu Z, Li P, Zhang M, Hannink M, Stamler JS, Yan Z. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *PLoS One* 2008; 3:e2086.

66. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 12:393-404.
67. Dudek EJ, Shang F, Valverde P, Liu Q, Hobbs M, Taylor A. Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases. *FASEB J.* 2005; 19:1707-9.
68. Vescovo G, Ravara B, Dalla Libera L. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 2008; 103:285-90.
69. Wong CM, Cheema AK, Zhang L, Suzuki YJ. Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling. *Circ. Res.* 2008; 310-8.
70. Kackstein K, Teren A, Matsumoto Y, Mangner N, Möbius-Winkler S, Linke A, et al. Impact of angiotensin II on skeletal muscle metabolism and function in mice: contribution of IGF-1, Sirtuin-1 and PGC-1 $\alpha$ . *Acta Histochem.* 2013; 115:363-70.