

Miguel Morita Fernandes da Silva

**Marcadores genéticos e inflamatórios na
insuficiência cardíaca: o impacto do exercício físico**

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. Fernando Bacal

SÃO PAULO

2015

Miguel Morita Fernandes da Silva

**Marcadores genéticos e inflamatórios na
insuficiência cardíaca: o impacto do exercício físico**

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. Fernando Bacal

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Miguel Morita Fernandes da

Marcadores genéticos e inflamatórios na insuficiência cardíaca : o impacto do exercício físico / Miguel Morita Fernandes da Silva. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Fernando Bacal.

Descritores: 1.Exercício 2.Inflamação 3.Interleucina-6 4.Fator de necrose tumoral alfa 5.Galectina 3 6.Adiponectina 7.MicroRNAs 8.Insuficiência cardíaca 9.Tolerância ao exercício

USP/FM/DBD-458/15

Dedicatória

*A meus pais, **Silvio e Keiko**, cujo modo de ser, viver e ver o mundo serão sempre
minha inspiração.*

*Aos meus irmãos **Fernando e Adriano**, que sempre me ajudaram e tornaram tudo
tão mais fácil.*

*A **Clara e Betina**, que me ensinam a cada dia o quão fascinante é uma descoberta.*

*A minha **Renata**, com quem compartilho cada pedaço desta estrada.*

Agradecimientos

Aos **pacientes** que, em um gesto altruísta, contribuíram para melhorar o conhecimento médico, esperando reduzir o sofrimento alheio.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fernando Bacal**, que acreditou em mim e abriu as portas para um novo mundo.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Guilherme Veiga Guimarães**, por todo auxílio, suporte e ensinamentos, que tornaram possível a realização deste projeto.

Aos colegas **Vagner Carvalho, Lais Cruz, Rafael Castro, Aline e Jean Roque** por toda a dedicação e engajamento que foram determinantes neste estudo.

Aos amigos **Lara, Carmen, Badu, Francisco, Maria do Rocio e Rafael**, pelo suporte incondicional a tantas idas e vindas, sem o qual este trabalho jamais teria se realizado.

Aos cardiologistas **Sandrigo Mangini, Fabiana Marcondes Braga, Luis Seguro, Monica Avila, Jefferson Vieira, Bruno Biseli e Marco Alves** pelo apoio e companheirismo.

Aos **Profs. Drs. Edimar Bocchi, Silvia Ayub, Paulo Chizzola, Victor Issa e Germano Souza** pelo acolhimento e apoio.

Às funcionárias **Ciça, Lourdes, Fatima e Sara** do Núcleo de Insuficiência Cardíaca e a **Fatima** do Núcleo de Transplante pelo suporte especial nos momentos que eu mais precisava.

Aos amigos **Odilson Silvestre e Wilson Nadruz**, pelos conselhos e parceria inigualáveis.

Aos **Prof. Drs. Protasio Lemos da Luz, Jose Rocha Faria, Lídia Zytynski e Marcio Sommer** por terem me ajudado a seguir um novo caminho.

Ao **Prof. Dr. Romeu Meneghelo**, por todos seus ensinamentos na medicina, na ciência e na vida.

Aos **Prof. Dr. Jose Eduardo Krieger, Alexandre Pereira e a Noeli** pela ajuda com o armazenamento das amostras.

Aos **Prof. Dr. Edécio Cunha e Ludmila** pelo auxílio na avaliação dos microRNAs.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, **Profa. Dra. Ludhmila Abrahão Hajjar, Prof. Dr. Félix Ramires e Prof. Dr. Fabio Fernandes** pelas sugestões que contribuíram para a finalização desta tese.

À **Comissão de Pós-graduação e a Neusa Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Tatiane Lago** pela competência e profissionalismo ao fazerem parte de minha jornada e de tantos outros.

À **Comissão Científica**, especialmente ao **Marcio**, pelo auxílio em etapas críticas do projeto que foram fundamentais para sua concretização e por todo estímulo que proporcionam a pesquisa.

A todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente e que pelo acaso não foram mencionados aqui, sintam-se também agradecidos.

À **Fundação do Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão do auxílio à pesquisa e apoio financeiro neste projeto.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pela concessão da bolsa de doutorado, garantindo tempo protegido para a realização desse projeto.

Epígrafe

*“Você pode nunca saber que
resultados virão de suas ações,
mas se não fizer nada, não existirão resultados.”*

- Gandhi

Normalização adotada

Esta 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

Sumário

Lista de Abreviaturas	15
Lista de Símbolos	18
Lista de Tabelas.....	20
Lista de Figuras	22
Resumo.....	24
Abstract	27
1. Introdução.....	30
1.1 Justificativa.....	32
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivos primários.....	34
2.2 Objetivo secundário	34
3. Material e Métodos.....	36
3.1 População.....	36
3.2 Dinâmica do estudo	37
3.3 Randomização e alocação	37
3.4 Teste de esforço cardiopulmonar.....	37
3.5 Avaliação de atividade física na vida diária.....	39
3.6 Avaliação da qualidade de vida	40
3.7 Dosagens sanguíneas.....	40
3.8. Programa de exercício supervisionado	44
3.9. Análise estatística	45
4. Resultados.....	48
4.1. Características da amostra.....	48
4.2. Teste de esforço cardiopulmonar	51
4.3. Biomarcadores inflamatórios	53
4.4. MicroRNAs.....	54

4.5. Qualidade de vida	55
4.6. Preditores de resposta ao treinamento físico	56
5. Discussão	60
5.1. Efeitos do exercício nos biomarcadores inflamatórios.....	60
5.2. Efeito do exercício na qualidade de vida	61
5.3. MicroRNAs.....	62
5.4. Preditores de resposta ao exercício.....	64
5.5. Limitações	65
6. Conclusões	68
7. Anexos	70
7.1. Anexo I.....	70
7.2. Anexo II.....	74
8. Referências.....	76

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AFVD	Atividade física na vida diária
ANOVA	Análise de variância
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
BRA	Bloqueador do receptor da angiotensina II
CAC	Células angiogênicas circulantes
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Carga LA	Carga no limiar anaeróbico
CMD	Concentração mínima detectável
cq	<i>quantification cycle</i>
CV	Coefficiente de variação
$\Delta VO_2/\Delta Carga$	Inclinação da relação do consumo de oxigênio pela carga durante o exercício
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GEA	Gasto energético durante a atividade
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HF-ACTION	<i>Heart Failure: A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training</i>
IC	Insuficiência cardíaca
IECA	Inibidor de enzima conversora de angiotensina
IL-6	Interleucina 6
IM	Intensidade do movimento durante a caminhada
IMC	Índice de massa corpórea
InCor	Instituto do Coração
LA	Limiar anaeróbico
Log-IL-6	Interleucina-6 após conversão logarítmica
MAP	<i>Multi-analyte panels</i>
MLWHF	<i>Minnesota Living With Heart Failure</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>

PA	Pressão arterial
PE	Ficoeritrina
PET CO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PET O ₂	Pressão parcial de oxigênio no final da expiração
Pulso O ₂	Pulso de oxigênio
PCR	Reação em cadeia polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RER	Razão de trocas respiratórias
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
TECP	Teste de esforço cardiopulmonar
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
VCO ₂	Produção de dióxido de carbono
VE	Ventilação
VE-VCO ₂ <i>slope</i>	Inclinação da relação da ventilação pela produção dióxido de carbono durante o exercício
VE/ VO ₂	Equivalente ventilatório de oxigênio
VO ₂	Consumo de oxigênio
VO ₂ LA	Consumo de oxigênio no limiar anaeróbico
VO ₂ pico	Consumo pico de oxigênio
VP	Ventilação periódica

Lista de símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

bpm	batimentos por minuto
β	beta
g	gravidade; refere-se a aceleração devido a gravidade da Terra
Kcal	quilocalorias
min	minutos
mcg.mL ⁻¹	microgramas por mililitro
mg.dL ⁻¹	miligramas por decilitro
mL	mililitros
mL.bat ⁻¹	mililitros por batimento
mL.min ⁻¹	mililitros por minuto
mL.min ⁻¹ .W ⁻¹	mililitros por minuto por Watt
mL. kg ⁻¹ .min ⁻¹	mililitros por quilograma por minuto
ng.mL ⁻¹	nanogramas por mililitro
<i>p</i>	valor-p
pg.mL ⁻¹	picogramas por mililitro
Kg.m ⁻²	quilogramas por metro quadrado
s	segundos
W	Watts
W.min ⁻¹	Watts por minuto
μ L	microlitros
°C	graus Celsius
\pm	mais ou menos
<	menor
\leq	menor ou igual
%	porcento

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características basais dos participantes	50
Tabela 2: Resultados do teste de esforço cardiopulmonar conforme o grupo	52
Tabela 3: Escore de qualidade de vida de acordo com o questionário <i>Minnesota Living With Heart Failure</i>	55
Tabela 4: Associação entre as características basais e a mudança do consumo pico de oxigênio com exercício (n=26)	57
Tabela 5: Análise de regressão multivariada predizendo a mudança do consumo pico de oxigênio com exercício (n=26).....	58

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma dos pacientes no estudo.....	49
Figura 2: Níveis séricos de interleucina-6 após conversão (A), fator de necrose tumoral-alfa (B), adiponectina (C) e galectina-3 (D) antes e depois da intervenção de acordo com o grupo alocado	53
Figura 3: Mudança nos níveis séricos dos microRNAs miR-423-5p (A), miR-155 (B) e miR-221 (C) de acordo com intervenção realizada de acordo com o grupo alocado.	54

Resumo

RESUMO

FERNANDES MMF, *Marcadores genéticos e inflamatórios na insuficiência cardíaca: o impacto do exercício físico* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O exercício físico pode reverter o prejuízo funcional causado pela insuficiência cardíaca (IC). No entanto, os mecanismos implicados na melhora funcional e o efeito do exercício em outros biomarcadores de gravidade, incluindo microRNAs e marcadores de inflamação, são apenas parcialmente compreendidos. **Objetivos:** Avaliar o efeito do exercício nos níveis séricos da adiponectina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), galectina-3, microRNAs miR-423-5p, -221 e -155 em pacientes com IC. Analisar a associação entre estes biomarcadores e a melhora da capacidade funcional após 12 semanas de exercício em pacientes com IC. **Métodos:** Foram incluídos pacientes com IC, FEVE $\leq 40\%$, terapia clínica otimizada e randomizados em três grupos: exercício intervalado, exercício contínuo ou controle. Foi realizado teste de esforço cardiopulmonar (TECP) e dosados os níveis séricos de adiponectina, IL-6, TNF-alfa, galectina-3, microRNAs miR-423-5p, -221 e -155 antes e após a intervenção, com duração de 12 semanas. **Resultados:** Quarenta pacientes, 49 ± 7 anos, 53% homens, FEVE $30 \pm 6\%$, 25% com cardiopatia isquêmica foram incluídos na análise (intervalado-12, contínuo-14, controle-14). O exercício, especialmente intervalado, aumentou o tempo de tolerância ao esforço no TECP em relação ao grupo controle (intervalado - 13 ± 3 min vs contínuo - 12 ± 3 min vs controle - 11 ± 2 min, $p = 0,034$), mas não teve efeito no VO_2 pico. Ambas modalidades de exercício, intervalado e contínuo, tiveram efeito neutro em todos os biomarcadores séricos dosados, incluindo os microRNAs. Os parâmetros basais associados com mudança na capacidade funcional foram o tempo de tolerância ao esforço no TECP e o nível sérico de IL-6. Na análise multivariada, somente o nível sérico de IL-6 (após conversão logarítmica) foi significativamente associado com mudança no VO_2 pico com o exercício [Coeficiente $\beta = -0,35 \pm 0,11$, $p = 0,005$]. **Conclusões:** Doze semanas de exercício aeróbico, tanto intervalado como contínuo, tiveram efeito neutro em biomarcadores de inflamação e fibrose e nos níveis circulantes dos microRNAs miR-423-5p, -221 e -155 em

pacientes com IC. Além disso, níveis séricos elevados de IL-6 foram independente associados a ausência de resposta ao treinamento físico.

Descritores: exercício, inflamação, interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa, galectina 3, adiponectina, MicroRNAs, insuficiência cardíaca, tolerância ao exercício.

Abstract

ABSTRACT

SILVA MMF, *Genetic and inflammatory markers in heart failure: the impact of exercise training* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Background: Exercise training can revert the functional impairment caused by heart failure (HF). Nevertheless, the mechanisms underlying the improvement in functional capacity and the effect of the exercise on other biomarkers of severity, including microRNAs and inflammatory biomarkers, are only partially understood. **Aims:** To evaluate the effect of exercise on serum levels of adiponectin, interleucina-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), galectina-3, microRNAs miR-423-5p, -221 and -155 in patients with HF. To assess the association between these biomarkers and improvement in functional capacity after 12 weeks of exercise in patients with HF. **Methods:** We included patients with HF, LVEF \leq 40%, under optimized clinical therapy, and randomized into three groups: interval exercise, continuous exercise and control. We performed cardiopulmonary exercise testing (CPET) and determined the serum levels of adiponectin, IL-6, TNF-alpha, galectina-3, microRNAs miR-423-5p, -221 and -155 before and after the intervention, which lasted 12 weeks. **Results:** Forty patients, 49 ± 7 years old, 53% men, LVEF $30 \pm 6\%$, 25% with ischemic cardiomyopathy were included in the analysis (interval-12, continuous-14, control-14). The exercise, particularly the interval training, increased the CPET exercise time, when compared with the control group (interval - 13 ± 3 min vs continuous - 12 ± 3 min vs control - 11 ± 2 min, $p = 0.034$), but had no effect on peak VO_2 . Both modalities of exercise, interval and continuous, had neutral effect on all analyzed serum biomarkers, including the microRNAs. Baseline parameters associated with change in functional capacity with exercise were CPET exercise time and IL-6 serum level. In multivariate analysis, only IL-6 serum level (log-transformed) was significantly associated with modification in peak VO_2 with exercise [β coefficient = -0.35 ± 0.11 , $p = 0.005$].

Conclusions: Twelve weeks of aerobic exercise, both interval and continuous, had neutral effect on the serum biomarkers of inflammation and fibrosis and the circulant microRNAs miR-423-5p, -221 e -155 in patients with HF. Besides, increased IL-6 serum levels at baseline were independently associated with lack of response to exercise training.

Descriptors: exercise, inflammation, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, galectin 3, adiponectin, MicroRNAs, heart failure, exercise tolerance.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa que envolve o sistema cardiovascular, neuroendócrino, musculoesquelético e imune,^{1,2} e resulta em intolerância ao esforço. Embora tenha havido avanços no tratamento, muitos pacientes ainda persistem com estes sintomas e evoluem com morte precoce.³

O exercício físico pode reverter parte do prejuízo funcional causado pela IC⁴, resultando em melhor qualidade de vida.⁵ Além disso, a melhora da capacidade funcional com exercício está associada a maior sobrevida nestes pacientes. Foi demonstrado que um aumento em 6% no consumo pico de oxigênio (VO₂ pico) com o treinamento físico é preditor independente de melhor sobrevida na IC.⁶

Há diversos mecanismos implicados na melhora funcional, como alterações na função endotelial, na função autonômica, na função cardíaca e na expressão genética. Com relação a este último, o exercício pode modificar a expressão do ácido ribonucleico (RNA) mensageiro através de silenciamento gênico por microRNAs, uma variedade de RNA não codificador de proteína. Os microRNAs se ligam ao RNA mensageiro (RNAm)-alvo, causando sua degradação ou inibindo sua codificação proteica.⁷

Diversos microRNAs são secretados normalmente na circulação, e podem variar em resposta a injúria ou outras condições patológicas.⁸ Estes microRNAs circulantes são especialmente relevantes porque sua liberação no plasma não reflete apenas a eliminação do conteúdo celular causado por lesão inespecífica, mas representa um mecanismo chave pelo qual diversas funções celulares são moduladas em resposta ao estresse tecidual.⁹

Em indivíduos saudáveis, o exercício pode modificar os níveis de microRNAs circulantes, sendo potenciais mediadores fisiológicos da adaptação cardiovascular induzida pelo exercício.^{10,11} Em pacientes com IC, alguns microRNAs circulantes tem sua expressão aumentada em comparação com controles saudáveis. O microRNA miR-423-5p está elevado no plasma destes pacientes, sendo um candidato atrativo na investigação diagnóstica de IC.¹² Além disso, os níveis plasmáticos do miR-423-5p podem indicar

gravidade já que se associaram positivamente com o peptídeo natriurético tipo B (BNP) e com a classe funcional.^{12,13} Enquanto os microRNAs circulantes vem sendo estudados como potenciais biomarcadores de IC, não há dados que o exercício possa modificar sua expressão, fazendo retornar a níveis mais próximos dos indivíduos saudáveis.

A inflamação também pode estar implicada na resposta ao treinamento físico na IC, já que ela tem um papel importante na fisiopatologia e progressão da doença.¹⁴⁻¹⁷ Os níveis plasmáticos de citocinas pro-inflamatórias estão diretamente associados com a classe funcional, e a ativação imune parece contribuir para este prejuízo funcional.^{18,19} O efeito do exercício físico na inflamação é ainda pouco compreendido. Estudos mostraram que o exercício físico agudo aumenta os níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e da interleucina-6 (IL-6).²⁰ Por outro lado, as consequências a longo prazo de um programa de exercício físico (exercício físico crônico) são variadas, podendo manter ou até reduzir seus níveis circulantes.^{21,22} Recentemente, foi demonstrado que o treinamento físico também reduz a adiponectina,²³ hormônio secretado pelo tecido adiposo que está envolvido na inflamação e associado a pior prognóstico na IC.²⁴

Outro biomarcador que pode ajudar a compreender os mecanismos de resposta ao treinamento de pacientes com IC é a galectina-3, uma lectina ligada a β -galactosídeo envolvida no desenvolvimento da fibrose cardíaca.²⁵ Além de ser marcador prognóstico,²⁶⁻²⁹ a galectina-3 parece predizer resposta a algumas modalidades de tratamento na IC.^{30,31} Em uma análise do estudo “*Heart Failure: A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training*” (HF-ACTION),³² os pacientes que apresentaram o maior aumento no VO₂ pico foram aqueles com menores níveis basais de galectina-3.

Tradicionalmente, o método utilizado para prescrição de exercício aeróbico para pacientes com IC, é de intensidade moderada com carga constante, ou seja, o treinamento contínuo. Alternativamente, o treinamento intervalado, que consiste em alternar a intensidade da carga em moderada e alta, tem sido demonstrada como método efetivo, seguro e bem tolerado em pacientes com IC.^{33,34} As repercussões de diferentes modalidades e intensidades de exercício nos níveis sanguíneos nos biomarcadores de fibrose e inflamação são ainda indefinidas.

Haveria algum marcador específico que identifica pacientes que podem responder ao exercício? O VO_2 pico está associado a mortalidade não apenas quando medido isoladamente, mas a melhora com exercício indica maior sobrevida.⁶ Portanto, a identificação de biomarcadores que predizem a melhora do VO_2 pico pode ajudar a encontrar subgrupos que potencialmente se beneficiam com o exercício, com aumento na sobrevida. Com isto, futuros estudos nesta área podem testar se o treinamento físico direcionado a estes subgrupos pode ser mais eficaz.

Além disso, o exercício físico, um movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo executado com uma finalidade específica, pode ter um efeito ainda maior naqueles pacientes com maior restrição física no dia a dia. A atividade física na vida diária (AFVD), independentemente da realização formal de exercício, é fator prognóstico na IC.³⁵ O treinamento físico na IC objetiva interromper um ciclo vicioso: o sintoma desencadeado pelo esforço leva a uma redução da AFVD, a qual resulta em menor tolerância ao esforço. Se seu impacto seria maior naqueles pacientes com menor AFVD, ainda é uma questão em aberto.

1.1 Justificativa

A evidência mais recente indica que o exercício físico não tem impacto na sobrevida de pacientes com IC. Enquanto os estudos com poder para avaliar mortalidade aplicaram exercício de moderada intensidade no modo contínuo, o exercício intervalado tem se mostrado promissor por trazer benefício superior em alguns desfechos substitutos como a capacidade funcional.³³ O estudo do efeito de diferentes modalidades de exercício em biomarcadores inflamatórios e microRNAs, associados com a gravidade da doença, é relevante como precursor de grandes ensaios clínicos randomizados com poder para avaliar o impacto do exercício intervalado na sobrevida de pacientes com IC.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

Avaliar o efeito do exercício nos níveis séricos do TNF-alfa, da IL-6, da galectina-3, da adiponectina e dos microRNAs circulantes miR-155, miR-221 e miR-423-5p em pacientes com IC.

Avaliar a associação entre estes biomarcadores e a melhora da capacidade funcional após 12 semanas de exercício em pacientes com IC.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar o efeito do exercício intervalado e contínuo na qualidade de vida relacionada a IC.

Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População

Este estudo foi aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2011/00640-4 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) protocolo número 0157/10.

Os participantes do estudo foram selecionados a partir do ambulatório de IC do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre maio de 2011 e abril de 2013. Nós incluímos pacientes com diagnóstico de IC estágio C, fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) menor ou igual a 40%, idade entre 30 e 60 anos e sob terapia clínica otimizada por um mínimo de seis semanas. A função ventricular foi obtida em ecocardiograma transtorácico até 12 meses prévios a inclusão.

Os critérios de exclusão foram asma brônquica ou doença pulmonar obstrutiva crônica em uso de corticóide e/ou β -agonista inalatórios, IC classe funcional IV (*New York Heart Association* - NYHA), fibrilação atrial, arritmia ventricular complexa, portadores de marca-passo ou cardioversor/desfibrilador implantável, insuficiência renal crônica (creatinina maior que 2,5 mg.dL⁻¹), insuficiência arterial periférica crônica, obesidade grau III, cirrose hepática, uso de drogas ilícitas, etilismo atual, prática regular de exercícios físicos, limitação física ou cognitiva para realizar exercícios, razão de trocas respiratórias (RER) pico menor que 1,00, procedimento invasivo programado, participação em outro estudo ou má adesão persistente ao tratamento. Durante o estudo, aqueles que não comparecessem por mais de 5 aulas consecutivas ou não cumprissem um mínimo de 70% do total de sessões previstas foram excluídos da análise final.

3.2 Dinâmica do estudo

Os pacientes elegíveis eram abordados pelo médico assistente, que perguntava se eles estariam interessados em participar de um estudo envolvendo treinamento físico. O investigador explicava todos os procedimentos, riscos, benefícios do estudo e que sua participação era voluntária. Subsequentemente, o paciente lia o termo de consentimento livre e esclarecido e, quando de acordo, fornecia o consentimento escrito (Anexo I).

Em seguida, era realizada uma avaliação inicial para registro das características clínicas basais, incluindo medicações em uso, classe funcional e função ventricular. Os pacientes também preenchiam o questionário de qualidade de vida *Minnesota Living With Heart Failure* (MLWHF). Subsequentemente, eles eram submetidos a coleta de sangue, a medida da AFVD e ao teste de esforço cardiopulmonar. Após uma revisão dos critérios de inclusão e exclusão, os participantes eram randomizados em três grupos: grupo intervalado, grupo contínuo e grupo controle. Após 3 meses de intervenção, os pacientes foram reavaliados e submetidos aos mesmos procedimentos prévios a randomização.

3.3 Randomização e alocação

Foi realizada randomização simples, utilizando-se envelopes em um saco plástico. Cada envelope, selado e opaco, continha o nome de um dos três grupos. Após cada alocação, o respectivo envelope era devolvido antes da próxima randomização, de forma que cada paciente tivesse a mesma chance de ser selecionado a um dos 3 grupos.

3.4 Teste de esforço cardiopulmonar

Os pacientes foram submetidos a teste de esforço cardiopulmonar (TECP) em cicloergômetro programável (*Union*, Brasil), utilizando protocolo em rampa em ambiente com temperatura controlada (21°C a 23°C). O incremento da carga a uma razão de 5, 10 ou 15 W.min⁻¹ foi individualizado a partir da impressão clínica no TECP pré-intervenção e

repetida no TECP pós-intervenção. Os pacientes foram orientados a realizar uma refeição leve pelo menos duas horas antes e a evitar o consumo de bebidas contendo cafeína no dia do exame.

Após dois minutos em repouso, em posição sentada, os pacientes foram encorajados a realizar exercício progressivo até limitação por sintomas. O ritmo cardíaco foi monitorizado por sistema de 12 derivações (Marquette series 2000, Marquette Electronics, Milwaukee, WI, EUA). A ventilação (VE), as concentrações de oxigênio e de dióxido de carbono foram medidas respiração à respiração (SensorMedics, modelo Vmax 229, Yorba linda, CA, EUA). A pressão arterial foi monitorizada pelo monitor multiparamétrico HP68S (Hewlett-Packard, EUA), empregando transdutor oscilométrico de pressão arterial HP M1008B (Hewlett-Packard, EUA). Os critérios de interrupção do esforço foram as mesmas descritas nas diretrizes brasileiras de teste ergométrico.³⁶

O limiar anaeróbico (LA) foi determinado pelo métodos ventilatório e *V-slope*. O método ventilatório utiliza o menor valor do equivalente ventilatório de oxigênio (VE/VO_2), acompanhado do menor valor da pressão parcial de oxigênio no final da expiração (PET O₂). O *V-slope* utiliza o ponto de inflexão causado pela perda de linearidade da curva da produção de dióxido de carbono (VCO₂) pelo consumo de oxigênio (VO₂). O LA foi definido pela concordância em pelo menos duas das três variáveis (VE/VO_2 , PET O₂ e *V-slope*). O ponto de compensação respiratória foi definido pelo menor valor do equivalente ventilatório do dióxido de carbono (VE/VCO_2) acompanhado do maior valor da pressão parcial de dióxido de carbono (PET CO₂). O VO₂ pico foi o maior valor atingido ao final do período de exercício. Os dados foram tabulados em média de 30 segundos. O VO₂ máximo predito foi calculado a partir da idade, sexo, peso e altura segundo Wasserman et al.³⁷ Os valores do VO₂ pico são apresentados em mL.kg⁻¹.min⁻¹ e em % do máximo predito.

O VE-VCO₂ *slope* foi determinado a partir da relação da VE pela VCO₂ durante todo o período de exercício, como descrito previamente.³⁸ A relação do VO₂ pela carga ($\Delta VO_2/\Delta Carga$) foi obtida de modo semelhante, utilizando-se o fator multiplicativo da equação de regressão linear entre VO₂ (mL.min⁻¹) e carga (Watts-W) e expressa em

$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{W}^{-1}$. O pulso de oxigênio (pulso O_2) foi calculado pela divisão do VO_2 ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) pela frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm).

A presença de ventilação periódica foi determinada conforme Leite et al.³⁹ 1) três ou mais oscilações regulares (claramente discerníveis de artefato dos dados); 2) regularidade, dada pelo desvio padrão da duração de três ciclos consecutivos (tempo entre o nadir de dois ciclos) dentro de 20% da média, 3) amplitude média mínima da oscilação na VE de 5 litros (valor pico menos o ponto médio entre o nadir dos dois ciclos adjacentes).

3.5 Avaliação de atividade física na vida diária

A AFVD foi avaliada a partir de acelerômetro triaxial digital *Dynaport MoveMonitor* (McRoberts, Holanda), validado previamente.⁴⁰ Este dispositivo mede 85 x 58 x 11,5 mm, pesa 55 gramas e possui uma bateria de lítio que permite medir até sete dias consecutivos. Ele possui três sensores sísmicos dispostos ortogonalmente (anteroposterior, lateral-medial e longitudinal) com uma escala adaptável de ± 2 g (resolução de 0,001 g) ou ± 6 g (resolução de 0,003 g). Os dados obtidos eram armazenados em um cartão de memória microSD e enviados para <http://www.mcroberts.nl>, do qual retornavam em um arquivo .csv e em dois relatórios: atividade física e gasto energético.

O procedimento decorria da seguinte maneira: inicialmente, o dispositivo era programado para iniciar a medida no período da manhã (entre 8:00 e 11:00) com duração de 24 horas. O acelerômetro era posicionado na região lombar, aproximadamente na altura de L2, e fixo com uma cinta de velcro. Todos os pacientes foram orientados a retirar o dispositivo apenas para o banho e a manter suas atividades habituais durante a medida.

Foram registrados o número de passos por dia, o tempo gasto em minutos e a intensidade do movimento (IM) em g ($1 \text{ g} = 9,82 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$) durante a caminhada, o tempo sedentário (%) e o gasto energético durante a atividade (GEA). O tempo sedentário se refere ao percentual de tempo em que o indivíduo permanece sentado ou deitado durante

um dia. O GEA foi estimado à partir da IM em cada categoria por método previamente validado.^{41,42}

3.6 Avaliação da qualidade de vida

A qualidade de vida relacionada a saúde foi avaliada através de questionário específico para pacientes com IC, o questionário MLWHF (anexo II), na versão traduzida para o português, previamente validada.^{43,44} O questionário contém 21 questões e o paciente devia responder o quanto a IC impediu que vivesse da maneira como gostaria durante as quatro semanas anteriores. Os pacientes respondiam em uma escala de 0 a 5, onde 0 indicava que não impediu ou não se aplica e 5 indicava que impediu muitíssimo. A somatória simples das 21 respostas formavam o escore total, com maiores valores indicando pior a qualidade de vida. Adicionalmente, um subgrupo de questões correspondia a um escore de dimensão física (itens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13), por estarem relacionadas a sintomas como dispnéia e fadiga, e outro subgrupo a um escore de dimensão emocional (itens 17, 18, 19, 20, 21).

3.7 Dosagens sanguíneas

3.7.1 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram obtidas através de venopunção após 20 minutos de repouso e jejum de 8 horas. Todos foram orientados a não realizar exercícios 24 horas antes. O sangue periférico foi coletado em três tubos de 3 mL: dois deles sem anticoagulante e o outro contendo *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Em seguida, foram submetidos à centrifugação sob força de 2000 g a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante (plasma ou soro) foi transferido para microtubos *RNase/DNase-free* de 1,5mL e armazenado em freezer -70°C até o momento das análises.

3.7.2 Biomarcadores inflamatórios

Após todos os pacientes completarem o estudo, foram determinados os níveis séricos do TNF-alfa, da IL-6, da adiponectina e da galectina-3 através de kits *Milliplex® MAP (multi-analyte panels)* usando tecnologia *Luminex™ xMAP (EMD Millipore Corporation, Alemanha)*.

O princípio da tecnologia *Luminex™ xMAP* utiliza um processo que envolve microesferas, fundamentado na técnica de imunoensaio. Cada uma destas microesferas é coberta com um anticorpo específico e pode ser identificada através de um código de cores. Após o analito (biomarcador) ser capturado pelos anticorpos localizados na superfície das microesferas, um anticorpo de detecção biotilado é introduzido ligado a uma molécula de reporte - a ficoeritrina (PE). Processadores de sinal digital de alta velocidade identificam cada microesfera e fazem a leitura baseado no sinal fluorescente da PE.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante por um laboratório externo (Genese Produtos Diagnósticos LTDA), que não tinha conhecimento a que grupo o paciente foi alocado. Kits específicos para cada análise foram usados: *Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead panel 3 kit (HCCBP3MAG-58K)* para galectina-3 [concentração mínima detectável (CMD) = 0,005 ng.mL⁻¹, coeficiente de variação intra-ensaio (CV intra-ensaio) = 5%, CV inter-ensaio = 13%]; *Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 kit (HADK2MAG-61K)* para IL-6 [CMD = 0,2 pg.mL⁻¹, CV intra-ensaio = 1%, CV inter-ensaio = 10%] e para TNF-alfa [CMD = 0,3 pg.mL⁻¹, CV intra-ensaio = 3%, CV inter-ensaio = 19%]; *Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 kit (HADK1MAG-61K)* para adiponectina [CMD = 11 pg.mL⁻¹, CV intra-ensaio = 2%, CV inter-ensaio = 10%]. Os resultados foram calculados, usando o *MagPix - Software xPonent/Analyst* versão 4.2.

3.7.3 MicroRNAs

3.7.3.1 Seleção dos MicroRNAs

Nós selecionamos três microRNAs circulantes baseado em sua relevância como biomarcador na IC, resposta ao exercício ou que estivessem implicados em processos celulares adaptativos ao exercício. Desta maneira, nós escolhemos os microRNAs miR-423-5p, apontado como potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico da IC,^{12,13} o miR-221, envolvido na angiogênese,^{45,46} e que aumenta com treinamento físico em indivíduos saudáveis;¹⁰ e o miR-155, implicado na inflamação⁴⁷ e no sistema renina-angiotensina.⁴⁸

3.7.3.2 Extração de RNA

Após retiradas do freezer -70°C , as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente e submetidas a extração de RNA extracelular por meio do kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 1 mL da solução QIAzol foi adicionado à 0,2 mL de plasma sanguíneo, sendo em seguida homogeneizado vigorosamente em vortex por 15s e incubado por 05 min a temperatura ambiente para promover a dissociação dos complexos nucleoproteicos. Após incubação, 3 μL do miR-39 sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39; QIAGEN) na concentração de $1,6 \times 10^8 / \mu\text{L}$ foram adicionados como controle “spike-in” para eficiência da purificação. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Merck, Alemanha) e homogeneizado vigorosamente por 30s seguido por 5 min de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à centrifugação sob força de 14.000 g a 4°C por 20 min para a separação das fases aquosa (acima) e orgânica (abaixo). A fase aquosa foi então transferida para outro microtubo de 1,5mL onde foi adicionado 1,5 volumes de etanol 100% (Merck, Alemanha) para a precipitação do RNA total. A purificação do RNA total extraído foi realizado por meio das colunas providas pelo kit *miRNeasy Serum/Plasma*. O RNA final foi eluído das colunas em 14 μL de água *RNase-free* também provido pelo kit.

3.7.3.3 Reação de transcrição reversa

Para a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), passível de analisar apenas moléculas de DNA, as amostras de RNA extraídas foram convertidas em DNA complementar (cDNA) por meio da reação de transcrição reversa. Para este propósito foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Life Technologies, USA) combinado com oligonucleotídeos específicos para cada microRNA (miR-155, miR-221 e miR-423-5p providos pelo kit *TaqMan® MicroRNA Assays - Life Technologies, USA*). Os oligonucleotídeos utilizados foram *stem-loop* específicos, o que reduz a hibridização com os pri- e pre-miRNAs, aumentando assim a especificidade do ensaio.

3.7.3.4 Quantificação relativa dos níveis plasmáticos de microRNAs

A quantificação relativa dos níveis de expressão dos microRNAs foi mensurada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) utilizando o kit *TaqMan® MicroRNA Assays*. As reações foram otimizadas com o auxílio do kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix, AmpErase® UNG* (Life Technologies, USA) e finalmente processados na plataforma *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, USA). Os dados foram obtidos em Cq (*quantification cycle*), que é o número de ciclos necessários para obter-se sinal de fluorescência acima do limiar padrão (10 desvios-padrão acima da fluorescência média do ciclo basal). Portanto, o número de cópias do microRNA e o Cq são inversamente relacionados por um fator logarítmico na base 2, onde a redução em 1 Cq representa um aumento em 2 vezes no número de cópias. As análises foram realizadas em triplicata e a média dos três resultados foi considerada o Cq para a respectiva amostra. Subsequentemente, o Cq foi normalizado para o controle sintético “spike-in” conforme a equação abaixo⁴⁹:

$$Cq_{\text{normalizado}} = Cq_{\text{obs}} - (Cq_{\text{controle}} - Cq_{\text{mediana}})$$

Onde o Cq_{obs} é o obtido para o microRNA em questão, Cq_{controle} refere-se ao controle sintético cel-miR-39 para a mesma amostra e Cq_{mediana} é a mediana dos resultados do controle sintético de todos os pacientes em cada período (portanto uma mediana para antes

e outra para após a intervenção). Os resultados da expressão de cada microRNA serão aqui expressos em C_q , que representa o respectivo $C_{q_{\text{normalizado}}}$, e em delta C_q que é o $C_{q_{\text{normalizado}}}$ após menos o $C_{q_{\text{normalizado}}}$ antes da intervenção.

3.7.3.5 Medidas para controle de contaminação

Para a realização do estudo, processos que objetivam a minimização dos riscos de contaminação foram aplicados: utilização de reagentes de lote controlado e em alíquotas para evitar diversos ciclos de congelamento e descongelamento; todos os materiais utilizados foram de natureza *RNase/DNase-free* e manipulados em cabines de fluxo laminar livres de *amplicons* previamente tratadas com *RNase Away* (Invitrogen, USA). O uso de kits comerciais foi adotado para reduzir ao máximo o número de manipulações das amostras e diminuindo a chance de erro e repetições.

3.8. Programa de exercício supervisionado

Os pacientes randomizados para os grupos intervalado e contínuo foram submetidos a 12 semanas de treinamento aeróbico supervisionado, com três sessões de exercícios supervisionados por semana, duração de 50 minutos cada. O exercício foi realizado em bicicleta estacionária, iniciando com 5 minutos de aquecimento, 30 minutos de estímulo e 5 minutos de desaquecimento, completando um total de 40 minutos. Adicionalmente, os pacientes realizavam 5 minutos de alongamento de membros inferiores e superiores antes e após o exercício. Todos os participantes foram monitorizados com frequencímetro e escala subjetiva de esforço de Borg (7-20) durante a sessão. O exercício era interrompido caso o paciente apresentasse dor precordial, tonturas, náuseas, bradicardia, síncope, pré-síncope ou qualquer sintoma/sinal clinicamente relevante.

3.8.1. Treinamento aeróbico intervalado

Pacientes randomizados para o grupo intervalado realizavam a fase de estímulo aeróbico intercalando 1 minuto na FC do ponto de compensação respiratória com 2 minutos na FC do LA.

3.8.2. Treinamento aeróbico contínuo

Pacientes randomizados para o grupo contínuo realizavam a fase de estímulo na zona alvo. A zona alvo foi determinada pela média aritmética das FC do LA e do ponto de compensação respiratória, podendo variar 4 bpm para mais ou para menos.

3.9. Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado para detectar uma diferença de $2,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ no VO_2 pico entre 2 dos 3 grupos.^{6,33} Assim, assumindo-se erro alfa de 5% ajustado pelo método de Bonferroni e poder de 80%, o tamanho mínimo da amostra foi de 12 pacientes em cada grupo. As análises foram realizadas usando Stata versão 13.1 (*Stata Corp., College Station, Tx, EUA*).

A normalidade da distribuição das variáveis contínuas em cada grupo foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Elas foram apresentadas em média \pm desvio padrão ou mediana (25 percentil, 75 percentil) conforme aplicável. A IL-6 apresentou distribuição normal após transformação logarítmica, sendo por isso testada a partir dos dados transformados. Os três grupos foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), se distribuição normal, ou o teste de Kruskal-Wallis em caso contrário. Se encontrada diferença significativa, comparações de grupos pareados foi realizada com teste T, ou Wilcoxon se não normal, e ajuste pelo método de Bonferroni. O teste do exato de Fisher foi usado para comparar as proporções das variáveis discretas.

Em seguida, nós verificamos quais variáveis basais (antes da intervenção) estavam associados a melhora da capacidade funcional com o treinamento físico. Para isso, nós realizamos regressão linear univariada com a mudança no VO₂ pico (% predito) com exercício como variável dependente. A mudança no VO₂ pico (% predito) com o exercício, excluindo portanto o grupo controle, foi calculada pela diferença entre o VO₂ pico (% predito) pós menos o pré e apresentava distribuição normal. As variáveis cujo valor de p foi menor que 0,10 foram incluídos em modelo de regressão linear multivariada e considerados preditores independentes se p menor que 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Características da amostra

Foram avaliados 602 pacientes durante o período de inclusão e 52 foram randomizados para cada um dos três grupos. Doze pacientes não completaram o estudo: nove desistiram por razões não relacionadas ao quadro clínico; dois foram internados por IC descompensada e um paciente do grupo controle não foi encontrado para reavaliação. O fluxograma dos pacientes no estudo está resumido na figura 1.

Um paciente do grupo contínuo foi a óbito por quadro infeccioso e não foi submetido a medida da AFVD após o treinamento. Como tinha realizado todos os outros exames da reavaliação, foi incluído na análise.

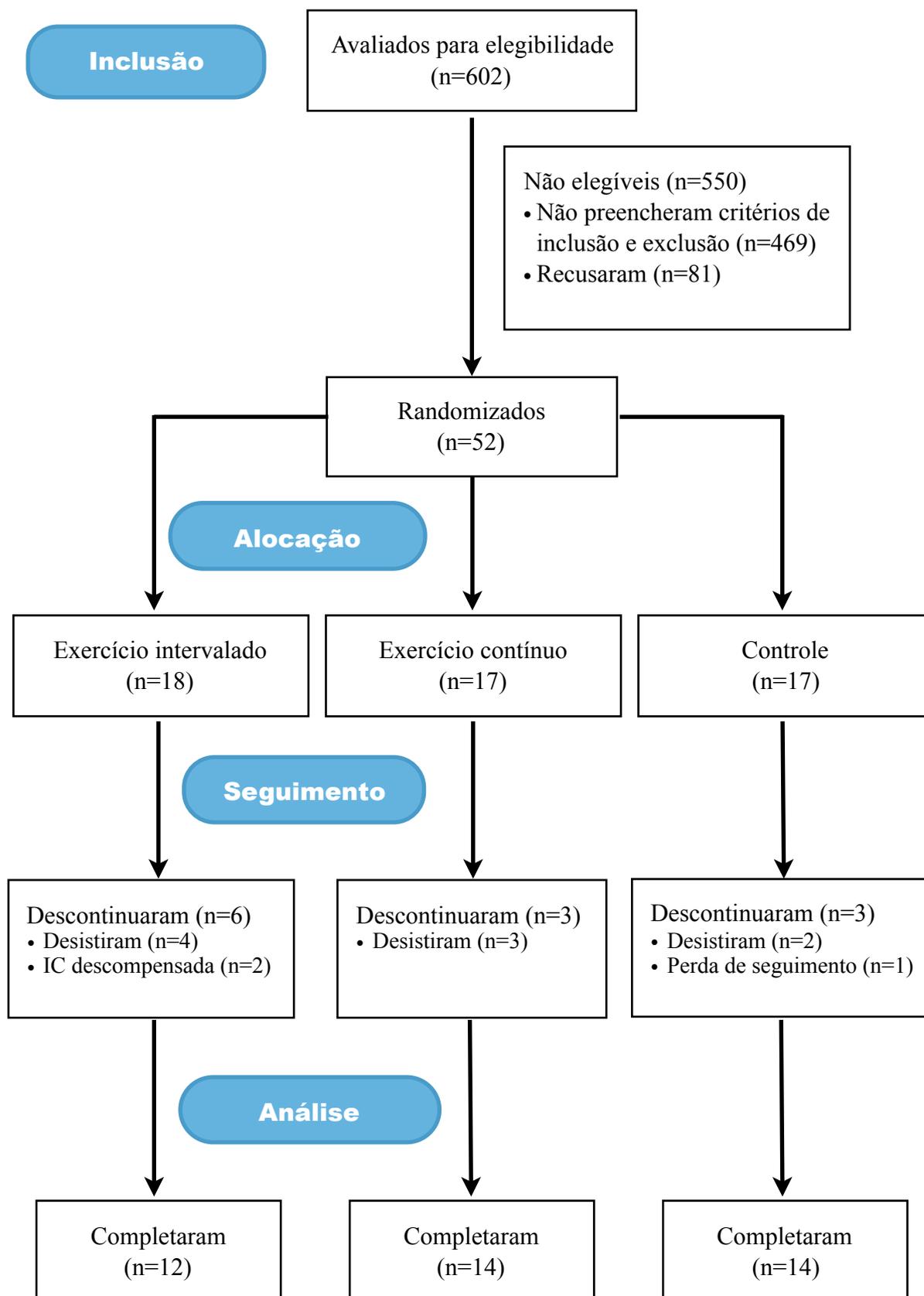


Figura 1: Fluxograma dos pacientes do estudo

* IC - insuficiência cardíaca

A tabela 1 mostra as características basais dos participantes por grupo. Os três grupos eram semelhantes quanto à idade, índice de massa corpórea (IMC), sexo, FEVE, etiologia da IC, fatores de risco cardiovascular e tratamento medicamentoso.

Tabela 1: Características basais dos participantes

Variável	Intervalado n=12	Contínuo n=14	Controle n=14	p
Idade, anos	52 ± 5	50 ± 9	47 ± 6	0,15
Sexo masculino, n (%)	6 (50)	7 (50)	8 (57)	0,91
Raça branca, n (%)	8 (67)	10 (71)	11 (79)	0,79
Peso, Kg	78 ± 16	79 ± 17	76 ± 9	0,84
IMC, Kg.m⁻²	28 ± 4	29 ± 5	28 ± 4	0,75
FEVE, %	30 ± 7	29 ± 6	29 ± 6	0,81
Hipertensão arterial, n (%)	6 (50)	8 (57)	6 (43)	0,75
Diabete melito, n (%)	0 (0)	5 (36)	3 (21)	0,08
Tabagismo atual, n (%)	2 (17)	0 (0)	1 (7)	0,27
Etiologia isquêmica, n (%)	4 (33)	4 (29)	2 (14)	0,50
Classe funcional, n (%)				0,42
I	1 (8)	4 (29)	3 (21)	
II	6 (50)	7 (50)	4 (29)	
III	5 (42)	3 (21)	7 (50)	
PA sistólica, mmHg	102 ± 15	114 ± 19	102 ± 11	0,06
PA diastólica, mmHg	57 ± 11	63 ± 14	58 ± 7	0,30
Medicações, n (%)				
IECA ou BRA	12 (100)	14 (100)	14 (100)	NA
Betabloqueador	12 (100)	14 (100)	14 (100)	NA
Carvedilol, dose em mg*	62 [50, 100]	50 [50, 75]	50 [50, 100]	0,90
Bloqueador aldosterona	9 (75)	8 (57)	10 (71)	0,58
Digital	4 (33)	3 (21)	6 (43)	0,48

IMC - índice de massa corpórea; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo, PA – pressão arterial; IECA - inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA - bloqueador do receptor da angiotensina II
*Trinta e nove pacientes estavam em uso de carvedilol.

4.2. Teste de esforço cardiopulmonar

Na avaliação basal, os três grupos não diferiam quanto aos parâmetros observados no TECP (tabela 2). Após a intervenção, observamos que o exercício, particularmente o intervalado, melhorou significativamente o tempo de tolerância ao esforço no TECP em relação ao grupo controle (tabela 2). Não houve diferença significativa nos outros parâmetros do TECP, incluindo VO_2 pico ou carga no pico do esforço, assim como nas outras variáveis prognósticas, incluindo VO_2 no LA, o $VE-VCO_2$ *slope* e a ventilação periódica. Vale ressaltar que o RER pico foi semelhante entre os três grupos.

Tabela 2: Resultados do teste de esforço cardiopulmonar conforme o grupo

Parâmetro	Intervalado (n=12)		Contínuo (n=14)		Controle (n=14)	
	Basal	12 semanas	Basal	12 semanas	Basal	12 semanas
Tempo, min	10 ± 2	13 ± 3 ^a	10 ± 2	12 ± 3*	11 ± 2	11 ± 2 ^a
RER pico	1,09 [1,04, 1,15]	1,16 [1,10, 1,22]	1,15 [1,11, 1,18]	1,18 [1,13, 1,42]	1,11 [1,05, 1,20]	1,14 [1,09, 1,18]
FC basal, bpm	69 ± 9	71 ± 8	71 ± 11	70 ± 10	77 ± 9	75 ± 10
FC pico, bpm	111 ± 18	126 ± 21	117 ± 23	121 ± 19	114 ± 18	118 ± 22
VO ₂ pico, mL.kg ⁻¹ .min ⁻²	12,9 [11,6, 17,4]	15,4 [13,4, 20,0]	13,8 [12,5, 15,8]	15,2 [11,8, 17,1]	13,8 [11,8, 16,6]	14,4 [11,9, 15,9]
VO ₂ pico, %	56 [50, 63]	63 [57, 80]	61 [47, 74]	64 [53, 78]	53 [40, 72]	58 [43, 68]
Pulso O ₂ , mL.bat ⁻¹	10 [7, 12]	9 [8, 14]	10 [9, 11]	10 [8, 12]	10 [9, 11]	9 [8, 12]
Carga pico, W	54 [46, 89]	70 [58, 109]	62 [50, 89]	72 [60, 120]	58 [50, 70]	57 [54, 65]
V O ₂ LA, mL.kg ⁻¹ .min ⁻²	8,3 [7,4, 9,6]	9,4 [7,9, 11,2]	9,6 [6,7, 10,8]	9,4 [7,7, 10,4]	8,3 [7,5, 9,4]	8,3 [7,5, 9,7]
Carga LA, W	29 [19, 38]	29 [27, 56]	35 [21, 42]	38 [30, 51]	25 [17, 32]	25 [20, 30]
VE-VCO ₂ slope	35 ± 7	33 ± 7	34 ± 8	31 ± 4	36 ± 8	35 ± 7
ΔVO ₂ /Δcarga	10,7 ± 2,1	9,7 ± 3,3	11,7 ± 3,8	9,1 ± 3,0	9,8 ± 3,3	10,4 ± 2,3
VP, n(%)	0 (0 %)	1 (8 %)	5 (36 %)	3 (21 %)	3 (21 %)	3 (21 %)

RER - razão de trocas respiratórias; FC - frequência cardíaca em batimentos por minuto; VO₂ pico - consumo pico de oxigênio; Pulso O₂ - pulso de oxigênio; VO₂ LA - consumo de oxigênio no limiar anaeróbico; Carga LA - carga no limiar anaeróbico; VE-VCO₂ slope - inclinação da curva de ventilação pela produção de dióxido de carbono; ΔVO₂/Δcarga - inclinação da relação do consumo de oxigênio pela carga; VP - ventilação periódica

* - $p < 0,05$ para comparação entre os três grupos em 12 semanas; ^a - Significativamente diferente na comparação de grupos pareados: p ajustado (Bonferroni) $< 0,05$

4.3. Biomarcadores inflamatórios

A figura 2 mostra os níveis séricos de IL-6 (em escala logarítmica), adiponectina, TNF-alfa e galectina-3 antes e após a intervenção de acordo com o grupo. Não houve diferença significativa nos níveis séricos destes biomarcadores em nenhuma das modalidades de treinamento físico em relação ao grupo controle.

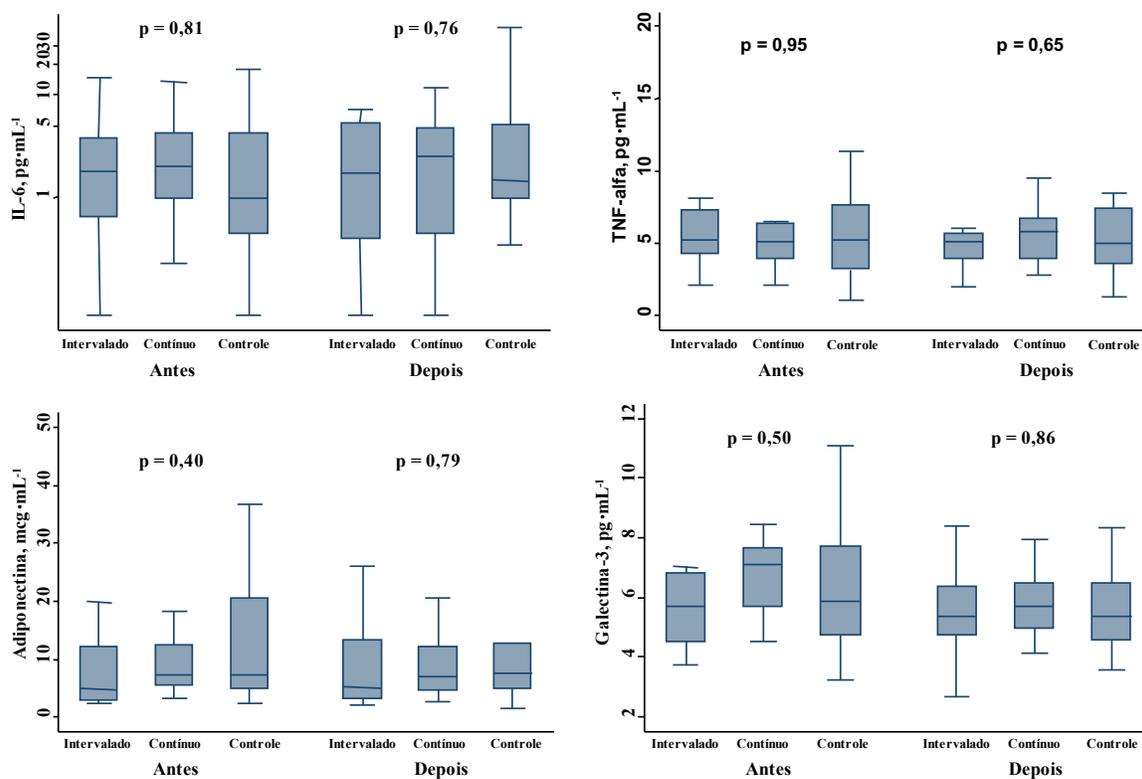


Figura 2: Níveis séricos de interleucina-6 após conversão (A), fator de necrose tumoral-alfa (B), adiponectina (C) e galectina-3 (D) antes e depois da intervenção de acordo com o grupo alocado

4.4. MicroRNAs

A figura 3 mostra a mudança do Cq de cada microRNA circulante de acordo com a intervenção. Como acima descrito, o Cq é inversamente proporcional à expressão, onde a redução em 1 Cq representa um aumento em 2 vezes no número de cópias de microRNA. A variação da expressão dos microRNAs miR-423-5p, -155 e -221 nos pacientes submetidos a exercício intervalado e contínuo foi semelhante a dos pacientes no grupo controle.

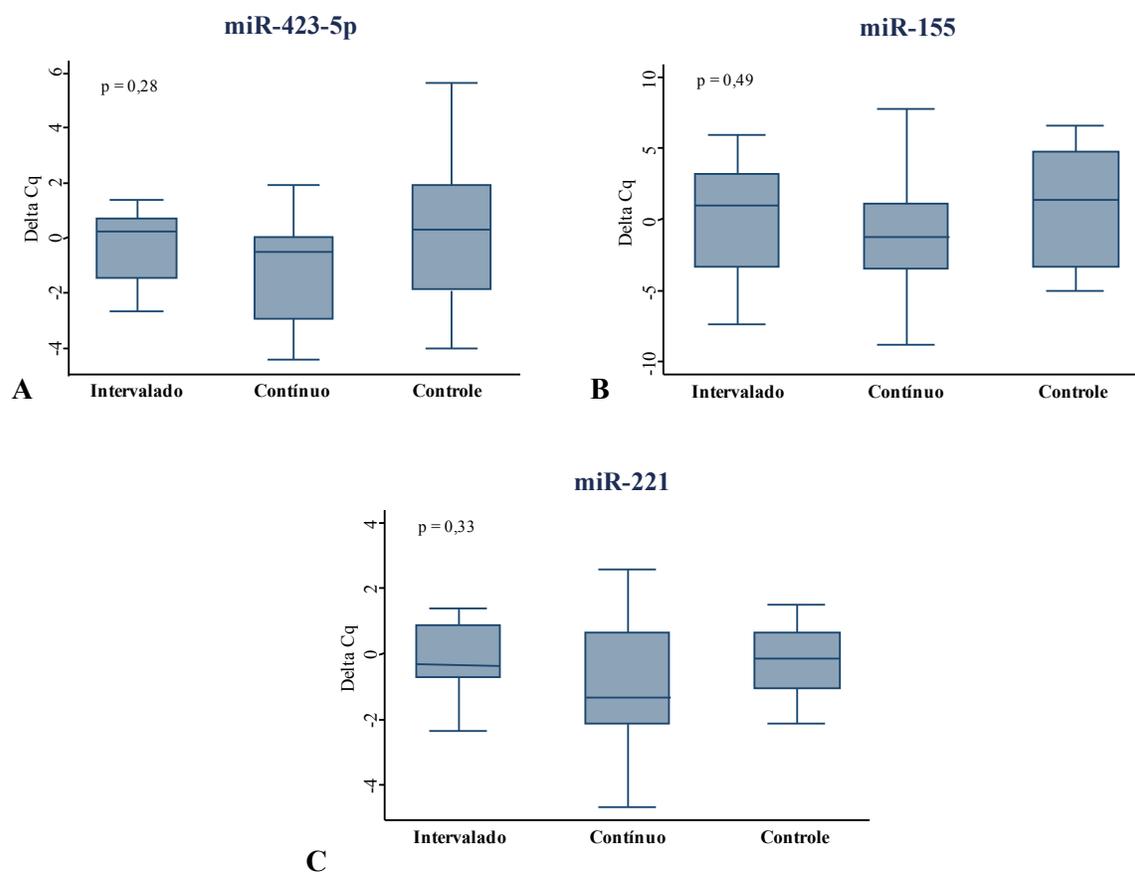


Figura 3: Mudança nos níveis séricos dos microRNAs miR-423-5p (A), miR-155 (B) e miR-221 (C) de acordo com intervenção realizada de acordo com o grupo alocado.

$$\text{Delta Cq} = \text{Cq}_{\text{normalizado pós}} - \text{Cq}_{\text{normalizado pré intervenção}}$$

4.5. Qualidade de vida

As pontuação basais do questionário de qualidade de vida (MLWHF) não diferiram entre os grupos (tabela 3). Após 12 semanas de intervenção, observamos que o exercício intervalado e contínuo reduziram significativamente o escore total, indicando melhor qualidade de vida. Quando as subdimensões foram analisadas separadamente, observamos redução significativa apenas na dimensão física.

Tabela 3: Escore de qualidade de vida de acordo com o questionário *Minnesota Living With Heart Failure*

Parâmetro	Intervalado n = 12	Contínuo n = 14	Controle n = 14	p
BASAL				
Escore total	46 [20 , 58]	31 [15 , 45]	34 [21 , 47]	0,58
Dimensão física	21 [7 , 26]	13 [5 , 20]	18 [13 , 21]	0,47
Dimensão emocional	9 [5 , 13]	7 [3 , 12]	4 [3 , 12]	0,44
APÓS INTERVENÇÃO				
Escore total	12 [10 , 18]	18 [8 , 24]	37 [21 , 47]	0,012
Dimensão física	6 [4 , 9]	8 [2 , 11]	16 [10 , 27]	0,016
Dimensão emocional	3 [1 , 5]	3 [1 , 7]	6 [4 , 9]	0,12

4.6. Preditores de resposta ao treinamento físico

A tabela 4 mostra a análise univariada da associação entre variáveis basais a mudança do VO₂ pico com o treinamento físico. Dentre as variáveis do TECP, o tempo de esforço no teste basal associou-se negativamente com a mudança do VO₂ pico. Vale notar que as outras variáveis do TECP basal, como o VO₂ pico e o RER pico, não foram significativamente associados a resposta ao treinamento.

Nenhum dos parâmetros de avaliação da AFVD basal, como percentual de tempo sedentário, número de passos, intensidade de movimento ou GEA, foram associados com a mudança da capacidade funcional no exercício.

Quanto aos biomarcadores de inflamação e fibrose, os níveis basais de IL-6 correlacionaram-se negativamente com a resposta ao treinamento. Os níveis de galectina-3, adiponectina e de TNF-alfa não tiveram associação significativa com a mudança do VO₂ pico. Da mesma forma, a expressão sérica basal dos microRNAs miR-423-5p, -155 e -221 não foi preditor de resposta ao exercício.

À análise multivariada, a IL-6 foi independentemente associada com mudança no VO₂ pico após o treinamento físico em pacientes com IC (tabela 5).

Tabela 4: Associação entre as características basais e a mudança do consumo pico de oxigênio com exercício (n=26)

Variável	R	Coefficiente $\beta \pm SE$	<i>p</i>
Idade, anos	0,11	0,01 \pm 0,03	0,61
Sexo masculino	- 0,09	- 0,17 \pm 0,40	0,68
IMC, Kg.m⁻²	0,02	0,01 \pm 0,05	0,91
Hipertensão arterial	- 0,25	- 0,50 \pm 0,39	0,21
Diabete melito	- 0,24	-0,60 \pm 0,49	0,23
FEVE, %	0,28	0,05 \pm 0,03	0,17
Etiologia isquêmica	0,08	0,16 \pm 0,43	0,72
Teste de esforço cardiopulmonar			
VO₂ pico, %	- 0,22	- 0,02 \pm 0,02	0,28
Tempo de exercício, min	- 0,47	- 0,21 \pm 0,08	0,015
RER pico	0,15	1,55 \pm 2,09	0,46
VO₂ LA, mL.kg⁻¹.min⁻²	- 0,21	- 0,07 \pm 0,07	0,32
VE-VCO₂ slope	- 0,04	- 0,01 \pm 0,03	0,85
VP	- 0,10	- 0,24 \pm 0,51	0,64
Atividade física na vida diária			
Tempo sedentário, %	- 0,18	- 0,02 \pm 0,02	0,37
Passos, n	- 0,05	- 0,00 \pm 0,0001	0,80
IM, g	0,14	4,84 \pm 7,05	0,50
GEA, Kcal*	- 0,01	0,00 \pm 0,001	0,95
Biomarcadores			
Adiponectina, mcg.mL⁻¹	- 0,04	- 0,00 \pm 0,02	0,84
Galectina-3, ng.mL⁻¹	- 0,34	- 0,17 \pm 0,09	0,087
Log-IL-6, pg.mL⁻¹	- 0,56	- 0,41 \pm 0,12	0,003
TNF-alfa, pg.mL⁻¹	- 0,19	- 0,09 \pm 0,09	0,35
miR-423-5p, Cq	0,16	0,12 \pm 0,15	0,44
miR-155, Cq	0,28	0,08 \pm 0,06	0,17
miR-221, Cq	0,11	0,08 \pm 0,15	0,60
Grupo intervalado	- 0,20	0,40 \pm 0,39	0,32

Coefficiente β representa a variação do preditor para cada 1 desvio padrão na variável dependente (mudança no VO₂ pico).

IMC - índice de massa corpórea; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VO₂ pico - consumo pico de oxigênio; RER - razão de trocas respiratórias; VO₂ LA - consumo de oxigênio no limiar anaeróbico; VE-VCO₂ slope - inclinação da curva de ventilação pela produção de dióxido de carbono; VP - ventilação periódica; IM - intensidade de movimento em g; GEA - gasto energético durante atividade em quilocalorias; Carga LA - carga no limiar anaeróbico; Log-IL-6 -interleucina-6 após conversão logarítmica; TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa; miR - microRNA; Cq - *cycle quantification*

Tabela 5: Análise de regressão multivariada predizendo a mudança do consumo pico de oxigênio com exercício (n=26)

Variável	R parcial	Coefficiente $\beta \pm SE$	<i>p</i>
Tempo de exercício, min	-0,39	- 0,14 \pm 0,07	0,066
Galectina-3, ng.mL⁻¹	-0,38	- 0,14 \pm 0,07	0,069
Log IL-6, pg.mL⁻¹	-0,55	-0,35 \pm 0,11	0,005

Coefficiente β representa a variação do preditor para cada 1 desvio padrão na variável dependente (mudança no VO2 pico) ajustada as demais variáveis do modelo

Log-IL-6 – interleucina-6 após conversão logarítmica

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que o exercício físico, tanto no modo intervalado como contínuo, tem efeito neutro nos biomarcadores séricos de inflamação e fibrose e nos microRNAs circulantes em pacientes com IC. Além disso, nós observamos que os níveis séricos de IL-6 se associam negativamente à melhora do VO₂ pico com exercício nesta população. Este é o primeiro estudo a associar inflamação sistêmica com ausência de melhora na capacidade aeróbica com exercício. Estes resultados foram observados em pacientes já recebendo terapia otimizada para IC, conforme as diretrizes atuais.

5.1. Efeitos do exercício nos biomarcadores inflamatórios

Estudos prévios exploraram a influência do exercício nos biomarcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis. Parece haver uma “resposta de fase aguda” em que biomarcadores inflamatórios, incluindo a proteína C reativa e IL-6, aumentam logo após o exercício extenuante e retornam ao basal após alguns dias.⁵⁰ O músculo exercitado é uma das fontes de IL-6, a qual acumula no sangue em proporção a intensidade, duração e massa de músculo recrutado no exercício. Ao contrário do que seria esperado, os mecanismos de produção de citocina são independentes da existência de injúria muscular, conforme análise da expressão genética local.⁵⁰ Quanto ao exercício físico crônico, estudos prospectivos observaram que os níveis circulantes de biomarcadores inflamatórios reduzem após três meses de treinamento físico em indivíduos saudáveis e em pacientes com claudicação intermitente e diabetes.⁵¹⁻⁵³

Em pacientes com IC, estudos prévios observaram ausência de mudança nestes biomarcadores em concordância com nossos achados. Ahmad et al mostrou que níveis sanguíneos de proteína C reativa permanecem estáveis após exercício de intensidade moderada, mesmo levando em consideração o volume de treinamento.⁵⁴ Gielen et al demonstrou que o treinamento físico não alterou os níveis séricos de IL-6 e TNF-alfa, embora tenha reduzido sua expressão muscular.²² O que ainda era desconhecido é se o

exercício mais intenso poderia aumentar a inflamação a longo prazo, já que a intensidade está positivamente associada a quantidade de liberação aguda de citocina na circulação. Nossos resultados demonstraram que 12 semanas de exercício intervalado, com curtos períodos de alta intensidade de maneira intermitente, tem efeito neutro nos biomarcadores inflamatórios.

5.2. Efeito do exercício na qualidade de vida

O exercício físico, independentemente da modalidade do treino, melhorou a qualidade de vida em três meses de intervenção. Em concordância, no estudo HF-ACTION, o exercício melhorou o estado de saúde medido pelo *Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire*, apesar do efeito discreto no VO_2 pico.⁵ Todas as subescalas deste questionário melhoraram com exercício, incluindo qualidade de vida e limitação física. Da mesma forma, observamos melhora na dimensão física do questionário MLWHF. Os grupos intervalado e contínuo também apresentaram melhora (redução) na dimensão emocional da qualidade de vida, mas este resultado não foi estatisticamente significativo possivelmente pelo menor número de questões neste domínio.

É intrigante o fato de termos encontrado melhora na qualidade de vida na ausência de melhora de parâmetros do teste cardiopulmonar associadas com a sensação de dispnéia para as atividades habituais, como VO_{2LA} , o $VE-VCO_2$ *slope* e a ventilação periódica. É possível que os pacientes tenham adquirido maior eficiência biomecânica com o treinamento, resultando em menor VO_2 para realizar a mesma atividade. Isto é reforçado pelo maior tempo de tolerância ao exercício no TECP no grupo intervalado, embora a carga pico não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa. Outra possibilidade é que a percepção de melhor qualidade de vida possa ter vindo de benefícios além do exercício em si, como engajamento em grupo e maior suporte social.⁵⁵

5.3. MicroRNAs

Em nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a avaliar o efeito do exercício físico em microRNAs circulantes em pacientes com IC. Dentre suas propriedades, os microRNAs são secretados na circulação em exossomos, sendo capazes de agir em outras células, em tecido receptor distante de onde é produzido, e modificar a expressão proteica.⁵⁶⁻⁵⁸ Com isso, os microRNAs circulantes podem ajudar a compreender os processos adaptativos ao exercício.⁹

O miR-423-5p é um biomarcador de IC, estando elevado no sangue periférico em comparação com indivíduos saudáveis. Seus níveis circulantes podem indicar gravidade, já que se associam com a classe funcional e níveis séricos de BNP.^{12,13,59} Estudos tem sugerido que os altos níveis circulantes do miR-423-5p provenham do miocárdio. Goldraich et al observaram que o gradiente transcoronário do miR-423-5p é significativamente maior em pacientes com IC em comparação com indivíduos controle, sugerindo que o coração aumenta sua produção na IC sistólica.⁶⁰ De fato, Thum et al observaram que a expressão de miR-423-5p está aumentada no miocárdio do coração explantado de pacientes submetidos a transplante cardíaco.⁶¹ Em conjunto com outros microRNAs também superexpressos, postula-se que ele possa contribuir para a reprogramação genética do coração em falência resultando em um padrão de expressão semelhante ao coração fetal.

Se assumirmos que os níveis circulantes referem a expressão miocárdica local, nossos resultados sugerem que o exercício não modifica a superexpressão de miR-423-5p e potencialmente não reverteria este padrão anormal de expressão genética no coração. Podendo estar de acordo com estes achados, o exercício intervalado não parece melhorar a FEVE em pacientes com IC.³⁴ Por outro lado, o mecanismo de liberação do miR-423-5p na circulação ainda é incerto, não sendo possível afirmar se decorre da expressão miocárdica aumentada e consequente liberação na corrente sanguínea ou se há outros mecanismos envolvidos, como injúria do miocárdio. Ainda, desconhece-se a razão pela qual os outros microRNAs altamente expressos no coração em falência não estão também elevados no sangue.⁶¹

O miR-155 está envolvido na regulação imune e supressão da oncogênese, embora estes efeitos não tenham sido demonstrados especificamente em pacientes com IC.⁴⁷ Entre diversas vias de sinalização envolvidas, o miR-155 regula positivamente citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células dendríticas. Nossos achados reforçam que o exercício tem impacto neutro na inflamação, como já discutido acima.

Em pacientes com IC, também foi demonstrado que o miR-155 pode suprimir a expressão do gene relacionado ao receptor da angiotensina II do tipo I.⁴⁸ Como a hiperexpressão deste gene está associada com piora da função endotelial, a ação do miR-155 poderia mitigá-la. Embora estudos prévios tenham mostrado efeitos benéficos do exercício na função endotelial na IC,⁶² a variação da expressão do miR-155 circulante com exercício foi indiferente do controle em nosso estudo. Isto não indica ou afasta, entretanto, que o miR-155 esteja diretamente implicado na função endotelial.

Em contraste com o que encontramos em pacientes com IC, Baggish et al observaram aumento do miR-221 circulante após 90 dias de “treinamento sustentado” em atletas jovens.¹⁰ Diferenças no desenho e na população estudada podem explicar esta discrepância. Em vista da ausência de grupo controle no estudo de Baggish et al, fatores outros que não o exercício podem ter influenciado seus resultados. Por outro lado, pode ser que processos adaptativos que ocorrem em indivíduos saudáveis não incidem da mesma maneira em pacientes com IC. O miR-221 é altamente expresso nas células endoteliais e pode afetar as propriedades angiogênicas do endotélio.^{45,46} Enquanto há evidência consistente de que o exercício tem efeitos benéficos nas células angiogênicas circulantes (CAC) em indivíduos saudáveis, há poucos estudos em outras populações.⁶³ Van Craenenbroeck et al demonstraram que uma sessão de exercício reverte a disfunção de CAC em pacientes com IC.⁶² Eleuteri et al observaram aumento dos níveis sanguíneos de células progenitoras endoteliais após 3 meses de treinamento em pacientes com IC.⁶⁴ Futuros estudos devem avaliar se o miR-221 está implicado no processo adaptativo que envolve o estímulo da angiogênese em pacientes com IC.

5.4. Preditores de resposta ao exercício

Estudos prévios encontraram associação entre alguns biomarcadores séricos e melhora na capacidade funcional com exercício. Ahmad et al classificou pacientes com IC em quatro diferentes fenótipos, através de *cluster analysis* no estudo HF-ACTION.³² Tais fenótipos diferiram entre si em relação ao efeito do exercício na mortalidade e hospitalização por IC. Nesse estudo, o subgrupo que apresentou o maior aumento no VO₂ pico tinha os menores níveis basais de galectina-3. Embora não significativa estatisticamente, nós também encontramos uma associação inversa entre níveis séricos de galectina-3 e resposta ao exercício. Por outro lado, a IL-6 foi o único biomarcador independentemente associado com resposta ao exercício. Embora intrinsecamente relacionadas, inflamação precede fibrose biologicamente e a primeira pode ser mais intimamente relacionada as alterações fisiopatológicas que impedem o incremento no transporte e utilização de oxigênio durante o exercício.

Os mecanismos responsáveis pela associação entre níveis de IL-6 e resposta ao exercício é desconhecida. É concebível que IL-6 seja apenas um marcador de gravidade sem participação direta na inibição do aumento do VO₂ pico. Estudos anteriores revelaram que níveis circulantes elevados de IL-6, entre outros marcadores de inflamação, estão associados com reduzida capacidade funcional e maior mortalidade em IC.^{17,54,65,66} Embora ainda assunto em debate, anormalidades da mucosa intestinal, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e atividade simpática elevada foram implicadas na causa da inflamação em pacientes com IC.^{66,67} Ativação neuro-hormonal excessiva, que ocorrem em pacientes com IC mais avançada, poderia neutralizar as alterações dependentes do endotélio no fluxo sanguíneo periférico, inibindo o aumento no VO₂ pico. No entanto, os resultados do estudo HF-ACTION enfraquecem esta hipótese, já que os pacientes com doença mais avançada se beneficiaram mais com exercício do que aqueles com formas mais leves.³²

Outra teoria é que os efeitos da IL-6 poderiam causar diretamente as anormalidades que impedem a melhora no VO₂ pico com exercício. A IL-6 age através de transdução de sinal por unidade receptora transmembrana da glicoproteína 130, causando efeitos no

sistema cardiovascular.⁶⁶ Estes incluem hipertrofia e apoptose do cardiomiócito, alterações na expressão da *matrix metalloproteinase*, anormalidades na homeostase de cálcio intracelular do miocárdio, disfunção endotelial, redução na atividade mitocondrial e apoptose do músculo esquelético. Estas consequências poderiam ser tão extremas, que se tornariam irreversíveis com exercício. Além disso, a atividade pro-inflamatória aguda induzida por cada sessão de exercício poderia ser prejudicial naqueles pacientes com um grau elevado de inflamação crônica.

A ausência de impacto na mortalidade no contexto da terapia moderna para IC tem estimulado a procura de subgrupos que possam ter benefício. Como já apontado, a ausência de melhora no VO₂ pico com treinamento físico é relacionada a sobrevida.⁶ Mesmo embora causalidade reversa possa estar implicada nesta relação, isto é, os pacientes mais graves são menos aderentes e conseqüentemente exibiriam menor ganho no VO₂ pico, parece que intensidade e volume de treinamento não explicam totalmente esta resposta. Nós demonstramos que níveis de IL-6 prediz resposta ao exercício entre os pacientes que completaram 12 semanas de um programa de supervisão direta, com um mínimo de 70% de aderência. Além disso, treinamento aeróbico intervalado não influenciou a melhora do VO₂ pico. Nossos resultados indicam que fatores relacionados ao paciente estão associados a resposta ao exercício, além do volume e intensidade de treinamento.

5.5. Limitações

A taxa de desistência em nosso estudo foi elevada, o que pode ter mitigado a comparabilidade entre os grupos. Embora a análise do tipo “intenção de tratar” seria ideal para preservar os princípios da randomização, o tipo de desfecho neste estudo requer a análise somente dos pacientes que fossem capazes de completar o estudo, ou pelo menos submetidos ao um segundo TECP. Além disso, não houve diferença significativa nas características basais entre os três grupos, indicando que eles permaneceram semelhantes.

Nós observamos que o tempo de exercício no TECP basal foi inversamente associado a resposta ao treinamento. É possível que este fenômeno tenha subestimado o VO_2 pico, amplificando a diferença entre as avaliações pré e pós na ausência de real melhora fisiológica. No entanto, cada participante foi submetido ao mesmo incremento de carga em ambas avaliações e o RER pico foi semelhante entre os respondedores e os não respondedores, sugerindo nível de esforço semelhante.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Nós concluimos que:

- O exercício aeróbico, seja intervalado ou contínuo, por 12 semanas teve efeito neutro nos biomarcadores de inflamação e fibrose e nos níveis circulantes dos microRNAs miR-423-5p, -221 e -155 em pacientes com IC.
- O nível sérico de IL-6 é preditor independente de resposta ao treinamento físico em IC. Níveis elevados deste biomarcador estão associados ausência de melhora da capacidade funcional com o exercício.
- Em pacientes com IC, o exercício físico, particularmente intervalado, resultou em melhor qualidade de vida, apesar da ausência de efeito na capacidade funcional.

Anexos

7. ANEXOS

7.1. Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: TREINAMENTO INTERVALADO VERSUS TREINAMENTO CONTÍNUO NA ATIVIDADE SIMPÁTICA E PERFUSÃO PERIFÉRICA EM PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: ESTUDO RANDOMIZADO COM GRUPO CONTROLE.

PESQUISADOR : Jean Marcelo Roque

CARGO/FUNÇÃO: Fisioterapeuta INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº Crefito-3 74341-F..

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Insuficiência cardíaca.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : Três anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Os médicos diagnosticaram que seu coração aumentou de tamanho, com isso o senhor (a) passou a ter uma doença cardíaca. Essa doença deixa de oxigenar bem o corpo e também os músculos, principalmente durante algumas atividades diárias. Para o senhor (a) que faz parte desse ambulatório, que segue as recomendações dos médicos que o atendem, estamos também disponibilizando um programa de atividade física para melhorar sua condição física, resultando em melhor qualidade de vida. Estudos demonstraram os benefícios que a atividade física traz ao seu problema. Estamos iniciando um estudo para mensurar os efeitos do exercício com intensidade variada, avaliando a circulação sanguínea, oxigenação muscular e examinar as células musculares. Desse modo, o exercício a ser realizado poderá também trazer benefícios a sua saúde, melhorando sua qualidade de vida.
2. Caso aceite participar do estudo, será feito sorteio para designar qual atividade física o senhor (a) realizará: exercícios com intensidade variada, isto é, vai caminhar em velocidade lenta e um pouco mais rápida de forma alternada, ou continua sempre na mesma velocidade. O treino será realizado em esteira rolante por até 60 (sessenta minutos), 3 (três) vezes por semana por um período de 3 (três) meses. Será feita uma avaliação antes e outra após o treinamento. O senhor (a) fará os seguintes exames: 1. Teste cardiopulmonar é utilizado para avaliarmos como está a sua capacidade física. Nesse teste você irá pedalar em uma bicicleta estacionária e será observado como se comporta seu coração e respiração. Em quaisquer sinais de cansaço, tonturas, palpitações e falta de ar, o teste será interrompido; 2. Medição do fluxo sanguíneo e oxigenação muscular através de uma luz apontada para tua coxa; 3 Num outro dia que você vier ao hospital, será realizado o exame do músculo da coxa. Primeiro será feita a limpeza cuidadosa do local para prevenir infecção, depois o local será anestesiado para que você não sinta nenhuma dor e finalmente será feito um pequeno corte na parte lateral da sua coxa e colocada uma agulha apropriada para retirada de um pedaço bem pequeno de músculo, o senhor não ficará com a força prejudicada. Depois disso, será feito um curativo no local. Esse exame será feito por um médico bem treinado nessa técnica. Esse exame é muito importante para saber se o exercício melhora a quantidade de músculo na sua perna. 4. Será feita através de uma fina agulha a análise da condução nervosa, de um nervo superficial, ou seja, próximo à pele, que passa abaixo do joelho do lado de fora. Será feita a limpeza local e o procedimento não causará dor, poderá apenas ter a sensação momentânea de um leve choque. 5. Você irá utilizar um aparelho chamado acelerômetro durante vinte e quatro horas durante suas atividades habituais antes e após o programa de treinamento. Este aparelho é uma espécie de cinta de tecido que você vestirá, e nela há um pequeno dispositivo (menor que um aparelho celular). 6. Você será submetido a duas coletas de sangue, através da punção de uma veia periférica, onde serão retirados aproximadamente 8 mL cada vez. A primeira coleta será realizada antes e a segunda após o treinamento físico.
3. Este tratamento está associado a um risco muito baixo de complicações e desconfortos, uma vez que o senhor realizará exames para podermos indicar com segurança a atividade física. É provável que o senhor (a) se canse um pouco quando realizar o teste cardiopulmonar, caso sinta muito desconforto o teste será interrompido, assim que o teste terminar o desconforto também cessará. No início do programa de treinamento físico, pode ser que o senhor (a) se sinta um pouco mais cansado (a), como qualquer indivíduo que inicie atividade física, pois o corpo não estava acostumado, mas após alguns dias essa sensação deve melhorar, pois já se iniciam os benefícios da prática de atividade física. Outro procedimento que pode causar algum desconforto, é a punção venosa para coleta de sangue em que você pode sentir dor provocada pela picada da agulha. Embora seja pequena a probabilidade, podem ocorrer formação de

hematomas e infecção no local da punção. Vale salientar que todos os cuidados serão tomados para evitá-los.

4. Com a realização do programa de exercícios físicos, poderemos melhorar sua capacidade física, baixar os níveis da tua pressão arterial e conhecer bem a irrigação sanguínea muscular e a integridade de seu músculo. Somente no final do estudo é que poderemos concluir a presença de algum benefício esperado ou não. Todos os exames realizados serão usufruídos para melhor ajuste de drogas ou outras terapêuticas necessárias.
5. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Guilherme Veiga Guimarães, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 1º andar, bloco 1 – tel: 3069-5419. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail:cappesq@hcnnet.usp.br
6. É garantida a liberdade da sua retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição (InCor);
7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum de vocês;
8. Quem participar da pesquisa será atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou seja, dos achados antes do término da pesquisa.
9. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo testes, exames e o treinamento. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, haverá se necessário, uma ajuda de custo para o transporte (deslocamento) até a instituição, apenas nos dias de testes e treinamento, sendo a quantia de duas conduções (metrô/ônibus) por dia. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
10. O material coletado será acondicionado no banco de materiais biológico da unidade e servirá para futuras pesquisas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Treinamento Intervalado Versus Treinamento Contínuo na Atividade Simpática e Perfusão Periféricas em Pacientes Portadores de Insuficiência Cardíaca”.

7.2. Anexo II

QUESTIONÁRIO MINNESOTA LIVING WITH HEART FAILURE*

Nome: _____ RG: _____ - _____

As seguintes questões perguntam o quanto a insuficiência cardíaca (sua condição cardíaca) afetou a sua vida durante o último mês (nas últimas 4 semanas). Em cada questão, circule o número 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 para mostrar o quanto a sua vida foi afetada. Se a questão não se aplica a você, circule o 0 nesta questão.

Durante o último mês seu problema cardíaco o impediu de viver como você queria por quê?

Não Muito Pouco Muitíssimo

	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
1. Causou inchaço em seus tornozelos e pernas	0	1	2	3	4	5
2. Obrigando você a se sentar ou deitar para descansar durante o dia	0	1	2	3	4	5
3. Tornando sua caminhada e subida de escadas difícil	0	1	2	3	4	5
4. Tornando seu trabalho doméstico difícil	0	1	2	3	4	5
5. Tornando suas saídas de casa difícil	0	1	2	3	4	5
6. Tornando difícil dormir bem à noite	0	1	2	3	4	5
7. Tornando seus relacionamentos ou atividades com familiares e amigos difícil	0	1	2	3	4	5
8. Tornando seu trabalho para ganhar a vida difícil	0	1	2	3	4	5
9. Tornando seus passatempos, esportes e diversão difícil	0	1	2	3	4	5
10. Tornando sua atividade sexual difícil	0	1	2	3	4	5
11. Fazendo você comer menos as comidas que você gosta	0	1	2	3	4	5
12. Causando falta de ar	0	1	2	3	4	5
13. Deixando você cansado, fatigado ou com pouca energia	0	1	2	3	4	5
14. Obrigando você a ficar hospitalizado	0	1	2	3	4	5
15. Fazendo você gastar dinheiro com cuidados médicos	0	1	2	3	4	5
16. Causando a você efeitos colaterais das medicações	0	1	2	3	4	5
17. Fazendo você sentir-se um peso para familiares e amigos	0	1	2	3	4	5
18. Fazendo você sentir uma falta de auto controle na sua vida	0	1	2	3	4	5
19. Fazendo você se preocupar	0	1	2	3	4	5
20. Tornando difícil você concentrar-se ou lembrar-se das coisas	0	1	2	3	4	5
21. Fazendo você sentir-se deprimido	0	1	2	3	4	5

* Adaptado de Carvalho et al ⁽⁵⁹⁾.

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Bocchi EA, Braga FGM, Ferreira SMA, Rohde LEP, Oliveira WA de, Almeida DR de, Moreira M da CV, Bestetti RB, Bordignon S, Azevedo C, Tinoco EM, Rocha RM, Issa VS, Ferraz A, Cruz F das D, Guimarães GV, Montera VDSP, Albuquerque DC, Bacal F, Souza GEC, Rossi Neto JM, Clausell NO, Martins SM, Siciliano A, Souza Neto JD de, Moreira LF, Teixeira RA, Moura LZ, Beck-da-Silva L, Rassi S, Azeka E, Horowitz E, Ramires F, Simões MV, Castro RBP de, Salemi VMC, Villacorta Junior H, Vila JH, Simões R, Albanesi F, Montera MW, Sociedade Brasileira de Cardiologia. [III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:3–70.
2. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart Br Card Soc.* 2004;90:464–470.
3. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, Carson P, DiCarlo L, DeMets D, White BG, DeVries DW, Feldman AM, Comparison of Medical Therapy, Pacing, and Defibrillation in Heart Failure (COMPANION) Investigators. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2004;350:2140–2150.
4. Piña IL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, Fletcher BJ, Fleg JL, Myers JN, Sullivan MJ, American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation.* 2003;107:1210–1225.
5. Flynn KE, Piña IL, Whellan DJ, Lin L, Blumenthal JA, Ellis SJ, Fine LJ, Howlett JG, Keteyian SJ, Kitzman DW, Kraus WE, Miller NH, Schulman KA, Spertus JA, O'Connor CM, Weinfurt KP, HF-ACTION Investigators. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;301:1451–1459.
6. Tabet J-Y, Meurin P, Beauvais F, Weber H, Renaud N, Thabut G, Cohen-Solal A, Logeart D, Ben Driss A. Absence of exercise capacity improvement after exercise

- training program: a strong prognostic factor in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008;1:220–226.
7. Condorelli G, Latronico MVG, Dorn GW. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur Heart J.* 2010;31:649–658.
 8. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010;107:677–684.
 9. Baggish AL, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, Troyanos C, D’Hemecourt P, Dyer S, Thiel M, Hale A, Chan SY. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2014;116:522–531.
 10. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol.* 2011;589:3983–3994.
 11. Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98:459–466.
 12. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035–1039.
 13. Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:147–154.
 14. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996;93:704–711.

15. Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001;3:517–526.
16. Van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Emerging biomarkers in heart failure. *Clin Chem.* 2012;58:127–138.
17. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:391–398.
18. 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;27:1201–1206.
19. Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2006;109:179–187.
20. Niebauer J. Effects of exercise training on inflammatory markers in patients with heart failure. *Heart Fail Rev.* 2008;13:39–49.
21. Conraads VM, Beckers P, Bosmans J, De Clerck LS, Stevens WJ, Vrints CJ, Brutsaert DL. Combined endurance/resistance training reduces plasma TNF-alpha receptor levels in patients with chronic heart failure and coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2002;23:1854–1860.
22. Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, Kempf W, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:861–868.
23. Simpson KA, Singh MAF. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obes Silver Spring Md.* 2008;16:241–256.

24. Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A, Hildebrandt P. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2005;112:1756–1762.
25. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JPM, Schroen B, André S, Crijns HJGM, Gabius H-J, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3121–3128.
26. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1217–1224.
27. Lok DJ, Lok SI, Bruggink-André de la Porte PW, Badings E, Lipsic E, van Wijngaarden J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van der Meer P. Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*. 2013;102:103–110.
28. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, Piña IL, O'Connor CM. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circ Heart Fail*. 2012;5:72–78.
29. Ahmad T, Fiuzat M, Neely B, Neely ML, Pencina MJ, Kraus WE, Zannad F, Whellan DJ, Donahue MP, Piña IL, Adams KF, Kitzman DW, O'Connor CM, Felker GM. Biomarkers of myocardial stress and fibrosis as predictors of mode of death in patients with chronic heart failure. *JACC Heart Fail*. 2014;2:260–268.
30. Gullestad L, Ueland T, Kjekshus J, Nymo SH, Hulthe J, Muntendam P, Adourian A, Böhm M, van Veldhuisen DJ, Komajda M, Cleland JGF, Wikstrand J, McMurray JJV, Aukrust P, CORONA Study Group. Galectin-3 predicts response to statin therapy in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA). *Eur Heart J*. 2012;33:2290–2296.

31. Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, Adourian A, Muntendam P, Cohn JN. Baseline and serial measurements of galectin-3 in patients with heart failure: relationship to prognosis and effect of treatment with valsartan in the Val-HeFT. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:511–518.
32. Ahmad T, Pencina MJ, Schulte PJ, O'Brien E, Whellan DJ, Piña IL, Kitzman DW, Lee KL, O'Connor CM, Felker GM. Clinical implications of chronic heart failure phenotypes defined by cluster analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:1765–1774.
33. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, Tjønnå AE, Helgerud J, Slørdahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen Ø, Skjaerpe T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation.* 2007;115:3086–3094.
34. 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;111:1466–1469.
35. Walsh JT, Charlesworth A, Andrews R, Hawkins M, Cowley AJ. Relation of daily activity levels in patients with chronic heart failure to long-term prognosis. *Am J Cardiol.* 1997;79:1364–1369.
36. Meneghelo RS, Araújo CGS, Stein R, Mastrocolla LE, Albuquerque PF, Serra SM et al/Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(5 supl.1): 1-26.
37. Wasserman K, Sue D, Stringer W, Whipp B. Normal values. In: Principles of exercise testing and interpretation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 160–168.
38. Gitt AK, Wasserman K, Kilkowski C, Kleemann T, Kilkowski A, Bangert M, Schneider S, Schwarz A, Senges J. Exercise anaerobic threshold and ventilatory efficiency identify heart failure patients for high risk of early death. *Circulation.* 2002;106:3079–3084.

39. Leite JJ, Mansur AJ, de Freitas HFG, Chizola PR, Bocchi EA, Terra-Filho M, Neder JA, Lorenzi-Filho G. Periodic breathing during incremental exercise predicts mortality in patients with chronic heart failure evaluated for cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:2175–2181.
40. Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Activity monitoring for assessment of physical activities in daily life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86:1979–1985.
41. van Hees VT, van Lummel RC, Westerterp KR. Estimating activity-related energy expenditure under sedentary conditions using a tri-axial seismic accelerometer. *Obes Silver Spring Md.* 2009;17:1287–1292.
42. Brandes M, VAN Hees VT, Hannöver V, Brage S. Estimating energy expenditure from raw accelerometry in three types of locomotion. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44:2235–2242.
43. Rector TS, Cohn JN. Assessment of patient outcome with the Minnesota Living with Heart Failure questionnaire: reliability and validity during a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pimobendan. Pimobendan Multicenter Research Group. *Am Heart J.* 1992;124:1017–1025.
44. Carvalho VO, Guimarães GV, Carrara D, Bacal F, Bocchi EA. Validation of the Portuguese version of the Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:39–44.
45. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 2007;100:1164–1173.
46. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.* 2007;101:59–68.
47. Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology.* 2015;145:323–333.

48. Zheng L, Xu C-C, Chen W-D, Shen W-L, Ruan C-C, Zhu L-M, Zhu D-L, Gao P-J. MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:483–488.
49. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods San Diego Calif*. 2010;50:298–301.
50. Pereira DAG, Ribeiro-Samora GA, Vieira DSR, Pereira LSM, Coelho FM, Parreira VF, Moreira M da CV, Alencar MCN, Britto RR. Evaluation of the inflammatory response to two different intensities of exercise in individuals with heart failure. *Inflammation*. 2012;35:509–515.
51. Tisi PV, Hulse M, Chulakadabba A, Gosling P, Shearman CP. Exercise training for intermittent claudication: does it adversely affect biochemical markers of the exercise-induced inflammatory response? *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. 1997;14:344–350.
52. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med*. 2000;21:21–24.
53. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, Fallucca S, Alessi E, Letizia C, Jimenez A, Fallucca F, Pugliese G. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2010;20:608–617.
54. Ahmad T, Fiuzat M, Mark DB, Neely B, Neely M, Kraus WE, Kitzman DW, Whellan DJ, Donahue M, Zannad F, Piña IL, Adams K, O'Connor CM, Felker GM. The effects of exercise on cardiovascular biomarkers in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 2014;167:193–202.e1.

55. Kanamori S, Kai Y, Kondo K, Hirai H, Ichida Y, Suzuki K, Kawachi I. Participation in sports organizations and the prevention of functional disability in older Japanese: the AGES Cohort Study. *PLoS One*. 2012;7:e51061.
56. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010;39:133–144.
57. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285:17442–17452.
58. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654–659.
59. Fan K-L, Zhang H-F, Shen J, Zhang Q, Li X-L. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J*. 2013;65:12–16.
60. Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2014;19:135–141.
61. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116:258–267.
62. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Mending injured endothelium in chronic heart failure: a new target for exercise training. *Int J Cardiol*. 2013;166:310–314.
63. Witkowski S, Jenkins NT, Hagberg JM. Enhancing treatment for cardiovascular disease: exercise and circulating angiogenic cells. *Exerc Sport Sci Rev*. 2011;39:93–101.

64. Eleuteri E, Mezzani A, Di Stefano A, Vallese D, Gnemmi I, Delle Donne L, Taddeo A, Della Bella S, Giannuzzi P. Aerobic training and angiogenesis activation in patients with stable chronic heart failure: a preliminary report. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem.* 2013;18:418–424.
65. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83:376–382.
66. Askevold ET, Gullestad L, Dahl CP, Yndestad A, Ueland T, Aukrust P. Interleukin-6 signaling, soluble glycoprotein 130, and inflammation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2014;11:146–155.
67. Rogler G, Rosano G. The heart and the gut. *Eur Heart J.* 2014;35:426–430.