

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CONVÊNIO UFSCAR-UNESP

**REMODELAMENTO DO MIOCÁRDIO NO EXERCÍCIO COM  
COMPONENTE ANAERÓBICO**

ROBERTO MÁRIO MACHADO VERZOLA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração: Fisiologia, Convênio UFSCar-UNESP, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO CARLOS - SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

V574rm

Verzola, Roberto Mário Machado.

Remodelamento do miocárdio no exercício com  
componente anaeróbico / Roberto Mário Machado Verzola .  
-- São Carlos : UFSCar, 2005.  
96 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2004.

1. Fisiologia do exercício físico. 2. Remodelamento do  
miocárdio. 3. Cadeia pesada de miosina. 4.  
Metalopeptidases de matrizes. 5. Reação em cadeia de  
polimerase em tempo real. I. Título.

CDD: 612.04 (20<sup>a</sup>)

***ORIENTADORA***

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

***CO-ORIENTADOR***

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Dedico este trabalho:

À memória de meu pai, Mário,

À minha mãe, Cândida,

À minha esposa, Bernadete,

A meus filhos, Isabela, Ana Cândida, Mário Henrique, Roberto Mário e Antonio Augusto,

À minha irmã Maria Regina e meu cunhado Carlos Eduardo

A meus sobrinhos Maria Regina, Carlos Eduardo e Daniela.

## AGRADECIMENTOS

À Professora orientadora Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, agradeço pela confiança depositada, pelo apoio e encorajamento constantes desde o princípio, e cujo apreço, compreensão e amizade demonstrados ao longo destes anos de convívio agradável e produtivo foram fatores determinantes para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo A. Perez pelo estímulo e apoio para iniciarmos esta trajetória, pelas facilidades proporcionadas pelo Laboratório de Fisiologia do Exercício e pela co-orientação oferecida sempre com conhecimento e presteza.

Ao Prof. Dr. Vilmar Baldissera pela discussão de vários aspectos relacionados à fisiologia do exercício desta tese e em particular aqueles referentes à dosagem de lactato.

Ao amigo Prof. Dr. Sergio Mascarenhas de Oliveira, pelo incentivo para a continuação da nossa formação acadêmica, ao longo destes anos.

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pelas condições oferecidas para a preparação dos cortes histológicos e pela análise e discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Anselmo S. Moriscot pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP para executarmos a análise da expressão gênica da CPM beta através da RT-PCR em tempo real, bem como a colaboração na discussão dos resultados.

Aos demais colegas do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos, Keico Okino Nonaka, Francisco Tadeu Rantin, Wilson Franco e Ana Lúcia Kalinin, pelo interesse continuamente manifestado e pelo permanente incentivo.

À Profa. Dra Tânia de Fátima Salvini pela colaboração na discussão das análises histológicas.

Ao Oscar Henrique P. Ramos pelo auxílio na realização da análise estatística e de várias figuras deste trabalho e que de várias outras maneiras nos auxiliou com idéias e sugestões.

À Sabrina Peviani e Raquel Agnelli de Mesquita pela realização de várias das etapas experimentais referentes à expressão gênica da CPM beta e a análise da expressão de MMPs pela técnica de zimografia.

À Kelli Cristina Micocci, Marisa Cristina Rosante, Rita de Cássia Marquetti, Roselane Alves M. dos Santos, e ao Fabiano C. Ferreira e Rodrigo A. Martinez pelo auxílio na supervisão do treinamento dos animais.

Ao José Carlos Lopes, técnico do Laboratório de Fisiologia do Exercício do DCF pelo auxílio na supervisão do treinamento dos animais, e na coleta e dosagem de lactato, o que implicou em inúmeras horas de trabalho efetuadas além do expediente normal.

À Carmen Raquel V. Cornachione, secretária do DCF pela colaboração na elaboração das referências bibliográficas.

À Márcia Vidotti e Luciana Fernandes da Silva secretárias do Laboratório de Fisiologia do Exercício pela datilografia inicial de grande parte do manuscrito.

Ao Antonio Garcia Jr., técnico do Laboratório de Histologia do Prof. Anselmo Moriscot, pelo auxílio na realização do RT-PCR em tempo real.

Ao Sr. Laércio Luiz Ferreira, técnico do Departamento de Hidrobiologia/UFSCar, pela confecção das lâminas para análise histológica.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas: Márcia R. Cominetti, Oscar Henrique Pereira Ramos, Raquel Agnelli Mesquita, Mônica Rosas da Costa Iemma, Renner de Souza Leite, Cristina Helena B. Terruggi Caroline Krieger de Moraes, Ana Flávia V. Cardoso, Carmen Lúcia S. Pontes, Juliana Uema Ribeiro, Liliane T. Garcia Sánchez, Rita de Cássia Marquetti e à Sabrina Peviani pelos anos de convívio agradável e amigo dentro e fora do Laboratório.

À Irene Carmo Guimarães pela presteza e boa vontade em ajudar sempre que necessitamos.

À Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À minha esposa Bernadete, pelo companheirismo e encorajamento ao longo de todos estes anos e compreensão pelos momentos em que não pude estar em sua companhia. Aos meus filhos pelos maravilhosos seres humanos que são e representam um estímulo constante para o meu trabalho.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para este trabalho.

## ABREVIATURAS

**AIT** – após o início do treinamento

**BSA** – soroalbumina bovina

**CPM** – cadeia pesada de miosina

**DEPC** – dietilpirocarbonato

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetracético

**GAPDH** – gliceraldeído3-fosfato desidrogenase

**HE** – hematoxilina-eosina

**IAM** – infarto agudo do miocárdio

**IGF-I** – Fator de crescimento tipo insulina I

**MEC** – matriz extracelular

**M-MLV RT** – transcriptase reversa do vírus da leucemia de Moloney camundongos

**MMP** – metalopeptidase de matriz

**MOPS** – ácido 4-morfolinopropano sulfônico

**PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida

**PCR** – reação em cadeia da polimerase

**RT-PCR** – transcriptase reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase

**SDS** – dodecilsulfato de sódio

**TC** – ciclo limite (*threshold cycle*)

**TIMP** – inibidor tecidual de metalopeptidase

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

**TRE** – elemento responsivo aos hormônios tireoidianos

**Tris** – trihidroximetilamino metano

**VE** – ventrículo esquerdo

## RESUMO

Os componentes da matriz extracelular (MEC) são continuamente sintetizados e degradados a diferentes taxas em um processo chamado remodelamento envolvendo a expressão de metalopeptidases de matriz (MMPs) e seus inibidores específicos (TIMPs) em condições fisiológicas (crescimento, exercício) ou patológicas (hipertensão arterial, infarto do miocárdio). A expressão das cadeias pesadas de miosina (CPM)  $\alpha$  e  $\beta$  no miocárdio apresenta também plasticidade de resposta a estas condições fisiológicas e patológicas. Estudamos a influência do treinamento agudo de natação em ratos Wistar machos com 160 – 180 gramas, treinados seis horas por dia, em três sessões de duas horas por um até cinco dias consecutivos sobre a expressão de MMPs e CPM- $\beta$  comparadas ao grupo sedentários, além da variação da concentração de lactato sanguíneo e da relação peso do coração/peso corpóreo. Esta mostrou variação significativa no grupo treinado 96 horas ( $p < 0,05$ ) e 120 horas ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle. As concentrações de lactato após o exercício foram significativamente maiores para todos os dias de treinamento. A análise da expressão da CPM  $\beta$  em tempo real mostrou aumento significativo do grupo 120 horas ( $p < 0,01$ ). Zimografia dos extratos protéicos em gel SDS 12% com gelatina mostrou banda de atividade de massa molecular 66 kDa em todas amostras (controle e treinados) e com aumento de atividade quanto maior o tempo de treinamento, estatisticamente significantes com 72 horas ( $p < 0,05$ ) e 96 e 120 horas ( $p < 0,001$ ). Concluindo, os corações de pequenos roedores podem ser precocemente condicionados bioquímica e funcionalmente após um programa de exercício agudo de natação com componente anaeróbio.

## ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) components are continuously synthesized and degraded at distinct rates in a process called remodeling involving the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in physiological (growth, exercise) or pathological (high blood pressure, myocardial infarction) conditions. The expression of myosin heavy chain (MHC)  $\alpha$  and  $\beta$  in the myocardium also changes in response to physiological (exercise) and pathological (energy deprivation, hypothyroidism, diabetes mellitus, hypertension) stimulus. The aim of this work was to study the influence of acute swimming training in Wistar male rats (160-180g) for 6hr/day, in 3 sessions of 2 hr each for 1 to 5 consecutive days, on the MMPs and MHC  $\beta$  expression, compared to the sedentary control group. Blood lactate concentration and heart weight/body weight relation were also determined. Heart weight was increased in relation to body weight in the groups that trained for 4 ( $p<0.05$ ) and 5 days ( $p<0.01$ ). Blood lactate levels after all training sessions were significantly increased in all days. Morphological analysis showed no alterations or inflammatory signs compared to controls. The expression of MHC  $\beta$  was analyzed by real time RT-PCR showing that it was significantly increased only after 5 days of training ( $p<0.01$ ). After 4 days, a tendency to increase was observed but it was not significant. Zymography analysis of muscle extracts indicated a single 66kDa activity band that was significantly increased after 3 ( $p<0.05$ ), 4 and 5 days ( $p<0.001$ ) and this activity was enhanced in proportion to the duration of training. In conclusion, the heart of small rodents may be biochemical and functionally early conditioned after an acute program of swimming with an anaerobic component.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>02</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
Grupos experimentais e protocolo de treinamento.....	29
Preparação das amostras para análise morfológica.....	32
Determinação da concentração de lactato sanguíneo.....	32
Preparação de materiais livres de RNase.....	33
Extração de RNA total.....	33
Eletroforese em gel de agarose-formaldeído .....	34
Quantificação de RNA por espectrofotometria.....	35
Desenho dos “primers” .....	35
RT-PCR em tempo real.....	37
Obtenção do cDNA a partir de RNA total.....	37
PCR em tempo real.....	38
Dosagem de proteínas.....	39
Zimografia.....	40
Análise estatística.....	41
<b>RESULTADOS</b>	
Variação do peso corporal.....	43
Variação da relação peso coração/peso corporal.....	43
Variação da relação peso sóleo/peso corporal.....	44
Análise morfológica.....	44

Dosagem de lactato.....	48
Extração do RNA total do ventrículo esquerdo.....	54
RT-PCR.....	55
Análise da expressão da CPM- $\beta$ por PCR em tempo real.....	55
Expressão de proteases por zimografia.....	58
Análise estatística.....	61
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## *INTRODUÇÃO*

## **Matriz extracelular e remodelamento**

A matriz extracelular (MEC) serve como substrato para a adesão celular, sendo responsável pelo alinhamento das células e pela integridade estrutural do tecido; é também um ambiente crítico de sinalização celular. No músculo cardíaco, o conteúdo e a composição dos componentes da matriz extracelular contribuem para determinar as propriedades físicas, mecânicas e funcionais do tecido cardíaco. A MEC do miocárdio é formada principalmente por uma rede de colágeno tipos I e II, (Weber, 2001), sintetizados por fibroblastos presentes no tecido cardíaco.

Os miócitos estão envoltos por uma rede fibrilar de colágeno e arrançados em feixes musculares, os quais também são circundados por esta rede que apresenta estrutura bastante complexa e de hierarquia bem definida (Walker e Spinale, 1999). Esta estrutura tem papel fundamental na manutenção da geometria ventricular durante o processo de crescimento cardíaco. (Weber, 2001). Os miócitos cardíacos são envoltos pela matriz extracelular cardíaca que contém uma substância intercelular amorfa, a rede de colágeno fibrilar e elastina. As células não miócíticas incluem fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas dos vasos e endotélio vascular. Os miócitos cardíacos correspondem a 75% do volume do miocárdio embora representem menos de 40% das células miocárdicas. Por sua vez o colágeno corresponde de 2 a 3 % do total de proteínas do coração humano (Tyagi, 1997).

A membrana basal vascular é composta principalmente por colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanas. O colágeno é sintetizado principalmente pelos fibroblastos, mas pode ser produzido também pelas células musculares lisas das paredes dos vasos, dependendo de determinados estímulos patológicos como, por exemplo, o

estresse mecânico produzido pela hipertensão arterial (Lee e col., 2001). A maioria das vias sinalizadoras da hipertrofia miocítica também promove a hiperplasia de fibroblastos tendo, portanto, efeito na produção do colágeno. Corações hipertrofiados e insuficientes exibem, freqüentemente, aumento significativo da fibrose intersticial, a qual enrijece o ventrículo e perturba de forma negativa a função diastólica e, posteriormente, deprime a função sistólica (Weber e col., 1989; Janicki e Matsubara, 1994).

Os efeitos do acúmulo anormal de colágeno no miocárdio sobre a função do músculo são conhecidos há várias décadas. Em 1971, Bing observou que o aumento de 31% na concentração de hidroxiprolina - um indicador do conteúdo de colágeno do tecido - causava aumento de 50% na rigidez passiva do músculo papilar de ratos com estenose aórtica supra-avalvar.

Holubarsh e colaboradores (1983) observaram a mesma associação em diversos modelos experimentais de sobrecarga de pressão em ratos e, mais recentemente Matsubara e colaboradores (2000), relataram a associação entre o aumento da concentração miocárdica de hidroxiprolina e aumento da rigidez passiva do músculo papilar do rato, na presença e na ausência de hipertrofia miocárdica, sugerindo que, na ausência de isquemia, o componente intersticial é mais importante na determinação das características passivas do músculo do que a massa muscular propriamente dita.

Por outro lado, a destruição do colágeno cardíaco que pode acontecer com o aumento da atividade colagenolítica, resulta em múltiplas conseqüências adversas para a arquitetura e o funcionamento do miocárdio, como por exemplo, a dilatação cardíaca e a progressão para a insuficiência cardíaca, em várias condições clínicas.

Em condições fisiológicas os componentes da matriz extracelular são continuamente sintetizados e degradados a diferentes taxas, em um processo chamado

de remodelamento. Este é um processo altamente regulado uma vez que a integridade do miocárdio e da membrana vascular basal é fundamental para o funcionamento adequado do coração. Alterações no metabolismo da MEC são encontradas na vasta maioria das formas de doenças vascular e cardíaca (Laurent, 1987).

Os componentes da MEC comunicam-se com o citoesqueleto no interior das células através de receptores denominadas integrinas. A ligação dos componentes da MEC às integrinas resulta na transdução de sinais mediados inicialmente por fosforilação de determinadas proteínas e finalmente na ativação de fatores de transcrição da família Ets (Crowe e Shuler, 1999). Estes fatores de transcrição irão ativar a expressão de determinados genes envolvidos no remodelamento tecidual. A região promotora dos genes da maioria dos colagenases possui elementos regulatórios reconhecidos por fatores de transcrição Ets (Tremble e col., 1995; Higashino e col., 1995).

O metabolismo do colágeno no coração é um processo dinâmico que envolve a sua degradação por proteases. Metalopeptidases de matriz extracelular (MMPs) são membros de uma família de enzimas dependentes de zinco, que degradam componentes específicos da matriz extracelular (Nelson e col., 2000). Pelo menos 20 diferentes MMPs já foram identificadas, e a maioria destas enzimas são secretadas como zimogênios inativos que requerem ativação no espaço extracelular por tripsina ou plasmina (Tabela 1). Várias MMPs tem domínios transmembrana e podem agir como proteases ao nível da membrana celular.

As MMPs são firmemente reguladas em vários níveis, incluindo transcrição, tradução, secreção, ativação dos zimogênios para a protease ativa, e através de inibidores protéicos endógenos chamados inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (Brew e col., 2000).

**Tabela 1. Substratos das Metalopeptidases de Matriz**

MMP	Colágeno Intersticial	Membrana Basal	Elastina	Proteínas Extra-matriz
<b>Colagenases</b>				
MMP-1	III > I > (+/-II); VII, X	+/- FN, LN, EN, PG	-	L-selectina
MMP-8	I > III > II; (?VII, X)	+/- FN, LN, EN, PG	-	
MMP-13	II > I, III; GL(?VII, X) e telopeptidase.	+/- FN, LN, EN, PG	-	
<b>Stromelisinases</b>				
MMP-3	-	FN, LN, EN, PG, +/- PS col IV	+/-	Fator de crescimento tipo EGF e plasminogênio
MMP-10 <sup>§</sup>	-	FN, LN, EN, PG, +/- OS col IV	+/-	
<b>Similares as Stromelisinases</b>				
MMP-7	-	FN, LN, EN, PG,	+	Enzimas tipo estromelisinases são mais potentes para converter plasminogênio em angiostatina e degradar a $\alpha_1$ AT.
MMP-9	-	FN, LN, EN, PG, PS col IV	++	
<b>Gelatinases</b>				
MMP-2	GL, I, VII, X, XI	col IV/V, FN, LN, EN, PG, PS	++	
MMP-10 <sup>§</sup>	GL	col IV/V, FN, LN, EN, PG, PS	++	
<b>Sítios de reconhecimento da Furina</b>				
MMP-11*	-	-	-	
<b>Tipo membrana</b>				
MMP-14 <sup>#</sup>	+/- I > III, II	FN, LN, EN, PG		
MMP-15		FN, LN, EN, PG		
MMP-16	?			
MMP-17	?			
<b>Descritas mais recentemente</b>				
Enamolsina	GL(amelogenina)	?	?	?

Estes substratos indicam funções biológicas potenciais, mas os verdadeiros substratos fisiológicos *in vivo* são desconhecidos. <sup>§</sup>A MMP-10 tem as mesmas especificidades que a MMP-3, mas é menos potente. \*A enzima humana não é cataliticamente ativa para os componentes conhecidos da MEC. <sup>#</sup>A proteína recombinante solúvel foi testada.  $\alpha_1$ AT,  $\alpha_1$  antitripsina; EN, entactina; FN, fibronectina; GL, gelatina; col IV/V, colágenos tipos IV e V; LN, laminina; PG, proteoglicano; PS col IV, colágeno tipo IV tratado com pepsina (*modificado de Shapiro, 1998*).

O colágeno é altamente resistente à proteólise devido à sua estrutura rígida; as únicas metalopeptidases capazes de degradá-lo são as colagenases MMP-1 e MMP-8

(Docherty e Murphy; 1990; Knauper e col., 1990). A MMP-1 tem como substrato preferencial o colágeno tipo III e a MMP-8 tem como substrato preferencial o colágeno tipo I. Estas peptidases clivam o colágeno em determinados sítios, gerando fragmentos de colágeno chamados gelatinas; estas últimas rapidamente se desenovelam e podem ser degradadas por proteases menos específicas denominadas gelatinases, tais como MMP-2, MMP-9, MMP-3 e também por serino proteases (Cleutjens e col., 1995).

O remodelamento estrutural extracelular ocorre como uma resposta compensatória do tecido a uma condição patológica, como por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica, a aterosclerose vascular, o enfarto do miocárdio e as miocardiopatias das mais diversas etiologias. Por exemplo, evidências recentes implicam a família das MMPs como mediadores potenciais da dilatação cardíaca e da progressão para a insuficiência cardíaca. Estas evidências são baseadas em várias linhas de investigação (Lee, 2001).

Primeiro, os membros da família das MMPs tem expressão aumentada no miocárdio tanto em condições experimentais como em situações clínicas, como lesão miocárdica, enfarto do miocárdio e dilatação cardíaca, juntamente com os TIMPs 1 e 2, citocinas e outros fatores que induzem expressão gênica de MMPs como por exemplo o indutor endógeno de MMP-EMMPRIN (Li e col., 2000a e b, Spinale e col., 2000, Thomas e col. 1998). Entretanto, importantes diferenças no perfil das MMPs e dos TIMPs podem existir na miocardiopatia isquêmica em relação à aquelas de origem não isquêmica, um fator que pode ser crítico no planejamento de estratégias de inibição seletiva de MMPs. Por exemplo: tanto a MMP 9 como a MT1-MMP (uma MMP tipo membrana) estão aumentadas em ambas as formas de miocardiopatias, de origem isquêmica e não isquêmica, enquanto que as MMP2 e MMP3 estão preferencialmente aumentadas nas miocardiopatias de origem não isquêmica (Spinale e col, 2000). Em

segundo lugar, a expressão aumentada de pelo menos uma MMP (MMP-1) nos corações de camundongos transgênicos pode causar hipertrofia cardíaca, dilatação e disfunção sistólica (Kim e col., 2000). Terceiro, estudos de vários laboratórios com modelos experimentais diferentes indicam que a inibição das MMPs através de pequenas moléculas ou transferência de genes de inibidores endógenos afeta favoravelmente o remodelamento cardíaco (Spinale e col., 1999).

As MMPs podem também mediar as cardiomiopatias dilatadas induzidas por citocinas. A expressão aumentada do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no coração provoca dilatação ventricular, fibrose e insuficiência cardíaca com aumento concomitante da MMP-2 e MMP-9. A liberação de TNF é mediada por uma outra classe de MP. O tratamento anti TNF-  $\alpha$  pela expressão aumentada do receptor solúvel TNF- $\alpha$  Tipo I atenuou a atividade da MMP e preveniu a síntese ulterior do colágeno. (Li e col., 2000a). Assim as MMPs podem mediar a insuficiência cardíaca induzida por citocinas, reforçando a evidência de que a inibição das MMPs possam ter larga utilização na prevenção da insuficiência cardíaca (Spinale, 1999).

A MMP-9 é expressa de forma aumentada pelo infiltrado de leucócitos no pós-infarto agudo do miocárdio (pós IAM) imediato e posteriormente pelas células do estroma. Heymans e colaboradores (1999) descreveram uma redução na ruptura cardíaca, o que sugere um importante papel da MMP-9 na organização do colágeno. A deleção dirigida (targeted deletion) foi usada para investigar o papel da MMP-9 no remodelamento pós-enfarto. Ducharme e colaboradores (2000) constataram que a deleção da MMP-9 atenuou dramaticamente a dilatação do VE nos primeiros dias após o IAM e também alterou a natureza da fibrose, com colágeno mais denso e em maior quantidade no tipo selvagem.

O mecanismo responsável pelas alterações no metabolismo do colágeno é ainda desconhecido. Existem evidências bioquímicas e morfológicas de que a atividade colagenolítica se inicia poucas horas após a isquemia e o infarto agudo do miocárdio e persiste por três a quatro dias (Cleutjeus e col., 1995). A perda da identidade das fibras de colágeno resulta no deslizamento dos miócitos, distensão dos sarcômeros, estreitamento das paredes vasculares, dilatação cardíaca e discinesia (Cannon e col., 1983).

A síntese e secreção de pró-MMPs são reguladas por diversas citocinas e fatores de crescimento, inclusive o fator de necrose tumoral  $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF). Torre-Amirone e colaboradores (1996), detectaram a presença de níveis elevados de TNF- $\alpha$  na insuficiência cardíaca congestiva, o que poderia contribuir para o aumento da expressão de MMPs que levariam ao quadro de remodelamento patológico do coração. O colágeno fibrilar seria degradado pelas MMPs, e substituído por um colágeno de baixo teor de ligações cruzadas, levando ao enfraquecimento e dilatação da parede ventricular (Gunja-Smith e col., 1996).

### **Exercício e transferência de energia**

No que concerne à atividade física, julgamos necessário introduzir alguns conceitos referentes à intensidade do exercício e as implicações decorrentes para a transferência de energia no mesmo que, em última análise, irão caracterizá-lo como exercício aeróbico ou aeróbico-anaeróbico (ou exercício aeróbico com componente anaeróbico).

A primeira etapa da degradação da glicose em uma série de reações de fermentação denominadas coletivamente glicólise ou vias de Embden – Meyerhof,

(Bodner, 1986) ocorre no meio aquoso da célula, fora da mitocôndria; estas reações representam uma forma mais primitiva de transferência rápida de energia, bem desenvolvida em anfíbios, répteis, peixes e animais marinhos. No início do catabolismo da glicose, que é o primeiro substrato energético a ser utilizado na atividade física, a glicólise gera energia anaeróbica.

Nos seres humanos a capacidade da célula em termos de glicólise é crucial durante as atividades físicas que exigem um esforço máximo com duração de até 90 segundos. A regulação da glicólise depende da concentração das enzimas glicolíticas-chave, hexocinase, fosfofrutocinase, piruvatocinase, dos níveis do substrato frutose -1 - 6, difosfato e do oxigênio que, em grandes quantidades inibe a glicólise.

A glicose fica localizada no líquido extracelular adjacente para ser transportada através da membrana plasmática da célula por um processo de difusão facilitada mediado por uma família de cinco proteínas denominada coletivamente de transportadores facilitativos. As fibras musculares e os adipócitos contêm um transportador que depende da insulina conhecido como GLUT-4. Em resposta a insulina e à atividade física (independente da insulina), o GLUT-4 migra das vesículas dentro da célula para a membrana plasmática e sua ação facilita o transporte de glicose para o interior do sarcoplasma, onde é utilizada para a formação de ATP; outro transportador de glicose, o GLUT-1 é responsável pelos níveis basais de transporte de glicose para o interior do músculo (McArdle, Kats e Kats 2003).

Existe oxigênio suficiente no líquido intersticial que envolve as células nos níveis leve a moderado do metabolismo energético. Conseqüentemente, os hidrogênios (elétrons) retirados dos substratos e carreados pelo NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) que é a coenzima da enzima desidrogenase, são oxidados dentro das mitocôndrias para formar água quando se unem com o oxigênio. Sob o aspecto

bioquímico, existe um estado estável ou, com maior exatidão uma situação estável, pois o hidrogênio é oxidado com a mesma velocidade com que se torna disponível. Os bioquímicos se referem a essa condição dinâmica relativamente estável como glicólise aeróbica, com o piruvato como produto terminal (McArdle, Kats e Kats 2003).

No exercício extenuante, quando a demanda de oxigênio ultrapassa tanto o suprimento de oxigênio quanto seu ritmo de utilização, a cadeia respiratória não consegue processar todo o hidrogênio ligado ao NADH. A liberação contínua de energia anaeróbica na glicólise depende da disponibilidade de NAD<sup>+</sup> para oxidar o 3-fosfogliceraldeído a 1 – 3 difosfoglicerato; caso contrário o ritmo rápido da glicólise se esgota. Durante a glicólise anaeróbica, o NAD<sup>+</sup> é liberado à medida que pares de hidrogênio não oxidados em excesso se combinam temporariamente com o piruvato para formar ácido láctico; esta formação de lactato requer uma etapa adicional catalizada pela enzima desidrogenase numa reação reversível (McArdle, Kats e Kats, 2003).

É o acúmulo de lactato, e não apenas sua produção, que anuncia o metabolismo energético anaeróbico. Durante o repouso e o exercício moderado algum lactato é formado através do metabolismo energético das hemáceas que não contém mitocôndrias e também devido às limitações impostas pela atividade enzimática nas fibras musculares com uma alta capacidade glicolítica (fibras de contração rápida). Entretanto, qualquer lactato assim formado será oxidado prontamente nas fibras musculares vizinhas com uma alta capacidade oxidativa ou nos tecidos mais distantes como o coração; conseqüentemente o lactato não se acumula, pois o seu ritmo de remoção é igual ao seu ritmo de produção. Os atletas de endurance mostram uma maior capacidade de eliminação (remoção) de lactato durante o exercício (MacRae HS-H e cols., 1992). O armazenamento temporário de hidrogênio como lactato representa um aspecto singular

do metabolismo energético, pois proporciona um reservatório de prontidão para o armazenamento temporário dos íons hidrogênio.

Uma vez formado o lactato no músculo, ele se difunde rapidamente para o espaço intersticial e o sangue para ser tamponado e removido do local da sua produção e dessa forma a glicólise continua fornecendo energia anaeróbica para a ressíntese de ATP. No entanto, esta via para a energia extra é temporária, pois os níveis sanguíneos e musculares de lactato aumentam e a regeneração do ATP não consegue acompanhar seu ritmo de utilização; a fadiga se instala e diminui o desempenho no exercício. A maior acidez intracelular e outras alterações medeiam a fadiga pela inativação de várias enzimas na transferência de energia e pela deterioração das propriedades contráteis do músculo ( Bertocci LA, Gollnick PD, 1985; Carins SP, e cols, 1998; Hogan MC e cols, 1995; Mainwood GW e Renaud JM, 1985). Entretanto, a maior acidez (pH mais baixo) não explica, por si só, a redução na capacidade de realizar exercícios durante um esforço físico intenso (Jacobs I e cols, 1993).

O lactato não deve ser encarado como um produto de desgaste metabólico, mas, ao contrário, é uma valiosa energia química que se acumula como resultado do exercício intenso. Quando se torna novamente disponível uma quantidade suficiente de oxigênio durante a recuperação, ou quando o ritmo de exercício diminui, o NAD<sup>+</sup> remove os hidrogênios ligados ao lactato para subsequente oxidação a fim de fornecer ATP.

Os esqueletos de carbono das moléculas de piruvato formadas novamente a partir do lactato durante o exercício serão oxidadas para a obtenção de energia ou serão sintetizados (transformados) em glicose no ciclo de Cori no fígado e nos rins. O ciclo de Cori não serve apenas para remover o lactato, mas o utiliza também para reabastecer as reservas de glicogênio depletadas no exercício intenso (Sumida KD e cols., 1993).

No exercício extenuante com um catabolismo elevado de carboidratos o glicogênio dentro dos tecidos inativos torná-se disponível para atender as necessidades do músculo ativo. Essa remoção ativa do glicogênio através do reservatório permutável de lactato progride à medida que os tecidos ativos lançam lactato na circulação. O lactato é um precursor gliconeogênico capaz de sintetizar os carboidratos (através do ciclo de Cori) que irá permitir a homeostasia da glicose sanguínea e atender as demandas energéticas do organismo (Brooks GA., 1994; MacRae HS-H e cols., 1992).

As reações anaeróbicas de glicólise liberam apenas cerca de 10% da energia existente na molécula original de glicose. A extração de energia restante prossegue quando o piruvato é transformado irreversivelmente em Acetil-CoA (que é uma forma de ácido acético) e este penetra no ciclo do ácido cítrico (também chamado ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos ) que é o segundo estágio do fracionamento dos carboidratos (Bodner GM., 1986). O ciclo do ácido cítrico degrada o substrato do Acetil-CoA para dióxido de carbono e átomos de hidrogênio dentro das mitocôndrias. O ATP é formado quando os átomos de hidrogênio são oxidados durante o transporte de elétrons – fosforilação oxidativa.

O metabolismo aeróbico refere-se às reações catabólicas geradoras de energia nas quais o oxigênio funciona como um aceptor final de elétrons na cadeia respiratória e se combina com o hidrogênio para formar água. O oxigênio não participa diretamente na síntese de ATP, mas a presença de oxigênio no final da linha determina em grande parte a capacidade para a produção de ATP que por sua vez determina e a possibilidade de manter um exercício de endurance de alta intensidade.

Após estas considerações, podemos conceituar o exercício aeróbico como aquele de intensidade leve a moderada que não implica em acúmulo de lactato. Por sua vez, o exercício aeróbico com componente anaeróbico é aquele de grande intensidade que gera

um acúmulo de lactato que será removido durante o período de recuperação ou quando o exercício diminui significativamente de intensidade.

### **Remodelamento do miocárdio no exercício**

É muito limitado o que se conhece a respeito do remodelamento induzido pelo exercício. Diversos estudos demonstraram que o treinamento físico prolongado induz uma resposta adaptativa do organismo que inclui a hipertrofia cardíaca. O crescimento miocárdico depende fundamentalmente da hipertrofia, ou seja, do aumento do tamanho celular, pois o cardiomiócito adulto é terminalmente diferenciado e há poucas evidências de capacidade de divisão celular em condições normais após o nascimento (Anversa e col, 2002). Como já citado, os miócitos cardíacos ocupam 75% do volume do miocárdio embora representem 40% ou menos do número total de células e assim o aumento do tamanho celular é efetivo para o crescimento do órgão como um todo (Weber, 2001). A hipertrofia miocárdica pode ocorrer de forma fisiológica ou patológica. A primeira é aquela observada durante o crescimento miocárdico no período embrionário, durante o crescimento no período pós-natal, na senescência e também no crescimento associado ao treinamento físico (Lorell e col, 2000). Quando, por outro lado, o coração é submetido à sobrecarga crônica de pressão a hipertrofia miocárdica é dita patológica e é um dos principais mecanismos de adaptação do miocárdio à nova condição, pois o espessamento da parede muscular tem o efeito de normalizar o estresse sistólico ventricular, possibilitando a ejeção normal apesar da sobrecarga hemodinâmica (Thiedemann e col., 1983; Lorrell e col, 2000). No entanto, a hipertrofia miocárdica constitui-se em fator independente de risco de morte súbita, infarto do miocárdio e desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Os pacientes hipertensos e com hipertrofia

miocárdica detectada pelo eletrocardiograma e/ou pelo ecocardiograma têm risco cardiovascular aumentado independente dos níveis de pressão arterial (Frohlich, 1998).

Um dos primeiros trabalhos a abordar a hipertrofia cardíaca e outras alterações induzidas pelo exercício foi o de Hickson e colaboradores (1979), que estudaram essas variáveis em ratas após treinamento por natação. Estes autores observaram aumento do peso do coração e do total de proteínas um dia após o início do programa de natação e que se tornaram estatisticamente significativos a partir do segundo dia. O aumento total do peso do coração induzido pelo exercício ocorreu dentro de 14 dias e chegou a 30% quando comparado ao do grupo controle. O período médio de desenvolvimento desta significativa hipertrofia foi de cinco dias após o início do treinamento de sete dias consecutivos. Observaram também um rápido aumento no conteúdo do RNA do ventrículo em resposta ao exercício, que ocorreu mais rapidamente que o aumento do peso do coração; como consequência a concentração de RNA elevou-se significativamente após o 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>. e o 3<sup>o</sup>. dias de exercício. Daí em diante, a concentração de RNA retornou ao nível controle, mas o conteúdo total de RNA do coração permaneceu significativamente elevado. O aumento no conteúdo total de citocromo C no coração, usado como marcador mitocondrial, ocorreu com um discreto retardo em relação ao aumento do peso do coração e só se tornou estatisticamente significativo 5 dias após o início do programa de natação. No entanto, nem a concentração de citocromo C nem a concentração total de proteína, alteraram-se de forma significativa em resposta ao programa de treinamento.

Foi constatada, também, hiperplasia do tecido conjuntivo, e a concentração de hidroxiprolina foi medida para avaliar os efeitos do exercício no conteúdo de colágeno dos ventrículos. A hidroxiprolina é encontrada exclusivamente no colágeno, do qual representa uma porcentagem definida, em peso. Observou-se que a concentração de

hidroxiprolina, apresentava uma queda pequena e progressiva durante as primeiras duas semanas do programa de natação, enquanto os ventrículos estavam se hipertrofiando. Quando o peso do coração se estabilizou a concentração de hidroxiprolina se manteve estável a um nível significativamente abaixo daqueles achados nos corações dos controles sedentários; no entanto, o conteúdo total de hidroxiprolina do coração aumentou aproximadamente 10% e não diminuiu significativamente durante a regressão da hipertrofia cardíaca.

Estudos laboratoriais da função celular também revelaram genes cuja expressão é diretamente alterada pelo exercício. Genes que codificam intermediários da cascata de sinalização da insulina, intermediários do metabolismo energético, pró-colágenos e enzimas que processam o colágeno, enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e dos lipídeos e outros, demonstraram alterações nos níveis de expressão subseqüentes ao exercício (Cortright e col., 1999; Han e col., 1999; Kim e col., 1999; Kuo e col., 1999).

Com as novas tecnologias disponíveis para a pesquisa da expressão gênica diferencial, como a técnica dos microensaios (microarrays) utilizando micro chips, que estão se tornando mais acessíveis e mais empregadas, espera-se que um número crescente de genes cuja expressão seja modificada pelo exercício possa ser identificado.

Foi demonstrado que a tensão é um estímulo importante da expressão gênica no músculo esquelético e que uma variante recentemente identificada do IGF-I (fator de crescimento mecânico) é responsável pelo reparo tecidual local e a manutenção e remodelamento dos músculos submetidos a tensão (Goldspink, 1998; McKoy e col., 1999; Yang e col., 1997). Estes pesquisadores mostraram também que o tipo e a duração do exercício experimentado pelos músculos envolvidos no exercício regulam a expressão dos genes das várias isoformas da cadeia pesada da miosina que, em última análise, vão determinar o fenótipo da fibra muscular. Esta é uma das maneiras pela qual

o tecido muscular pode se adaptar a um tipo específico de atividade física (Goldspink e col., 1999; Yang e col., 1996).

O exercício pode também influenciar a expressão gênica através de alterações provocadas pela atividade física e que modulam a ligação de proteínas nucleares ou a translocação de fatores de transcrição ao núcleo, tais como as flutuações dos níveis de catecolaminas circulantes, a liberação dos sinais dos neurotransmissores ou a conversão da utilização de substratos energéticos (Fiebig e col., 1999; Skerry, 1999).

Os mecanismos moleculares que determinam a hipertrofia cardíaca no exercício não são bem conhecidos, mas envolvem o aumento da atividade de genes relacionados com o remodelamento do miocárdio. Por outro lado, não está claro como este remodelamento envolve a expressão de genes que codificam os diferentes tipos de miosina cardíaca.

### **Miosina, estrutura e expressão diferencial**

A miosina é uma proteína largamente disseminada e altamente conservada em todas as células eucarióticas onde provê a função motora para diversos movimentos, como citocinesia (movimentação celular), fagocitose e contração muscular. A miosina interage com a actina para gerar a força para os movimentos celulares que vão desde a movimentação celular até a contração muscular.

Os genomas dos vertebrados contem muitos genes que codificam classes distintas de miosinas, incluindo as miosinas convencionais com duas cabeças bem como isoformas não convencionais de cabeça única que são expressas de uma maneira regulada durante o desenvolvimento de alguns tecidos específicos. Devido ao grande número de moléculas identificadas até agora, as miosinas foram divididas em sete

classes distintas, baseadas nas propriedades do seu domínio amino terminal (cabeça motora).

Uma destas classes, a classe II de miosinas, é uma miosina convencional que existe como uma proteína hexamérica consistindo de duas sub-unidades de miosina de cabeça pesada (CPM) de 200 kDa cada, e de dois pares de sub-unidades não idênticas de cadeia leve de 17-23 kDa cada; estas últimas tem importantes papéis modulatórios durante a contração muscular. A CPM por sua vez, é responsável tanto pela função motora como a de formação do filamento da molécula intacta da miosina. A sub-unidade CPM pode ser dividida em dois domínios funcionais: um globular, o domínio da cabeça amino terminal, que contém a função motora, e um domínio carboxil alongado, com forma de um bastão e enrolado como uma alfa-hélice, que contém as propriedades formadoras de filamento da miosina (Figuras 1 e 2).

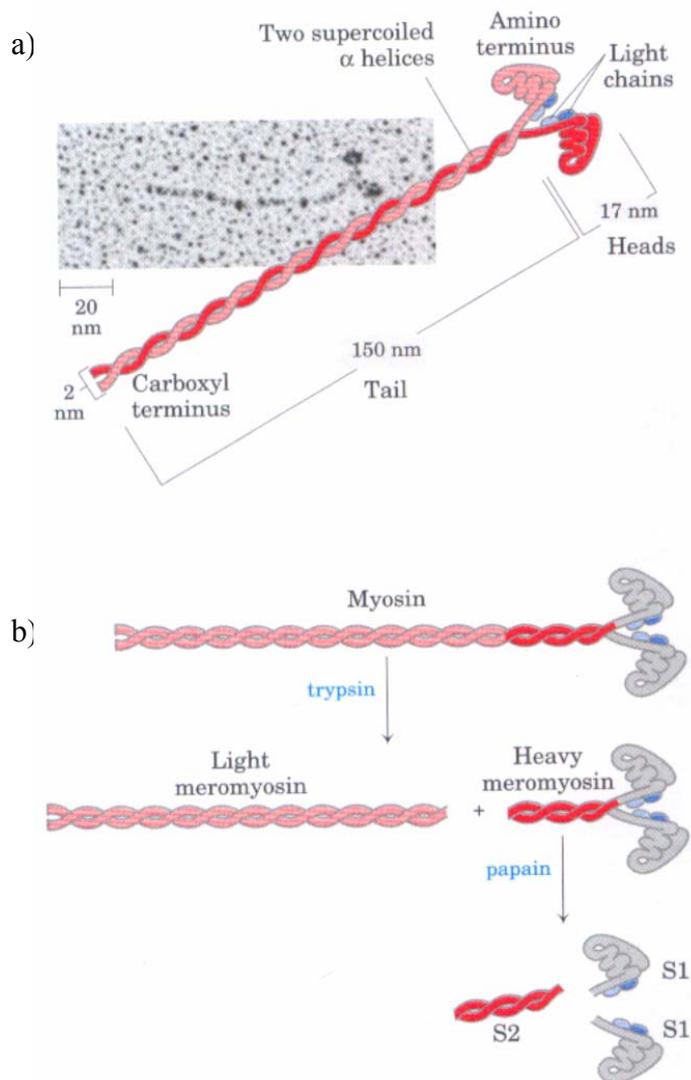


Figura 1. Estrutura da miosina. a) A miosina II é formada por duas cadeias pesadas (rosa e vermelho); a extremidade carboxílica forma uma extensão enovelada (cauda) e o N-terminal possui o domínio globular (cabeça). Duas cadeias leves (azul claro e escuro) estão associadas com cada domínio globular da miosina. b) A clivagem com tripsina e papaína separa as partes globulares (fragmentos S1 e S2) das caudas. (retirado de Nelson e Cox, 2000).

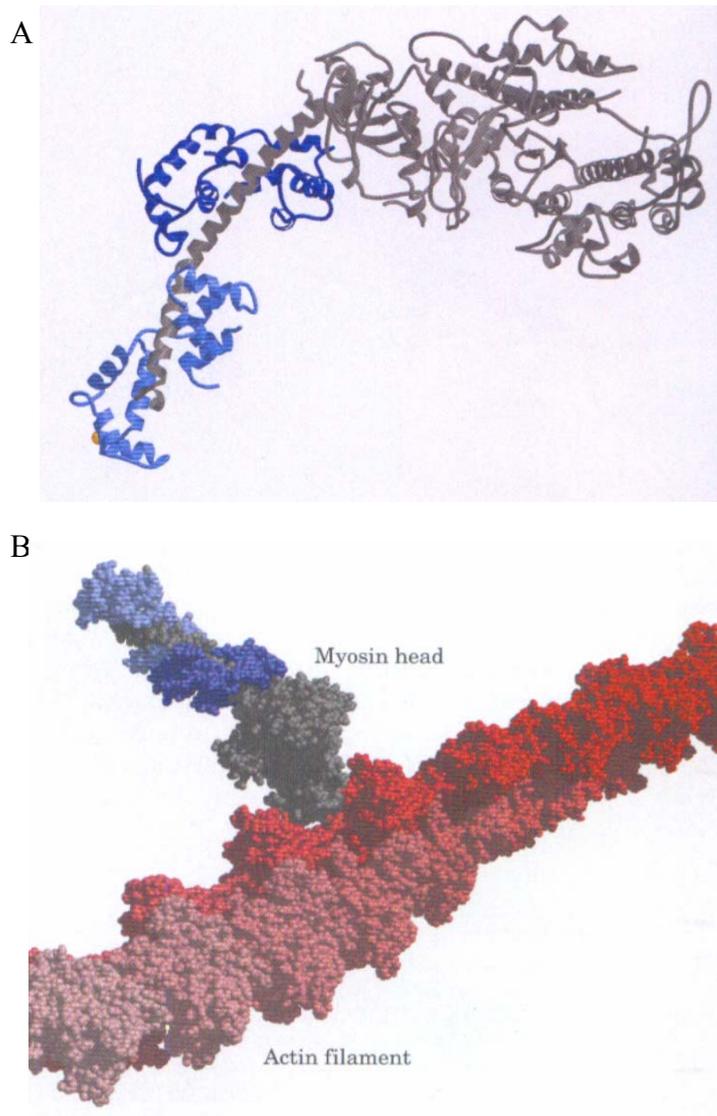


Figura 2. A) Modelo de fitas da interação das cadeias leves (azul claro e escuro) com o domínio globular da cadeia pesada da miosina. B) Modelo de preenchimento espacial da interação de um filamento de actina (vermelho) com uma “cabeça” de miosina (cinza e azul) ligada a um monômero de actina dentro do filamento (retirado de Nelson e Cox, 2000).

Seqüências clonadas foram obtidas de genes de CPM expressos em músculo tanto liso como estriado, assim como em vários tipos celulares não musculares. As miosinas expressas nestes tipos celulares compreendem três classes gerais de miosina:

- a) miosina de músculo liso, b) miosina de músculo estriado, c) miosinas não musculares.

Embora a família completa de genes da CPM de mamíferos ainda não tenha sido completamente determinada, pelo menos treze genes já foram descritos. Estes incluem três genes para CPM de células não musculares, dois genes de CPM de músculo liso, e pelo menos oito genes de CPM de músculo estriado. A miosina é a mais abundante proteína expressa nas células musculares estriadas, compreendendo aproximadamente 25% do conteúdo protéico total do músculo (Baldwin e Haddad, 2001).

A miosina nativa faz o papel tanto de uma proteína estrutural como de uma proteína regulatória, já que forma a estrutura do sarcômero constituindo o aparelho contrátil. Através da sua interação com outra proteína do sarcômero, a actina funciona como um motor e faz a transdução, através da sua atividade ATPásica, de energia química (ATP) em manifestação mecânica de geração de força, e/ou encurtamento do sarcômero, advindo daí a geração pelo músculo de trabalho mecânico e potência.

Tanto do ponto de vista biológico como funcional, uma importante característica no que concerne às propriedades estruturais e funcionais do músculo é a existência da família de genes da CPM de proteínas motoras, na qual genes específicos codificam isoformas de CPM específicas. Estas isoformas de CPM tem diferentes propriedades ATPásicas e velocidades de encurtamento, influenciando assim as propriedades funcionais intrínsecas das fibras nas quais estão expressas que por sua vez determinam

as bases moleculares da diversidade funcional das fibras de um músculo (Schiaffino e Reggiani, 1996).

Pelo menos nove isoformas de CPM foram identificadas na musculatura estriada de mamíferos, incluídas aqui as musculaturas cardíaca e esquelética (Tabela 2).

Tabela 2: Isoformas de cadeia pesada de miosina\*

Isoformas da CPM	Expressão predominante	Expressão em outras localizações secundárias
1. Embrionária	Músculos esqueléticos em desenvolvimento	Fibras em regeneração de músculos esqueléticos adultos; masseter e músculos extraoculares
2. Neonatal	Músculos esqueléticos em desenvolvimento	Fibras em regeneração de músculos esqueléticos adultos; masseter e músculos extraoculares
3. Cardíaca $\alpha$ (CPM- $\alpha$ )	Músculo cardíaco	Masseter (músculo adulto)
4. Cardíaca $\beta$ (CPM- $\beta$ ) ou tipo lento I	a) Músculo cardíaco (ventrículos) b) Músculo esquelético adulto (fibras lentas)	Músculo esquelético embrionário
5. Tipo rápido II a	Músculo esquelético adulto	
6. Tipo rápido II x/II d	Músculo esquelético adulto	
7. Tipo rápido II b	Músculo esquelético adulto	
8. Extraocular	a) músculos oculares extrínsecos b) músculos da laringe	
9. Mandibular ou mastigatória	Músculos mandibulares dos carnívoros	

\*Adaptado de Baldwin e Haddad, 2001.

As isoformas embrionária e neonatal são expressas predominantemente em músculos esqueléticos em desenvolvimento e podem ser detectadas no músculo adulto em fibras em processo de regeneração (d'Albis e col.,1988) ou em alguns músculos adultos especializados, em menor quantidade, como o masseter e os músculos extraoculares. As CPM- $\alpha$  e CPM- $\beta$  são expressas principalmente no músculo cardíaco. A principal isoforma de CPM expressa após o nascimento nos ventrículos dos mamíferos adultos de grande porte, incluindo humanos, é a CPM- $\beta$ .

A CPM- $\alpha$  foi também detectada em certos músculos adultos como o masseter. A expressão de CPM- $\beta$  ou CPM tipo lento I (CPM-I) não é confinada apenas ao músculo cardíaco mas é encontrada também no músculo esquelético embrionário e é a isoforma com maior expressão nas fibras lentas do músculo esquelético (Lompre e col.,1984; Schiaffino e Reggiani,1996). Além do tipo CPM-I, as fibras musculares esqueléticas adultas expressam em várias proporções as isoformas dos tipos IIa, IIx e IIb da CPM (Schiaffino e Reggiani,1996).

A isoforma CPM extraocular é confinada principalmente aos músculos extraoculares e da laringe e a isoforma m-CPM é expressa nos músculos mandibulares dos carnívoros (Schiaffino e Reggiani;1996) É importante salientar que isoformas mutantes de CPM tem um papel causal na miocardiopatia hipertrófica familiar, em humanos, e este fato incentivou a investigação da estrutura e da função das CPMs.

Sabe-se há muito tempo que a expressão protéica destes genes das CPMs é altamente plástica no sentido de que pode ser modulada por uma variedade de fatores, entre os quais os programas de desenvolvimento fetal e embrionário (Adams e col.,1999; Condon e col.,1990; Cox e col.,1992; Mahdavi e col.;1987; McKoy e col.,1998), inervação e padrões de disparo neural associados (Pette e Staron,1990; Schiaffino e Reggianni,1996), fatores hormonais (Caiozzo e Haddad,1996) e padrões de

atividade ou inatividade mecânica (exercício ou repouso) (Caiozzo e Haddad,1996; Talmadge ,2000).

Os dois genes da CPM expressos no miocárdio, a CPM- $\alpha$  e a CPM- $\beta$  , são regulados diferencialmente durante o desenvolvimento, apresentam padrões diferentes de distribuição no coração (atrial versus ventricular), e também respondem de formas diferentes à vários estímulos hormonais, ao estresse hemodinâmico, ao exercício e a hipertrofia cardíaca. Estas respostas diferentes estão mostradas na tabela 3.

Tabela 3-Respostas dos genes da CPM cardíaca

	CPM-alfa	CPM-beta
Excesso de T3	↑	↓
Deficiência de T3	↓	↑
Exercício	↑	↓
Sobrecarga de pressão	↓	↑
Envelhecimento	↓	↑

*Extraído de Weiss e Leinwand (1996)*

A CPM- $\alpha$  é a principal isoforma expressa em ventrículos adultos e nos átrios dos mamíferos de pequeno porte (Lompre e col., 1984). Sua expressão é quase que exclusivamente restrita ao coração, com baixos níveis de expressão nos músculos extra oculares e no masseter (d'Albis e col., 1993; Rushbrook, 1994), assim como no pulmão (Subramaniam e col., 1991). A CPM- $\beta$  é expressa tanto em músculo cardíaco como em fibras musculares esqueléticas lentas (Tipo I) como por exemplo no músculo soleo, e é a isoforma mais abundante nos ventrículos de todos os mamíferos durante a vida fetal. A isoforma principal de CPM expressa após o nascimento nos ventrículos dos mamíferos adultos de grande porte, incluindo humanos, é a CPM- $\beta$ .

Estudos de hibridização *in situ* em embriões de camundongo revelam que os transcritos das CPMs  $\alpha$  e  $\beta$  são encontrados em todo tubo cardíaco entre sete e meio e oito dias após o coito; (Lyons e col., 1990), o que está de acordo com o aparecimento

das primeiras contrações miocárdicas no camundongo (Sissman 1970); conforme a câmara ventricular começa se formar entre o oitavo e o nono dia após o coito, a expressão da CPM- $\beta$  começa a ser restrita aos miócitos ventriculares, à via de saída e a porção ventrículo-arterial. A CPM- $\beta$  permanece como a isoforma predominante nos ventrículos até quase antes do nascimento. A expressão da miosina da CPM- $\alpha$  começa a decair gradualmente no dia 1,5 após o coito. Logo antes do nascimento a sua expressão é aumentada até que ela se transforma na isoforma predominante do ventrículo adulto e no sétimo dia após o nascimento os transcritos da CPM- $\alpha$  substituíram completamente aqueles da CPM- $\beta$ . No músculo atrial a CPM- $\alpha$  é expressa em altos níveis a partir do oitavo dia após o coito até a vida adulta. Entretanto, a CPM- $\beta$  é expressa por um breve período apenas nos átrios, e por volta do 9,5 dias após a concepção, somente algumas células atriais continuam a expressar este gene (Tabela 4).

Com relação aos hormônios tireoideanos, como a tiroxina, é importante salientar que têm um papel importante, agindo de forma independente ou sinergicamente com a atividade mecânica na regulação da expressão gênica das CPMs; tanto no músculo esquelético quanto cardíaco o perfil de desenvolvimento da expressão dos genes das CPMs pode ser atribuído pelo menos em parte à alterações relativas dos níveis de hormônios tireoideanos nos períodos fetal e pós natal (Lompre e col., 1988). A regulação da família de genes das CPMs pelos hormônios tireoideanos parece ser bastante complexa, com a sensibilidade e direção da resposta aos hormônios tireoideanos (isso é, um aumento versus uma diminuição da expressão do gene) dependentes do gene particular da CPM em questão e do tecido no qual está expresso (Izumo e colaboradores, 1986). No miocárdio ventricular, a expressão da CPM- $\alpha$  é induzida pelos hormônios tireoideanos e a expressão da CPM- $\beta$  é reprimida. Nos átrios, a expressão da CPM- $\alpha$  parece ser independente dos níveis de hormônios tireoideanos e expressa

constitutivamente, demonstrando que o local da expressão pode afetar a resposta de um gene de CPM aos hormônios tiroideanos, devido talvez a composição do receptor a estes hormônios. Os genes da CPM- $\alpha$  e a CPM- $\beta$  cardíacas tendem a responder de formas opostas a vários outros estímulos. A resposta variável aos hormônios da tireóide também ocorre com muitos genes de CPMs esquelética. (Izumo e col., 1986).

No que se refere a CPM- $\alpha$ , um elemento responsivo ao hormônio da tireóide (TRE) foi identificado no promotor do gene da CPM- $\alpha$  do rato e, subseqüentemente, foi demonstrado que confere capacidade de resposta a triiodotironina (T3) a um gene repórter quando transfectado com o receptor de hormônio tiroideano tanto em linhagens de células musculares como não musculares (Izumo e Mahdavi, 1988). Vários elementos regulatórios positivos e negativos envolvidos na expressão de genes cardíacos específicos foram identificados (Tsika e col., 1990). A capacidade de resposta ao T3 de promotores transfectados alterados foi possível somente nos miócitos cardíacos; estes estudos possibilitaram a identificação dos elementos promotores basais da CPM- $\alpha$ , consistindo das seqüências canônicas TATAA e CAAT, dois elementos regulatórios positivos e dois negativos e um mínimo de duas seqüências TER.

Por sua vez o gene da CPM- $\beta$  é expresso tanto no músculo cardíaco quanto ao esquelético. Uma compreensão molecular da regulação do gene da CPM- $\beta$  deveria elucidar os fatores envolvidos no direcionamento da expressão gênica no músculo cardíaco versus o músculo esquelético. No coração embrionário, a CPM- $\beta$  é o gene da CPM expresso predominantemente, mas em roedores pequenos ele é quase indetectável no ventrículo adulto. Ele é induzido em resposta a condições patológicas de sobrecarga hemodinâmica e da subseqüente hipertrofia. A análise deste gene deverá nos fornecer uma compreensão destas vias regulatórias, da mesma forma que com a CPM- $\alpha$ ; estudos de mapeamento de promotores usando construções gênicas repórter tanto *in vitro* como

em camundongos transgênicos ajudou a identificar as localizações de diversos elementos-cis que regulam a expressão gênica. (Thompson e col., 1991).

A expressão das miosinas  $\alpha$  e  $\beta$  é bem documentada na hipertrofia patológica, em um processo dependente de hormônios tireoideanos. A presença de elementos responsivos a estes hormônios na região regulatória dos genes que codificam as cadeias pesadas das miosinas cardíacas  $\alpha$  e  $\beta$  também já foi identificada (Lee e col., 1997). Já a contribuição da expressão da miosina para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no exercício não está ainda bem esclarecida. Desta forma, o estudo do remodelamento do músculo cardíaco induzido pelo exercício poderá trazer uma contribuição à compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca nesta condição e, em particular, no exercício com componente anaeróbico.

## *Objetivos*

O objetivo deste trabalho foi o estudo do remodelamento do músculo cardíaco provocado pelo exercício com componente anaeróbico em ratos submetidos a esforço físico (natação), através da a) detecção da expressão de metaloproteinases induzidas pelo exercício e b) do estudo da expressão diferencial das isoformas da cadeia pesada da miosina em músculo cardíaco como fator de hipertrofia induzida pelo programa de treinamento.

## *Materiais e Métodos*

## Grupos experimentais e protocolo de treinamento

Foram treinados dois conjuntos de animais. O primeiro era constituído de trinta ratos Wistar machos, com idades entre quarenta e cinquenta dias e pesos entre 160 e 180gr no início do experimento.

Foi utilizado o protocolo descrito por Hickson e col. (1979). Os animais foram submetidos a natação em compartimentos de 47 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade, com temperatura da água controlada entre 33 e 35° C e nadaram por um período de seis horas por dia em três sessões de duas hora cada, com intervalos de trinta minutos entre as sessões. Este conjunto foi dividido em seis grupos de cinco animais cada (n=5). Os animais do primeiro grupo nadaram por cinco dias consecutivos. Os animais dos segundo, terceiro, quarto e quinto grupos nadaram quatro, três, dois e um dias, respectivamente; os do sexto grupo foram mantidos na gaiola em repouso com água e alimento a disposição (grupo controle, sedentário). Durante os períodos de descanso os animais tiveram acesso a água e alimento *ad libitum*. Todos (treinados e controles) foram pesados diariamente e vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento foram sacrificados (juntamente com os do grupo controle). Os animais do primeiro grupo foram, portanto, sacrificados 120 horas após o início do treinamento (ait) e os dos demais grupos treinados (segundo, terceiro, quarto e quinto grupos) foram sacrificados 96, 72, 48 e 24 horas após o início do treinamento, respectivamente (Tabela 5). Referir-nos-emos a estes grupos de agora em diante simplesmente como os grupos 120, 96, 72, 48 e 24 horas. Adicionaram-se pesos de chumbo de 3 a 5% do peso corporal à cauda dos animais para evitar flutuação e se manteve a presença constante de um observador durante todas as sessões de treinamento (Fig. 3). Não houve perdas de animais durante o treinamento. Após o sacrifício os corações foram retirados

rapidamente para dissecção do ventrículo esquerdo. Os ventrículos foram pesados, congelados em Nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do RNA total e proteínas.



**Figura 3:** Compartimentos com os animais em treinamento (acima) e colocação do peso na cauda dos animais (embaixo)

TABELA 5 - PROTOCOLO DE TREINAMENTO -1º CONJUNTO DE ANIMAIS

Grupo	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
1	Treina (início)	Treina	Treina	Treina	Treina	Sacrifício (120 horas após o início do treinamento (ait*))
2	-	Treina (início)	Treina	Treina	Treina	Sacrifício (96h ait)
3	-	-	Treina (início)	Treina	Treina	Sacrifício (72h ait)
4	-	-	-	Treina (início)	Treina	Sacrifício (48h ait)
5	-	-	-	-	Treina (início)	Sacrifício (24h ait)
6	-	-	-	-	-	Sacrifício- ratos sedentários (controles)

\*ait – após o início do treinamento

Um segundo conjunto de 20 animais com as mesmas características do primeiro foi submetido a protocolo de treinamento semelhante e dividido em quatro grupos de cinco animais (n=5).

O primeiro nadou seis horas por dia em três períodos de duas horas com intervalos de trinta minutos, durante cinco dias consecutivos; o segundo e o terceiro grupos nadaram quatro e três dias consecutivos, respectivamente, e o quarto permaneceu nas gaiolas, em repouso, com água e ração *ad libitum*, constituindo o grupo controle, sedentário. Todos foram sacrificados vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento, portanto com 120, 96, e 72 horas após o início do treinamento, respectivamente, juntamente com os animais do grupo controle (Tabela 6). Não tivemos, igualmente, perdas de animais neste conjunto. Os animais foram pesados antes da primeira sessão do primeiro dia de treinamento e no dia do sacrifício.

Foram retiradas amostras de sangue da cauda dos animais (25 µl) antes da primeira sessão e ao término de cada período de treinamento de duas horas de todos os

animais em todos os dias treinados (quatro amostras por animal por dia) para a dosagem de lactato.

### Preparação das amostras para análise morfológica

Os corações foram retirados, drenados de sangue, pesados e divididos em duas partes aproximadamente iguais; uma foi acondicionada em solução de formalina 10% para cortes histológicos fixados em parafina e corados por hematoxilina-eosina (HE), para histologia. A outra foi congelada a  $-86^{\circ}\text{C}$  para processamento posterior.

Procedeu-se também a retirada e pesagem do músculo soleo do membro inferior direito.

TABELA 6 - PROTOCOLO DE TREINAMENTO -2º CONJUNTO DE ANIMAIS

Grupo	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
1	Treina (início)	Treina	Treina	Treina	Treina	Sacrifício (120 horas após o início do treinamento (ait*))
2	-	Treina (início)	Treina	Treina	Treina	Sacrifício (96h ait)
3	-	-	Treina (início)	Treina	Treina	Sacrifício (72h ait)
4	-	-	-	-	-	Sacrifício grupo sedentário (controle)

\*ait – após o início do treinamento

### Determinação da concentração de lactato sanguíneo

A dosagem de lactato no sangue total foi realizada em um lactímetro (Lactate Analyzer, 1500 Sport, Yellow Springs Instruments). As amostras coletadas da veia caudal foram diluídas em 50 µl de solução de fluoreto de sódio 1%(m/v). Para quantificação, 25 µl de cada diluição foram aplicados no equipamento e os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição (x3). Para calibração, foi utilizado um padrão de lactato de 5 mM.

### **Preparação de materiais livres de RNase**

Para evitar a degradação do RNA por RNases, todo o material foi cuidadosamente preparado previamente. Ponteiras com filtros e microtubos eram novos, descartáveis e estéreis. A vidraria foi tratada com solução de dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v) em água por 2 horas a 37°C. Após este tempo, a vidraria foi lavada com água tratada com DEPC e autoclavada por 15 minutos. Os materiais plásticos foram tratados com clorofórmio ou água tratada com DEPC. A cuba de eletroforese foi tratada com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v), por 10 minutos, antes de ser utilizada.

Todas as soluções foram preparadas com água livre de RNase, ou tratadas com DEPC e autoclavadas. Toda a manipulação foi feita com auxílio de luvas.

### **Extração de RNA total**

A extração de RNA total de 100 mg do ventrículo esquerdo de cada animal foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen). O homogenado foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, permanecendo por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio, invertendo-se o

microtubo vigorosamente por 15 segundos, seguido de incubação por 2-3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 11.000 x g por 15 minutos a 4°C; a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo e então foram adicionados 500µl de isopropanol, incubando-se, em seguida, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após nova centrifugação por 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o RNA foi precipitado pela adição de 1 ml de etanol 75%. O RNA foi coletado por centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em 50 µl de água livre de RNAases, e armazenado em seguida no freezer a -80°C.

As amostras foram tratadas com DNase ultrapura (Promega) por 1 hora a 37°C, para eliminação de traços de DNA genômico contaminante. Após o período de incubação, as amostras foram purificadas por extração com fenol-clorofórmio (1:1) e concentradas por precipitação com acetato de sódio 3M e etanol 100% (2v/v).

As amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. Para documentação e quantificação o gel foi digitalmente fotografado utilizando uma câmara “Kodak Digital Science” e o software “Kodak Digital Science 1D”.

### **Eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%**

As amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% que foi preparado conforme descrito a seguir. Agarose (SIGMA) foi suspensa em 3ml de Tampão MOPS 10X (0,2M MOPS, 0,05M acetato de sódio e 0,01M EDTA) e 25,5ml de água Milli-Q. A agarose foi fundida na solução através de aquecimento em microondas e deixou-se esfriar até aproximadamente 50°.

Em seguida foram adicionados 1,62ml de formaldeído 37% a solução e essa foi levada a cuba de eletroforese de DNA (GIBCO) também tratada previamente para evitar contaminação com RNase. O tampão da cuba utilizado foi MOPS 1X. Cerca de 10µl de RNA total de cada amostra foram secos, resuspensos em tampão de amostra e antes de serem aplicadas no gel foram fervidos por 2 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese utilizando uma voltagem de 100 Volts por aproximadamente uma hora. A revelação foi feita com brometo de etídio em um transiluminador ultravioleta.

### **Quantificação de RNA por espectrofotometria**

As amostras de RNA foram quantificadas por leitura em 260nm em um espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia), considerando-se que uma solução com D.O.= 1,0 contem aproximadamente 38 µg de RNA/ml.

### **Desenho dos “primers”**

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados para a reação de amplificação foram desenhados a partir de pesquisas em banco de dados de seqüências e de dados já publicados (Jaschinski, 1998). Foi utilizada a base de dados pública *on-line* “Genbank” ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para se conseguir seqüências de aminoácidos e de DNA da miosina cardíaca em diferentes espécies de mamíferos. As diversas seqüências obtidas foram alinhadas com auxílio do programa “MultiAlin“ para identificação de segmentos que apresentavam elevado grau de conservação entre espécies. Destes segmentos foi escolhido aquele que tinha maior tamanho (130 aminoácidos

correspondentes a 390 pb). Esses oligonucleotídeos foram sintetizados para serem então utilizados na amplificação deste segmento do DNA de interesse pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

**Miosina Cardíaca Foward**

CGC **GGA TCC** GCA CGC ATC GAG GAG CTG GAG GAG  
*BamH I*

**Miosina Cardíaca Reverse**

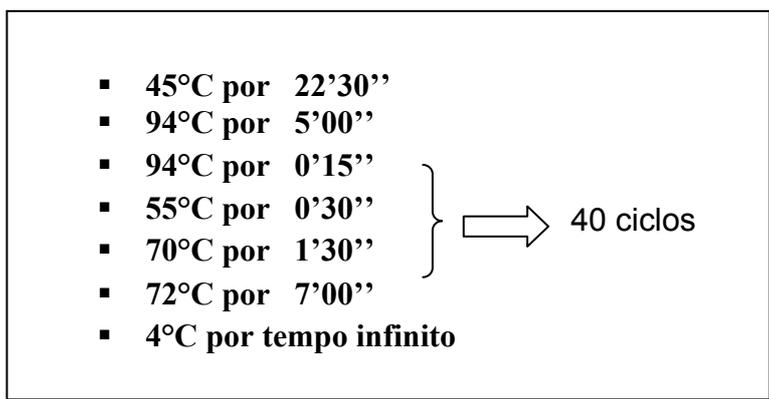
CGG **GGT ACC** CTT GGC CTT GAT GAT CTG CTC CAT  
*Kpn I*

Os sítios de restrição foram incluídos para posterior clonagem, caso houvesse interesse em manter os fragmentos de DNA em disponibilidade no laboratório.

RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERASE CHAIN REACTION)

As amostras de RNA total dos ratos treinados e dos controles foram utilizadas como substrato para a enzima transcriptase reversa, utilizando o Kit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads (Pharmacia).

O programa utilizado em termociclador Perkin Elmer modelo 9600 para a realização de RT-PCR consistiu de:



O produto do RT-PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (1%). Para documentação e quantificação o gel foi digitalmente fotografado utilizando uma câmara “Kodak Digital Science” e o software “Kodak Digital Science 1D”.

## **RT-PCR em tempo real**

A técnica de RT-PCR em tempo real consiste em uma reação de RT, seguida de uma PCR. O fluoróforo “Syber Green” se intercala no DNA dupla fita recém sintetizado, e o complexo passa então a emitir luz. A fluorescência emitida durante toda a reação é detectada pelo equipamento e quantificada. Desta forma, por comparação com os controles ou através de uma curva padrão, é possível quantificar o cDNA molde presente originalmente na reação.

Esta análise foi feita em um aparelho “Sequence Detection System” modelo 7000, da Applied Biosystems, no ICB-USP, em colaboração com o Prof. Dr. Anselmo Moriscot.

Um novo par de *primers* foi desenhado para amplificar o cDNA de interesse em um tamanho menor (82bp), para que pudesse ser utilizado com o sistema Syber green. Desta forma, foram desenhados e sintetizados os seguintes primers, baseando-se na sequência depositada no GenBank (acesso X15939, KRAFT e col., 1989).

### **CPM beta**

Senso: AGAGAATGGCAAGACGGTGACT

Antisenso: CATGTCCTCGATCTTGTCGAACT

### **Obtenção do cDNA a partir do RNA total (Reação da transcriptase reversa)**

Utilizou-se 2µg de RNA total (já tratado com DNase). Adicionou-se 0,5µg de primer (poli T)/µg de mRNA num volume total < ou = a 15µl em água. Aqueceu-se o tubo à 70°C por 5 minutos e resfriou-se imediatamente. Os componentes da reação foram adicionados na ordem referida abaixo e incubados por 1 hora a 37°C.

M-MLV (5x) Reaction Buffer	5µl
dATP (10mM)	1,25µl
dCTP (10mM)	1,25µl
dGTP (10mM)	1,25µl
dTTP (10mM)	1,25µl
M-MLV RT	200 unidades
“Nuclease free water”	QSP 25µl

As amostras foram armazenadas em freezer -20°C para posterior reação de PCR.

### **PCR em tempo real**

Após ter sido obtido o cDNA das amostras dos VE de todos os animais, foi realizada a análise da expressão de CPM beta cardíaca utilizando o primer da CPM-I (cadeia pesada da miosina esquelética do Tipo I) que é correspondente à cadeia pesada da miosina cardíaca beta. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A quantificação relativa da expressão de um gene pode ser realizada através da comparação da amplificação com um controle endógeno. Para a quantificação do gene em estudo e normalização do método, utilizou-se o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno. Desta forma, por comparação com os controles e através de uma curva padrão, foi possível quantificar o cDNA molde

presente originalmente na reação. Através desta análise foram obtidos valores representados da seguinte maneira:

- **CT**: Threshold Cycle – indica o número do ciclo no qual a quantidade do “alvo” amplificado alcança um limiar fixo; quanto menor o valor numérico de **CT**, mais rapidamente foi atingido o número de cópias estabelecido;

- **ΔCT**: normalização com gene de expressão constitutiva; é obtido pela diferença entre o **CT** do gene alvo (no caso, CPM) e o **CT** do gene constitutivo (GAPDH) para cada animal.

- **ΔΔCT**: média do **ΔCT** do grupo controle - **ΔCT** de cada animal de cada grupo;

Os valores obtidos foram transformados para Unidades Arbitrárias (**UA**)(por indicação do manual do aparelho), através da equação:  $UA = 2^{-\Delta\Delta CT}$

A análise estatística foi realizada pelo método ANOVA.

### **Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Bradford (1976), com albumina de soro bovino (BSA) (Sigma) como padrão. Foi construída uma curva padrão baseada nas concentrações de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml de BSA, com adição de Dye Reagent (BioRad Protein Assay). A absorbância das soluções da curva padrão e das amostras de interesse foram lidas a 595 nm e a concentração protéica foi estimada a partir delas.

## Zimografia

Esta técnica foi utilizada para detecção da atividade de proteases nos extratos celulares. As amostras dos ventrículos esquerdos foram tratadas conforme descrito por Cleutjens et al. (1995) para obtenção do extrato tecidual. O tecido congelado foi lavado de 3 a 4 vezes com salina gelada e incubado com o tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM pH 5,0, NaCl 0,15 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 µM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM e Triton X-100 0,01% [v/v]) a 4° C, com agitação contínua, durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação e o pH levado para 7,4 pela adição de solução concentrada de Tris em pH 8,0.

Esse extrato tecidual foi então testado quanto à presença de atividade gelatinolítica pela técnica de zimografia (Cleutjens *et al.*, 1995). Concentraram-se as amostras de modo que cada poço do gel de zimografia continha 30µg de proteína. Duplicatas de amostras foram submetidas a SDS-PAGE com gelatina (2mg/ml). Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, separaram-se as duplicatas, cortando-se o gel. Uma metade do gel foi incubada em tampão de substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e NaN<sub>3</sub> 0,02%). A outra metade foi incubada no mesmo tampão contendo EDTA (15mM). Ambas as metades foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos, descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade..

Um cuidado importante tomado para minimizar possíveis variáveis que repercutissem em erros foi quanto à preparação e a corrida do gel e a documentação das imagens. Assim, todos os géis foram preparados em uma mesma remessa, corridos com o mesmo tempo, fotografados e revelados nas mesmas condições.

Para documentação, o gel foi escaneado ou fotografado. As imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o software Image Pro-Plus e analisadas estatisticamente pelo método de ANOVA, seguido do teste de Dunnett de significância.

### **Análise Estatística**

Os valores individuais das concentrações plasmáticas de lactato obtidas em repouso e a média dos valores obtidos após estágios de treinamento foram comparados dia-a-dia utilizando teste T bicaudal para amostras não pareadas.

Para a comparação entre as variações de pesos corporais, pesos normalizados dos músculos sóleos e corações nos grupos controle, 72, 96 e 120 horas foi utilizada a ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

## *RESULTADOS*

## **1- Variação do peso corporal**

Para os vários grupos (n=5) foram determinados: **a)** o peso dos animais antes da primeira sessão de natação do primeiro dia de cada grupo ( peso inicial), **b)** o peso medido no dia do sacrifício ( peso final ), **c)** a variação do peso corporal ( peso final menos peso inicial -  $\Delta$  peso -), **d)** o peso do coração após drenado o sangue das cavidades, no dia do sacrifício, **e)** o peso do músculo sóleo no dia do sacrifício, **f)** a relação peso do coração / peso final e **g)** a relação peso do músculo sóleo / peso final.

Com relação à variação do peso corporal houve diferença estatisticamente significativa entre as variações de peso do grupo 120 horas com relação ao grupo 72 horas ( $p < 0,01$ ) e entre os grupos 96 horas e 72 horas ( $p < 0,05$ ), mas não entre os três grupos treinados (72, 96, 120 horas ) e o grupo controle (Fig.4).

## **2- Variação da relação peso coração / peso corporal**

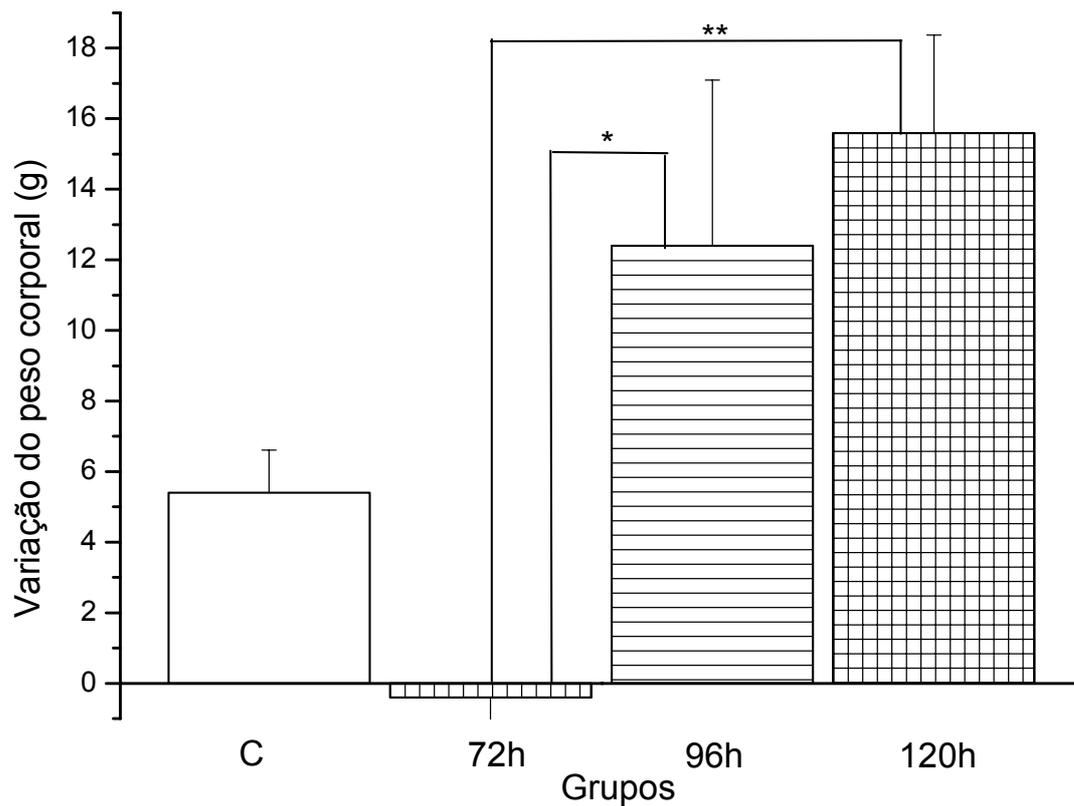
A comparação da relação peso do coração / peso corporal entre os grupos mostrou diferença altamente significativa entre os grupos 120 horas com o grupo controle ( $p < 0,001$ ), e com o grupo 72 horas ( $p < 0,05$ ). A diferença também foi significativa entre os grupos 96 horas e o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre quaisquer dois grupos com diferenças de treinamento de apenas 24 horas (120 hs x 96 hs e 96 hs x 72 hs) ou entre o grupo 72 horas e o grupo controle (Fig.5).

### **3-Variação da relação peso sóleo / peso corporal.**

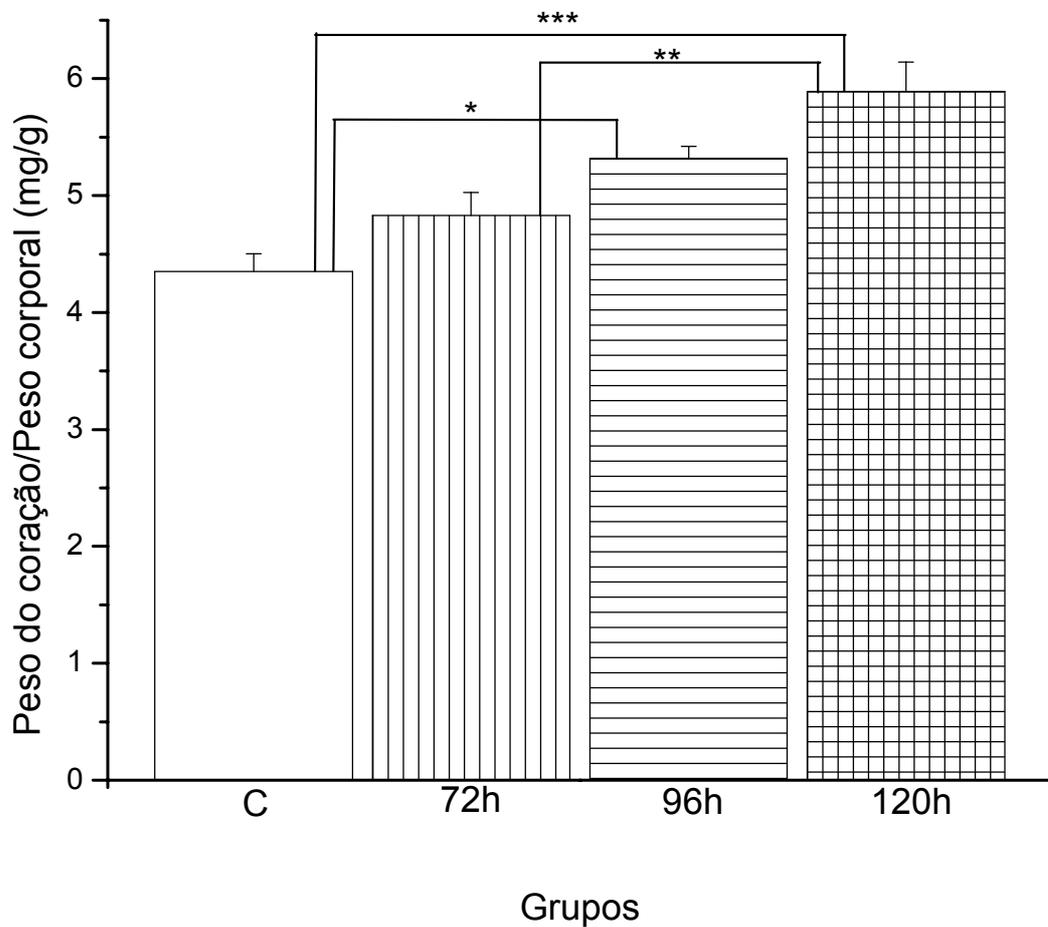
A Figura 6 nos dá a comparação da relação peso sóleo / peso corporal entre os grupos, e mostra uma tendência à redução da relação nos três grupos treinados em relação ao grupo controle.

### **4- Análise morfológica**

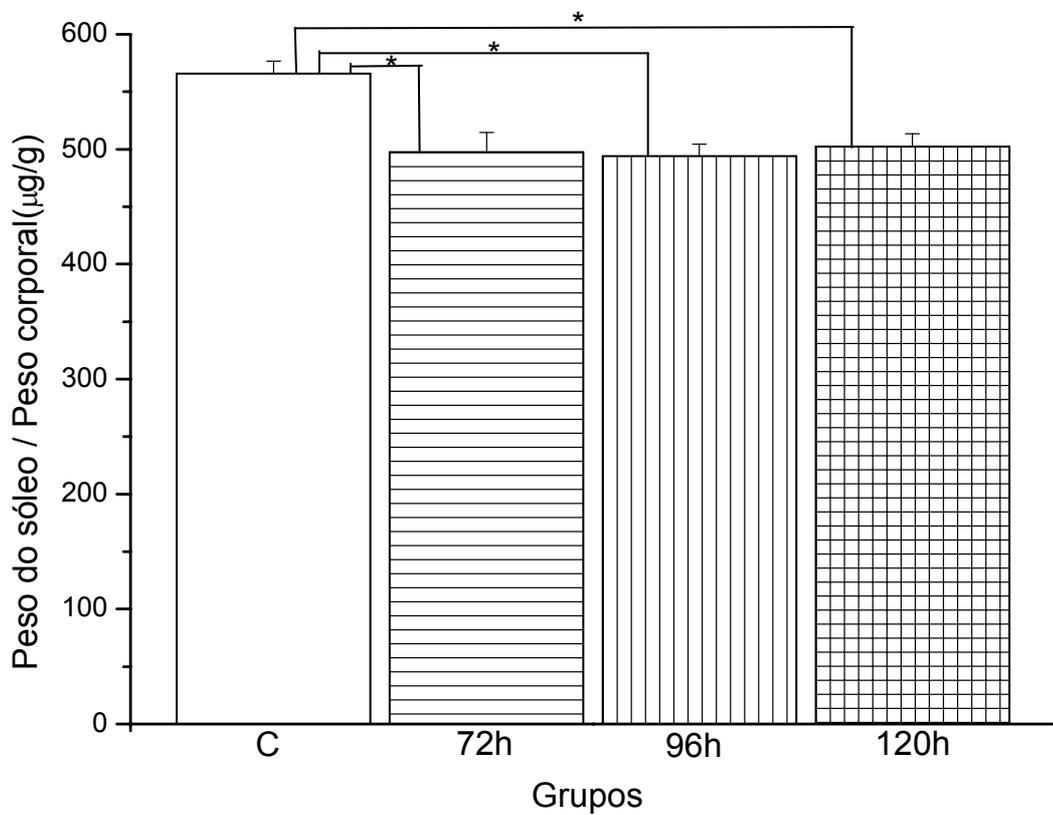
A análise histológica pela microscopia ótica não revelou áreas de edema intersticial, ou infiltrados inflamatórios nos miócitos cardíacos nos animais de qualquer um dos grupos treinados (Fig.7 e 8). Os cortes apresentados nestas figuras não se encontram no mesmo nível e foram colocados como ilustração e não para uma análise comparativa. Não foi realizada a morfometria das células.



**Figura 4.** Variação do peso corporal dos animais controles (grupo C) e dos animais treinados dos grupos 72, 96 e 120 horas após o início do treinamento. (\*= $p < 0,05$  e \*\*= $p < 0,01$ ).



**Figura 5** Variação da relação peso do coração / peso corporal dos animais controles (grupo C) e dos animais treinados dos grupos 72, 96, e 120 horas após o início do treinamento. (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$  e \*\*\*= $p < 0,001$ ).



**Figura 6.** Variação da relação peso sóleo / peso corporal dos animais controles (grupo C) e dos animais treinados dos grupos 72, 96, e 120 horas após o início do treinamento. (\* $p < 0,05$ ).

## 5- Dosagem de lactato

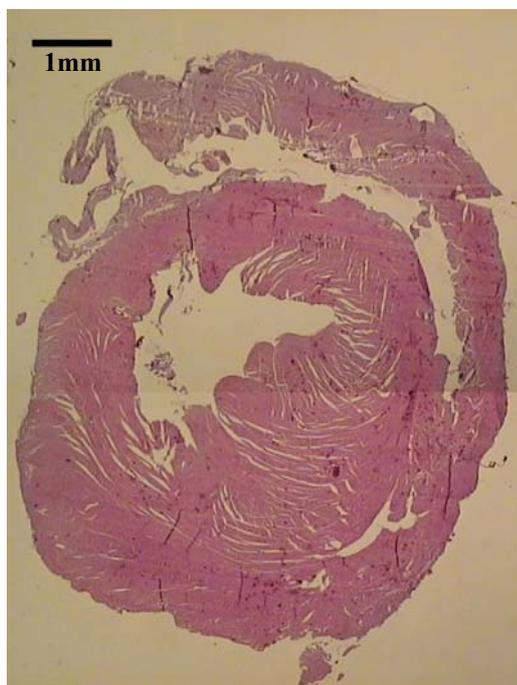
As dosagens de lactato foram realizadas antes da primeira sessão de exercício (repouso) e ao final de cada uma das três sessões de exercício de duas horas (amostras 1, 2, e 3), num total de quatro amostras por dia, por animal, para todos os animais em todos os dias de treinamento. Foi feita a comparação entre os valores de lactato sanguíneo em repouso e a média das três amostras colhidas após cada uma das sessões de duas horas de exercício (média das amostras 1, 2, e 3), para cada dia de treinamento.

A comparação entre a dosagem do lactato em repouso e a média das amostras 1, 2, e 3 dos animais dos três grupos, mostrou, para o primeiro, o segundo e o terceiro dias de treinamento, aumentos extremamente significativos da média das três amostras em relação ao repouso ( $p < 0,009$ -Fig.9A;  $p = 0,0021$ -Fig.9B; e  $p < 0,001$ -Fig.9C, respectivamente.). No quarto dia de treinamento, que só tinha os grupos 96 e 120 horas, houve igualmente aumento altamente significativo da concentração de lactato na média das três amostras após o exercício ( $p = 0,0041$ ) em relação à de repouso (Fig.9D). Para o quinto dia de treinamento, apenas com os animais do grupo 120 horas, a comparação mostrou da mesma forma aumento significativo da concentração de lactato da média das três amostras após exercício ( $p = 0,0225$ ) com relação à de repouso (Fig.9E).

Nota-se ainda uma tendência de redução da lactacidemia das médias das três amostras colhidas após cada uma das três sessões de exercício com o decorrer do experimento. Outra forma de visualizar esses resultados está mostrada na figura 10, onde se observa a redução da lactacidemia na condição de repouso de um valor médio de  $4,89 \pm 2,68$  mmol/l para valores tão baixos quanto  $1,7 \pm 0,4$  mmol/l no quinto dia ( $p < 0,01$ ) (teste Anova-Tukey). Com relação a lactacidemia média das três amostras colhidas imediatamente após cada um dos três períodos de duas horas de exercício de

cada dia observa-se redução da lactacidemia de  $9,95 \pm 4,53$  mmol/l no primeiro dia para  $6,01 \pm 3,13$  mmol/l nos segundo e terceiro dias de treinamento e para  $4,72 \pm 2,43$  mmol/l e  $4,11 \pm 1,87$  mmol/l nos quarto e quinto dias de treinamento, respectivamente. As diferenças do primeiro para todos os demais dias foram altamente significativas ( $p < 0,01$ ), quando aplicado o teste de Anova-Dunnett.

**A) Controle**



**B) 72 horas**



**C) 96 horas**



**D) 120 horas**

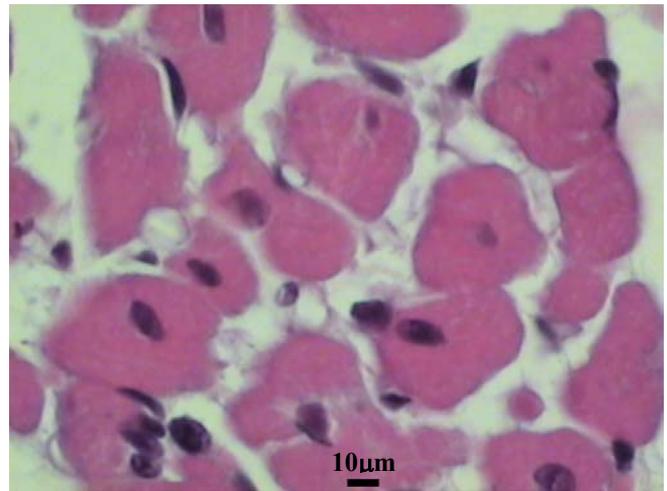


**Figura 7** Cortes com aumento panorâmico (1,25X) do ventrículo esquerdo de animal do grupo controle (A) e de animal dos grupos 72, 96 e 120 horas (B, C e D respectivamente). Fixação em parafina e corados com hematoxilina-eosina (HE).

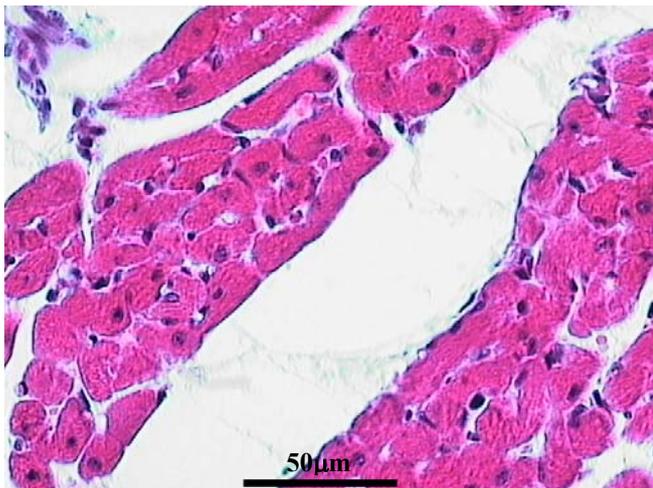
**A) Controle (40X)**



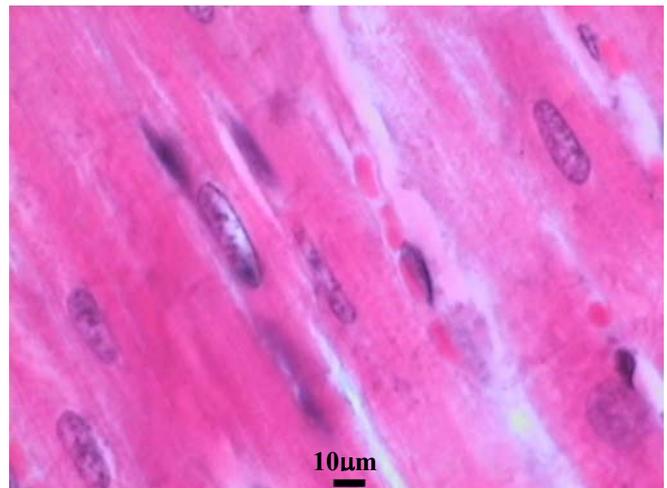
**B) Controle (100X)**



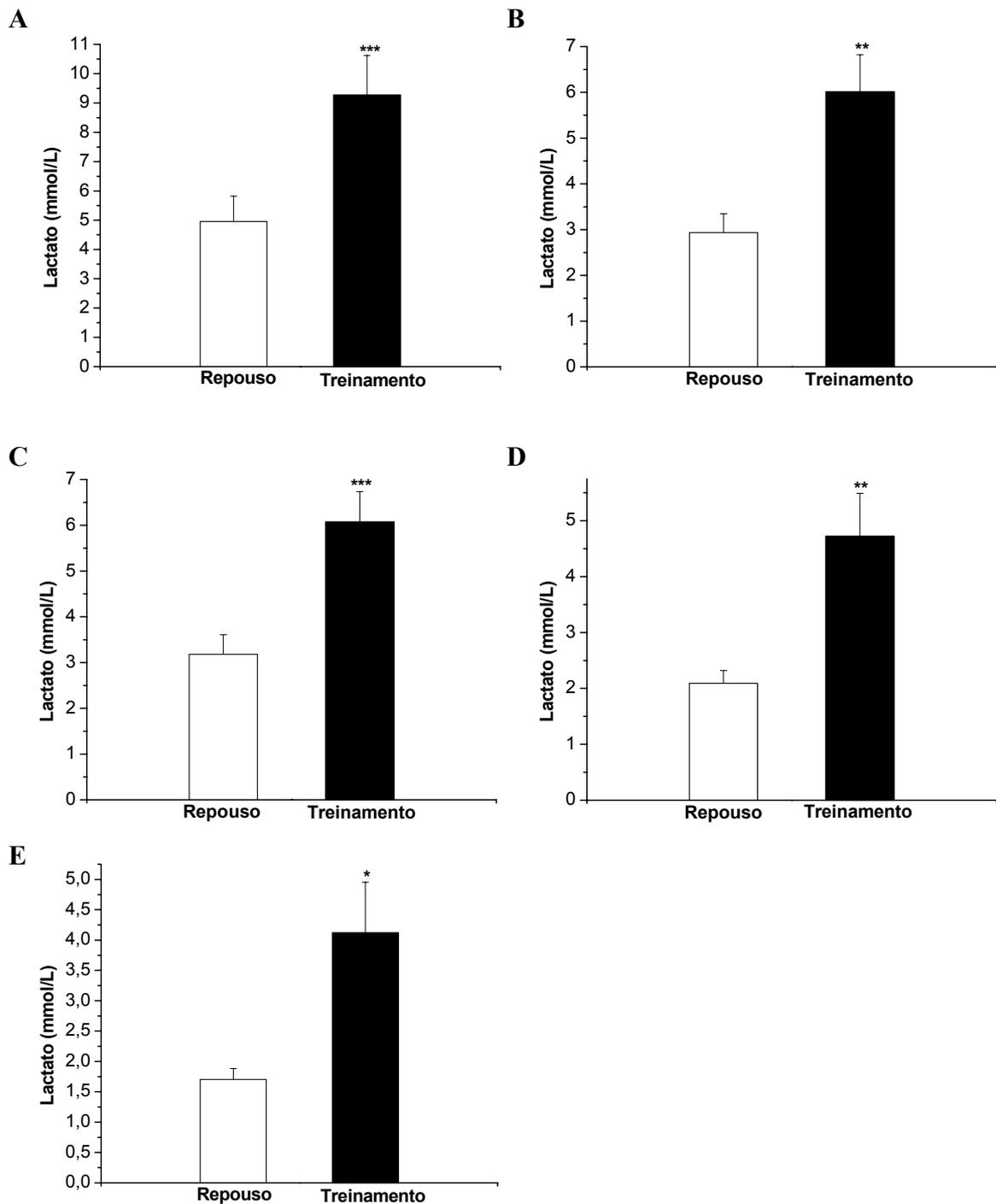
**C) 120 horas (40X)**



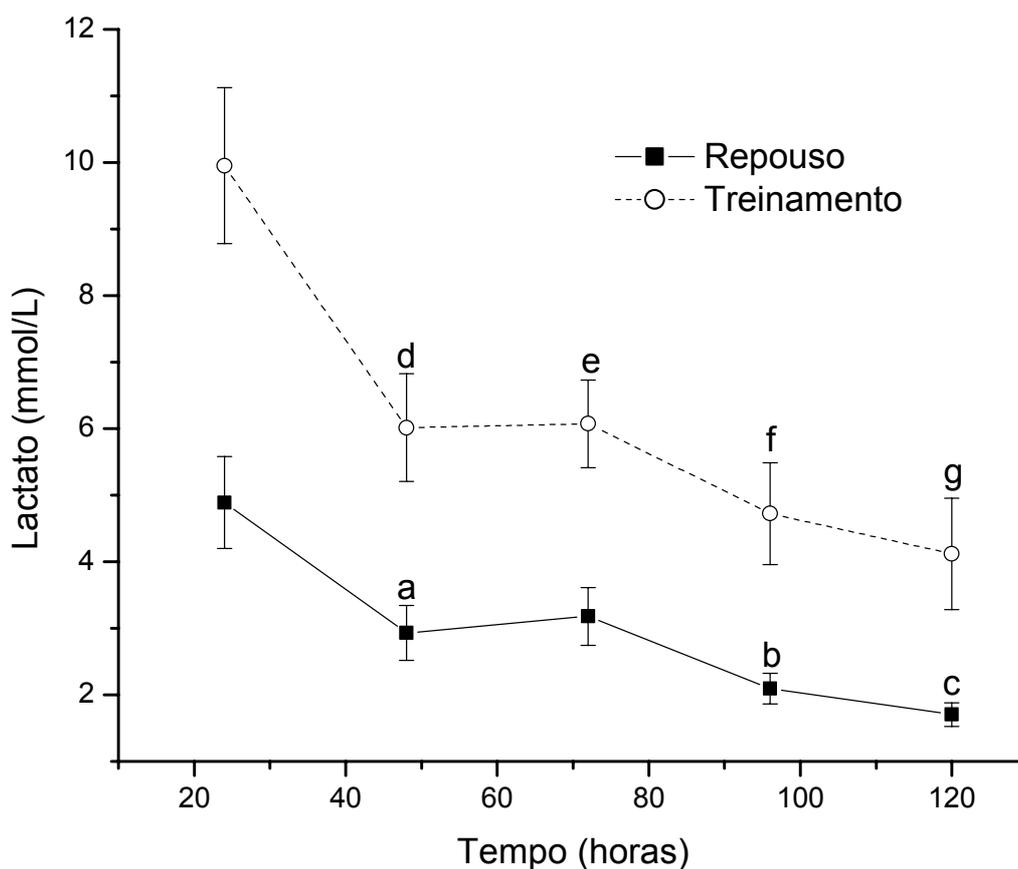
**D) 120 horas (100X)**



**Figura 8.** Cortes do ventrículo esquerdo fixados em parafina e corados com hematoxilina-eosina (HE) de animal do grupo controle (A,B) e do grupo 120 horas (C,D) com os aumentos 40X (A,C) e 100X.(B,D). Não se observaram áreas de edema intersticial ou infiltrados inflamatórios no ventrículo de qualquer animal do segundo conjunto de animais treinados (controles e grupos 72, 96, e 120 horas).



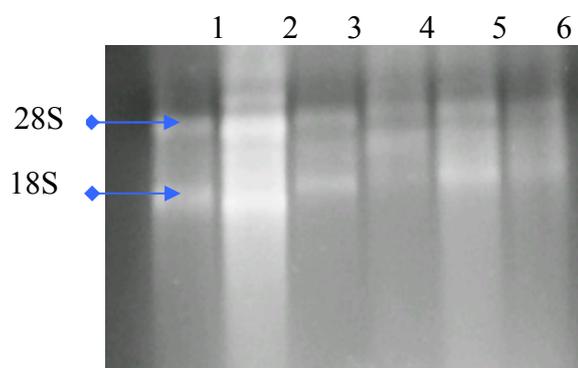
**Figura 9.** Comparação entre as concentrações de lactato sanguíneo dos animais em repouso e a média das amostras colhidas após cada uma das três sessões de exercício para o primeiro dia (A-\*\*\* $p < 0,009$ ); para o segundo dia (B-\*\* $p = 0,0021$ ) e para o terceiro dia de treinamento (C-\*\*\* $p < 0,001$ ) dos três grupos treinados (grupos 72, 96, e 120 horas). A mesma comparação para o quarto dia de treinamento dos grupos 96 e 120 horas (D-\*\* $p = 0,0041$ ) e para o quinto dia de treinamento do grupo 120 horas (E- $p = 0,0225$ ).



**Figura 10.** Evolução da lactacidemia ao longo dos cinco dias de treinamento. Símbolos fechados e abertos representam, respectivamente, os valores médios obtidos antes e após as sessões de treinamento de cada dia. As comparações estatisticamente significativas foram: a) 24x48h ( $p < 0,05$ ), b) 24x96h ( $p < 0,01$ ), c) 24x120h ( $p < 0,05$ ), d) 24x48h ( $p < 0,05$ ), e) 24x72h ( $p < 0,05$ ), f) 24x96h ( $p < 0,01$ ), g) 24x120h ( $p < 0,01$ ).

## 6-Extração do RNA total do ventrículo esquerdo

Inicialmente, foi feito um ensaio piloto (n=1 animal para cada grupo) para se verificar a eficiência do protocolo experimental e dos primers desenhados. Desta forma, foi feita a extração do RNA total do ventrículo esquerdo de todos os animais (controle e treinados) utilizando-se o reagente TRIzol. As preparações de RNA eram sempre analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% quanto à integridade das amostras. Pode-se observar na figura 11, as bandas obtidas que correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e ao arraste característico dos demais tamanhos de RNAs. Nas melhores preparações, não se observava a presença de DNA genômico (geralmente no poço de aplicação) ou de muitas bandas de degradação.



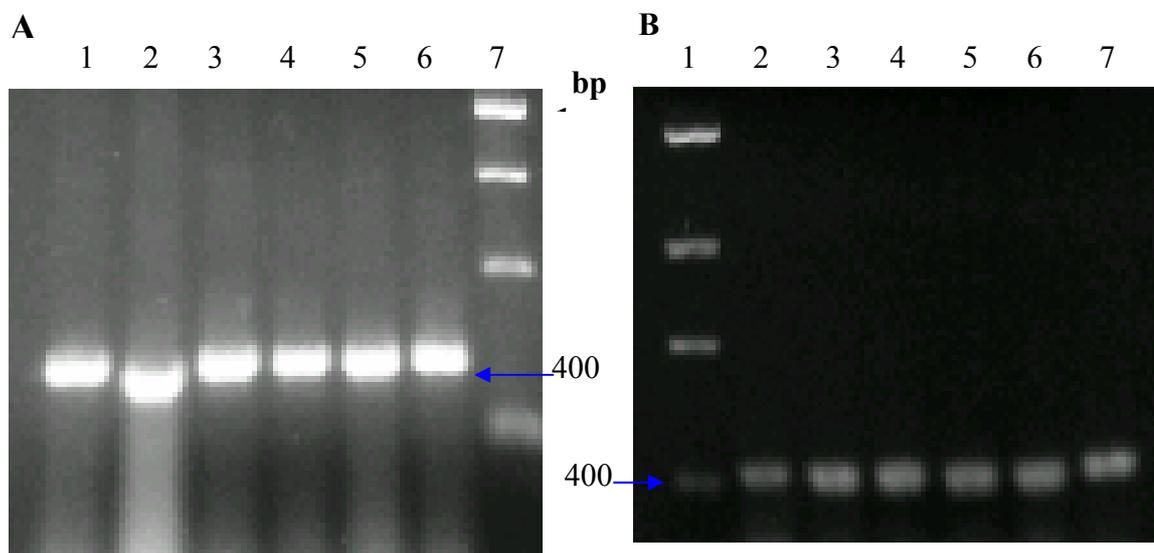
**Figura 11-** Análise da extração do RNA total dos ventrículos esquerdo dos animais de cada grupo em gel de agarose-formaldeído 1%: Poço 1- animal sedentário (controle); poços 2, 3, 4, 5 e 6- animais dos grupos 24, 48, 72, 96, e 120 horas respectivamente.

## **7-RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)**

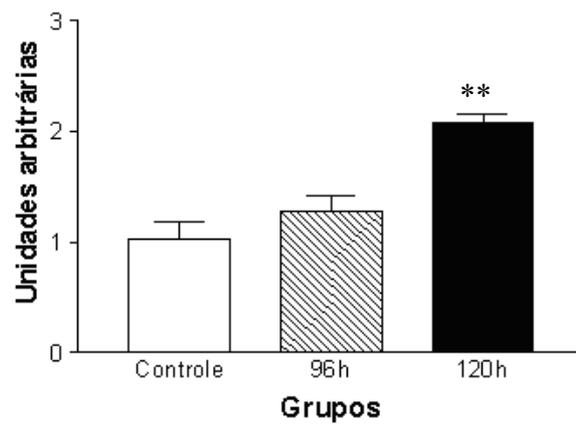
Após o desenho e síntese de pares de primers específicos para as cadeias pesadas alfa e beta da miosina cardíaca, realizou-se o método de RT-PCR, utilizando-se as amostras de RNA total de todos os animais (controle e treinados). A ampliação de ambas cadeias pesadas alfa e beta da miosina cardíaca foi observada em todos os animais (inclusive no controle), não sendo possível assim determinar uma diferença no padrão de expressão das isoformas da miosina cardíaca em gel de agarose 1% (figura 12A e 12B).

## **8-Análise da expressão da CPM beta por PCR em tempo real**

Foi realizada a análise da expressão da cadeia pesada beta da miosina cardíaca através do aparelho “Sequence Detection System” modelo 7000, da Applied Biosystems com o cDNA de todos os animais (controles e treinados), n=4 por grupo. Nos grupos 24, 48 e 72 horas houve grande dispersão dos resultados, e a análise não foi conclusiva. O grupo 96 horas não expressou significativamente mais que o grupo controle, porém houve uma tendência ao aumento da expressão da cadeia pesada da miosina, o que se confirmou com o Grupo 120 horas que mostrou um aumento significativo da expressão com relação ao controle ( $p < 0.01$ ) (figura 13).



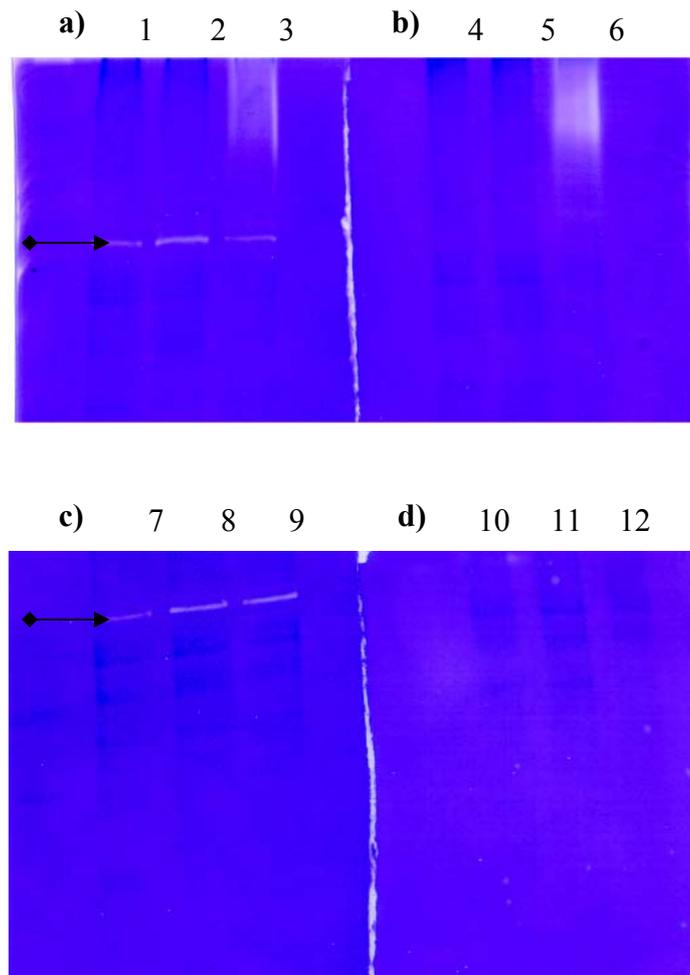
**Figura 12.** Análise da amplificação das cadeias alfa e beta da miosina cardíaca: **A)** Amplificação da cadeia alfa: poço 1: animal controle; poços 2, 3, 4, 5, e 6: animais dos grupos 24, 48, 72, 96, e 120 horas ,respectivamente; poço 7: Padrão Low MW de DNA. A seta em azul representa o segmento obtido próximo ao tamanho do segmento esperado (400pb). **B)** Amplificação da cadeia beta: poço 1: Padrão Low MW de DNA; poço 2: animal controle; poços 3 a 7: animais dos grupos 24, 48, 72, 96 e 120 horas respectivamente.



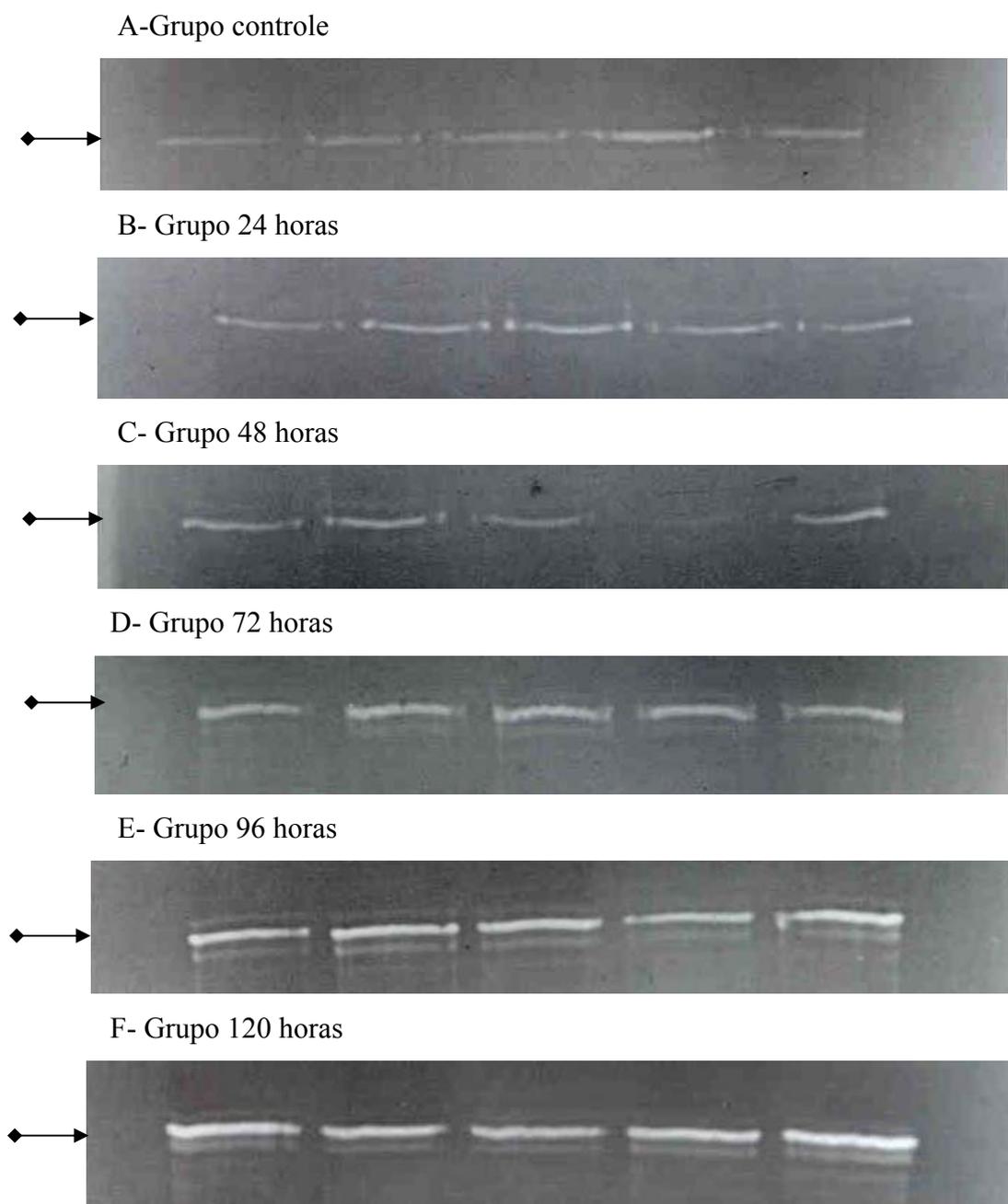
**Figura 13.** Efeitos do tempo de treinamento sobre a expressão da CPM beta (cadeia pesada beta da miosina cardíaca) dos grupos 96 e 120 horas do primeiro conjunto de animais treinados comparados com o grupo controle. (\*\*  $p < 0.01$ ).

## **9-Expressão de proteases por zimografia**

Após a preparação dos extratos protéicos dos ventrículos esquerdos (25µg), analisou-se a atividade gelatinolítica utilizando gel de SDS 12% com gelatina 2mg/ml, pela técnica de zimografia. Foi possível visualizar uma banda de atividade (seta) de massa molecular aproximada de 66 kDa em todas as amostras (controles e treinados) somente na ausência de EDTA (Fig. 14), confirmando a expressão de uma metalopeptidase uma vez que sofre inibição por esse quelante. Pôde-se observar uma diferença quantitativamente significativa entre os diferentes tempos de treinamento (Fig. 15 e 16) implicando no aumento da atividade gelatinolítica quanto maiores os tempos de treinamento aos quais os animais foram submetidos. Além, disso, foi possível observar também o aparecimento de novas bandas de atividade não expressas no controle e também uma maior atividade dessas bandas.



**Figura 14.** Extratos protéicos do ventrículo esquerdo (25mg) dos animais, submetidos a eletroforese em gel SDS 12% com gelatina (zimografia): **a)** poços 1, 2 e 3: detecção de atividade gelatinolítica dos animais dos grupos 120, 96, e 72 horas respectivamente; **b)** poços 4, 5 e 6: zimografia das mesmas amostras (grupos 120, 96, 72 horas ) incubadas com EDTA; **c)** poços 7, 8 e 9: animais dos grupos 48 e 24 horas e animal sedentário (controle) respectivamente. **d)** poços 10, 11 e 12: zimografia das mesmas amostras anteriores (grupos 48, 24 horas e controle) incubadas com EDTA.



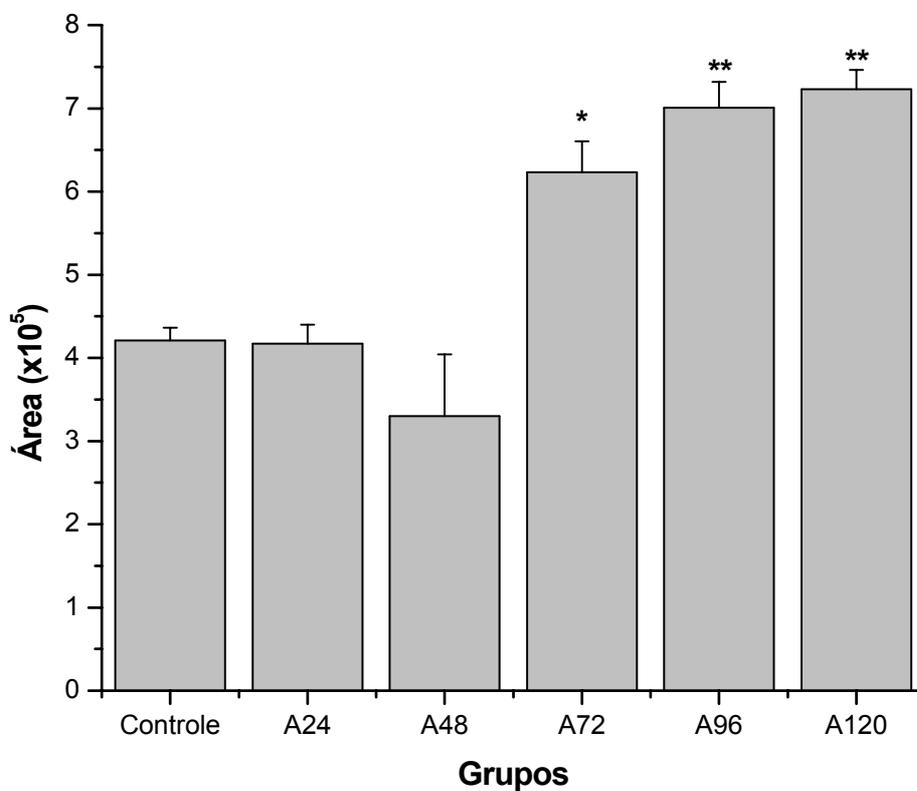
**Figura 15.** Detecção da atividade gelatinolítica dos extratos ventriculares submetidos à técnica de zimografia. Observa-se o aumento da atividade gelatinolítica quanto maior o tempo de treinamento. Cada banda corresponde a amostra de um indivíduo (n=5).

## 10-Análise Estatística

Após a captura das imagens dos géis de zimografia, estas foram analisadas através do programa “Image Pró-Plus” que permitiu selecionar automaticamente as áreas das bandas para uma posterior análise estatística, como mostrado na figura 16. Pôde-se observar um aumento significativo da área da atividade das bandas com o aumento de tempo de treinamento (Fig.17).



**Figura 16.** Seleção automática das áreas de atividade gelatinolítica pelo programa “Image Pró-Plus” (grupo de 72h).



**Figura 17.** Efeito do tempo de treinamento sobre a expressão da atividade gelatinolítica no ventrículo esquerdo de ratos. Dados expressos em médias  $\pm$  EP. \*\* $p < 0.001$  e \* $p < 0.05$  comparados com o controle;  $n = 5$  ratos por grupo. Houve um aumento significativo da expressão da atividade dos grupos 72, 96, e 120 horas quando comparada com o grupo controle.

## *DISCUSSÃO*

Este trabalho foi iniciado na expectativa de contribuir para a compreensão dos eventos moleculares associados ao remodelamento do miocárdio no exercício. Desta forma, com base no protocolo proposto por Hickson e col (1979), estabelecemos a metodologia apresentada que consiste de um treinamento agudo de natação com um componente aneróbico.

Embora tenha havido uma tendência do aumento do peso corporal dos animais treinados dos grupos 96 e 120 horas, não houve significância estatística nesses achados. Esses resultados estão em concordância com os de Hickson e col. (1979), que não mostraram aumento dos pesos dos animais treinados por um período de 28 semanas, apesar do nosso grupo experimental ser de ratos Wistar machos de quarenta a cinquenta dias de idade e com peso corporal de 160 a 180 gramas. Estes autores utilizaram ratas Wistar fêmeas adultas com seis meses de idade e peso de 275 gramas.

Para o estudo da variação do peso do coração julgamos apropriado o estudo da variação da relação peso do coração / peso corporal para todos os grupos já que se tratava de ratos machos jovens, como mencionado acima.

No trabalho de Hickson e col. (1979) os autores encontraram resultados significativos após dois dias de treinamento e todo aumento de peso induzido pelo exercício ocorreu dentro de quatorze dias mantendo-se então estável até o final do programa de treinamento de vinte e oito dias. Cabe observar, entretanto que estes autores utilizaram a variação de peso do coração dos animais treinados com os dos animais controles e não a relação peso do coração / peso corporal, que não variou significativamente no decurso do programa de treinamento, o que não ocorreu no nosso caso.

Encontramos uma tendência de aumento da relação peso coração / peso corporal para os grupos 72, 96 e 120 horas. Como a análise morfológica não mostrou a presença de edema ou infiltrado inflamatório, o que poderia justificar o ganho de peso, este poderia ser explicado pelo aumento de síntese protéica estimulada pelo exercício.

A comparação da relação peso sóleo / peso corporal dos animais controles e dos animais treinados dos três grupos mostrou, ao invés, uma redução estatisticamente significativa desta relação. É interessante observar que o músculo sóleo contém predominantemente fibras tipo I ao contrário do músculo gastrocnêmio.

Nossos resultados mostraram, no grupo de animais que treinaram durante seis horas por dia, por quatro dias consecutivos (grupo denominado 96 horas após início do treinamento ou simplesmente grupo 96 horas) uma tendência de aumento da expressão do gene do CPM- $\beta$  em relação à expressão do grupo controle, sedentário, embora ainda sem significação estatística, e confirmada com o grupo 120 horas, que mostrou aumento significativo da expressão do gene do CPM- $\beta$  em relação do grupo controle.

É conhecido que o coração adulto de pequenos animais como roedores e principalmente camundongos expressam o gene do CPM- $\alpha$  durante toda a condição adulta. Esse padrão de CPM pode se alterar no sentido de maior expressão de CPM- $\beta$  em várias condições fisiopatológicas incluindo a sobrecarga crônica de pressão por hipertensão induzida ( Haddad e col., 1995; Lompre e col., 1979; Mercadier e col., 1988; Morkin e col., 1993), hipotireoidismo ou deficiência tireoideana (DT ) (Caiozzo e Haddad, 1996; Dillmann , 1984; Gustafson e col., 1985); diabetes mellitus (Dhalla e col., 1998; Dillmann , 1980; Haddad e col., 1997); restrição crônica de energia (calórica) (Haddad e col., 1993; Swoap e col., 1994) e corrida crônica tipo resistência (endurance) (Fitzsimons e col., 1990; MacIntosh e col., 1985; MacIntosh e col., 1986).

Nos modelos de hipertensão induzida, restrição calórica e exercício o coração desses animais pode aumentar a expressão da CPM -  $\beta$  aproximadamente duas a quatro vezes o valor dos níveis de expressão dos controles; a expressão de CPM -  $\beta$  pode, entretanto, tornar-se expressa de forma exclusiva com o hipotireoidismo ou o diabetes mellitus. Das cinco intervenções citadas a mais potente é a do hipotireoidismo. O T3, (3, 5, 3' - triiodotironina) exerce sua ação biológica através da ligação com seus receptores nucleares, os receptores do hormônio da tireóide (DeGroot e col., 1989; Samuels e col., 1989), que são fatores de transcrição ligante-dependentes que modulam a atividade transcripcional por interação com seqüências de reconhecimentos específicos do DNA conhecidos como elementos responsivos á tireóide (TREs) localizados na região promotora dos genes alvo (Caiozzo e col., 1997; Evans , 1988); vários TREs estão estrategicamente localizados na região promotora de ambos os genes, CPM- $\alpha$  e CPM- $\beta$  .

O T3 regula a transcrição do gene da CPM- $\alpha$  e CPM- $\beta$  em sentidos opostos, aumentando a expressão do CPM- $\beta$  enquanto (Wright e col., 1999) reduz simultaneamente a do CPM- $\alpha$ ; há evidências que sugerem que as intervenções do diabetes e da privação crônica de energia possam mediar seus efeitos tanto diretamente como indiretamente através das ações do T3 (Haddad e col., 1997; Swoap e col., 1994).

No entanto os mecanismos da regulação aumentada da transcrição do gene da CPM- $\beta$  na hipertensão induzida parecem ser mais complexos e envolvem um conjunto diferente de fatores difusíveis (trans) e elementos regulatórios cis no promotor do gene do CPM- $\beta$ .

Por outro lado, no caso do exercício tipo resistência tanto ratos recém nascidos como adultos condicionados exclusivamente por corrida de resistência respondem com modesto aumento da expressão da CPM- $\beta$  compensado com diminuição concomitante

da expressão relativa da CPM- $\alpha$  (Fitzsimons e col., 1990; MacIntosh e col., 1985; MacIntosh e col., 1986).

Embora os fatores que medeiam essas transformações permaneçam pobremente compreendidos, é, no entanto interessante a constatação de MacIntosh e col. (1986) de que em ratos recém nascidos simpatectomizados submetidos a treinamento de resistência a transformação de CPM- $\alpha$  para CPM- $\beta$  é aumentado em relação à que ocorre no grupo treinado controle, não simpatectomizado. Essa observação provê alguma evidência de que eventos subcelulares que estão associados com a depressão da atividade do sistema nervoso simpático – que é uma resposta adaptativa comum ao treinamento de resistência – possam favorecer uma maior expressão de CPM- $\beta$ .

O mecanismo subjacente a este tipo de adaptação na expressão do gene da CPM é ainda desconhecido, mas é possível que a simpatectomia possa aumentar os transientes sinalizadores do cálcio na célula miocárdica de forma a ativar o fator calcineurina nuclear da via dos linfócitos T ativados.

No nosso experimento constatamos aumento significativo da expressão da CPM- $\beta$  no grupo 120 horas. Utilizamos um protocolo de natação que qualificamos como agudo no sentido dos animais serem exercitados durante seis horas por dia, por cinco dias consecutivos; esse resultado coincide com os da literatura para corrida de endurance, citados acima; a avaliação da expressão simultânea do CPM- $\alpha$  está atualmente em andamento, e não consta do presente trabalho.

Com relação ao protocolo de natação utilizado pode-se, ainda, considerar que tal intensidade de exercício possa ultrapassar, em alguns momentos, o limiar de anaerobiose e influenciar a expressão gênica das CPM- $\alpha$  e CPM- $\beta$  no músculo cardíaco.

De fato as dosagens de lactato no segundo conjunto de animais treinados mostraram que o exercício nessa intensidade tem um componente anaeróbico no final de

cada sessão de treinamento, que pode se constituir em um fator adicional para induzir modificações na expressão gênica diferencial das CPM- $\alpha$  e CPM- $\beta$ .

Os protocolos de natação descritos na literatura para o estudo da expressão gênica diferencial das isoformas da CPM no músculo cardíaco não contemplam características de intensidade e componente anaeróbico como as deste trabalho, até onde vai o nosso conhecimento. Constam de sessões de exercício de uma hora por dia e necessitam uma duração de treinamento de duas a oito semanas para induzirem modificações na expressão das CPM alfa e beta nos ventrículos de ratos e camundongos.

O protocolo utilizado neste trabalho mostrou um impacto significativo sobre as concentrações da lactacidemia antes e após as sessões de exercício. Esta redução ocorreu na condição de repouso antes do primeiro dia de exercício em relação à mesma condição nos demais dias, exceto quando feita a comparação com o terceiro dia (72 horas). Uma possível explicação para o fato deve ser a redução do nível de estresse no momento da coleta da amostra sanguínea da cauda do animal com o decorrer dos dias, uma vez que o mesmo permanecia contido e a secção da ponta da cauda para se proceder a coleta era feita sem anestesia no primeiro dia.

Com relação a lactacidemia média das três amostras colhidas imediatamente após cada um dos três períodos de duas horas de exercício de cada dia, observamos redução significativa dos achados do primeiro dia em relação a todos os demais.

As possíveis explicações para este achado são a melhor redistribuição da perfusão sanguínea dos músculos ativos no exercício com o decorrer do treinamento; uma maior capacidade de extração de  $O_2$  pelos músculos ativos levando a um aumento da diferença artério-venosa de oxigênio; a um aumento da eficiência das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa (ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons)

promovendo um crescente componente aeróbico durante o exercício ao longo do treinamento e finalmente a uma melhora na eficiência mecânica do ato de nadar que ocorre com o progredir do treinamento, traduzida por uma melhora da relação trabalho físico / consumo de O<sub>2</sub>, pois o animal passa a utilizar grupos musculares específicos.

O impacto fisiológico das intervenções que induzem o aumento da expressão do gene do CPM- $\beta$  no coração de pequenos roedores é o de promover uma economia no consumo da energia dispendida nos processos de produção de força e potência – pontes cruzadas e ciclo do cálcio – em face de esforço mecânico adicional que o coração suporta tanto para vencer a pós-carga aumentada do estado hipertensivo como para acomodar a sobrecarga de volume associada ao exercício de endurance (Alpert e col., 1982; Swynghedauw, 1988).

Já no caso do diabetes mellitus, do hipotireoidismo e nas condições de privação calórica a forte tendência no sentido de maior expressão da CPM- $\beta$  está relacionada com um estado funcional do coração caracterizado por contratilidade, frequência cardíaca e débito cardíaco (volume minuto) intrinsecamente diminuídos, ou seja, condições consistentes com a conservação de energia pelo animal, tanto pelo coração como pelo organismo como um todo.

Em suma, o coração dos pequenos animais pode ser remodelado tanto bioquímica como funcionalmente, de acordo com a demanda de consumo crônico de energia imposta tanto ao coração como ao organismo em geral.

Há evidências na literatura de que adaptações funcionais semelhantes possam ocorrer no sistema cardiovascular de humanos e estas alterações parecem estar associadas com algum grau de plasticidade envolvendo as isoformas da CPM (Morkin e col., 1991; Schaub e col., 1997).

A atividade gelatinolítica aumentada constatada precocemente no grupo 72 horas é precondição importante para o início do remodelamento do ventrículo esquerdo dos animais treinados que ocorreu com o aumento significativo da relação peso do coração /peso corporal nos grupos 96 e 120 horas com relação ao grupo controle. Estes achados são coerentes com os de Hickson e cols. (1979), que constataram um rápido aumento da concentração de RNA dos ventrículos em resposta ao exercício, já significativo após o primeiro, o segundo e o terceiro dias de exercício e que daí em diante retornou ao nível controle embora o conteúdo de RNA total do coração permanecesse significativamente elevado, *grosso modo* em proporção ao peso do coração. Detectaram também aumento do peso do coração e do conteúdo de proteína após o segundo dia de treinamento. Este RNA total precocemente aumentado veicula obviamente, entre várias outras, a expressão para a síntese da(s) metalopeptidase(s) de matriz necessária(s) para o remodelamento ventricular e a expressão para a síntese protéica (responsável, ao menos em parte, pelo aumento da relação peso do coração / peso corporal) e, em particular, para a síntese da CPM beta, expressões estas que constatamos neste trabalho. O aumento do peso do coração contrabalança o aumento do RNA total de modo a fazer a concentração de RNA no músculo cardíaco retornar aos valores do grupo controle.

No conjunto, estes resultados mostram que o coração de ratos pode ser remodelado precocemente após um programa de exercício agudo de natação com componente anaeróbico. Estas alterações são importantes tanto para permitir que o coração se adapte rapidamente a esta maior demanda energética e também permita o crescimento do tecido por aumentar a atividade das enzimas remodeladoras.

## *Conclusões*

1. O protocolo de exercício intenso de natação adotado neste trabalho provocou um aumento significativo do peso do coração dos ratos treinados, em relação aos controles, indicando a possibilidade de início precoce de um processo de remodelamento cardíaco.
2. A análise morfológica não evidenciou alterações significativas no coração dos ratos treinados, e nem a presença de sinais de inflamação tais como edema ou infiltrado inflamatório, sugerindo que o protocolo de esforço adotado é inócuo em produzir alterações patológicas que poderiam ser eventualmente co-indutoras do remodelamento.
3. Este protocolo experimental induziu um significativo e precoce (72 hs) aumento da atividade de gelatinases no ventrículo esquerdo, pré condição para o remodelamento ulterior.
4. A expressão da CPM- $\beta$  no ventrículo esquerdo do coração dos ratos treinados após 120h pode indicar resposta adaptativa no sentido de economia energética para o trabalho do miocárdio.
5. Os resultados indicam que o miocárdio pode intensificar precocemente (72h) o seu remodelamento tecidual para atender à sobrecarga de esforço e possivelmente também como resposta ao aumento da lactacidemia.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMS, G. R.; MCCUE, S. A.; ZENG, M.;BALDWIN, K. M. Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. **Am.J.Physiol**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R954-R961, 1999.
- ALPERT BS, FLOOD NL, STRONG WB, DOVER EV, DURANT RH, MARTIN AM, BOOKER DL. Responses to ergometer exercise in a healthy biracial population of children. **J Pediatr**. 101(4):538-45, 1982.
- ANVERSA, P.; LERI, A.; KAJSTURA, J.;NADAL-GINARD, B. Myocyte growth and cardiac repair. **J.Mol.Cell Cardiol.**, v. 34, n. 2, p. 91-105, 2002.
- BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **J.Appl.Physiol**, v. 90, n. 1, p. 345-357, 2001.
- BERTOCCI, L.A., GOLLNICK, P.D. pH effect on mitochondria and individual enzyme function. **Med. Sci. Sports Exerc**. 17:244, 1985.
- BING, R.J. Reparative processes in heart muscle following myocardial infarction. **Cardiology**, v.56 n.1, p.314-24, 1971.
- BING, O.H.L.; MATSUSHITA, S.; FARBURG, B.L.; LEVINE, H.J. Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. **Circ. Res**. v. 28, p. 234-245, 1971.
- BODNER, G.M. Metabolism: PartI. Glycolysis, or the Embden-Myerhof pathway. **J. Chem. Educ**. 63: 566 1986.
- BODNER, G.M. The tricarboxylic acid (TCA), citric acid, Krebs cycle. **J. Chem Educ**. 63: 673 1986.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.;NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 267-283, 2000.
- BROOKS, G.A. Physical activity and carbohydrate metabolism. In: Bouchard, C. et al., eds. Physical activity, fitness, and health. Champaign, IL: Human Kinetics, 1994.
- CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. **Exerc.Sport Sci.Rev.**, v. 24, p. 321-361, 1996.
- CAIOZZO, V.J.; BAKER, M.J.; MCCUE, S.A.; BALDWIN, K.M. Single-fiber and whole muscle analyses of MHC isoform plasticity: interaction between T3 and unloading. **Am J Physiol.** 273(3 Pt 1):C944-52, 1997.
- CANNON, R. O., III; BUTANY, J. W.; MCMANUS, B. M.; SPEIR, E.; KRAVITZ, A. B.; BOLLI, R. et al. Early degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat. **Am.J.Cardiol.**, v. 52, n. 3, p. 390-395, 1983.
- CAIRNS SP, HING WA, SLACK JR, MILLS RG, LOISELLE DS. Role of extracellular  $[Ca^{2+}]$  in fatigue of isolated mammalian skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** 84: 1395-1406, 1998.
- CLEUTJENS, J. P.; VERLUYTEN, M. J.; SMITHS, J. F.;DAEMEN, M. J. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. **Am.J.Pathol.**, v. 147, n. 2, p. 325-338, 1995.

- CONDON, K.; SILBERSTEIN, L.; BLAU, H. M.; THOMPSON, W. J. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. **Dev.Biol.**, v. 138, n. 2, p. 256-274, 1990.
- CORTRIGHT, R. N.; ZHENG, D.; JONES, J. P.; FLUCKEY, J. D.; DICARLO, S. E.; GRUJIC, D. et al. Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation. **Am.J.Physiol.**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. E217-E221, 1999.
- COX, R. D.; BUCKINGHAM, M. E. Actin and myosin genes are transcriptionally regulated during mouse skeletal muscle development. **Dev.Biol.**, v. 149, n. 1, p. 228-234, 1992.
- CROWE, D. L. ; SHULER, C. F. Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix. **Histol.Histopathol.**, v. 14, n. 2, p. 665-671, 1999.
- D'ALBIS, A.; COUTEAUX, R.; JANMOT, C.; ROULET, A.; MIRA, J. C. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. **Eur.J.Biochem.**, v. 174, n. 1, p. 103-110, 1988.
- D'ALBIS, A.; ANGER, M.; LOMPRES, A. M. Rabbit masseter expresses the cardiac alpha myosin heavy chain gene. Evidence from mRNA sequence analysis. **FEBS Lett.**, v. 324, n. 2, p. 178-180, 1993.
- DEGROOT, L.J.; NAKAI, A.; SAKURAI, A.; MACCHIA, E. The molecular basis of thyroid hormone action. **J Endocrinol Invest.** v.12(11), p.843-61, 1989.
- DHALLA, N.S.; LIU, X.; PANAGIA, V.; TAKEDA, N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. **Cardiovasc Res.** 40(2):239-47, 1998.

- DILLMANN, W.H. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. **Diabetes**. 29(7):579-82, 1980.
- DILLMANN, W.H.; BARRIEUX, A.; REESE, G.S. Effect of diabetes and hypothyroidism on the predominance of cardiac myosin heavy chains synthesized in vivo or in a cell-free system. **J Biol Chem**. 259(4):2035-8, 1984.
- DOCHERTY, A. J. ; MURPHY, G. The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. **Ann.Rheum.Dis.**, v. 49, n. 1, p. 469-479, 1990.
- DUCHARME, A.; FRANTZ, S.; AIKAWA, M.; RABKIN, E.; LINDSEY, M.; ROHDE, L. E. et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. **J.Clin.Invest**, v. 106, n. 1, p. 55-62, 2000.
- EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science** v. 240(4854), p. 889-95, 1988.
- FIEBIG, R.; GORE, M. T.;JI, L. L. Exercise attenuates nuclear protein binding to gene regulatory sequences of hepatic fatty acid synthase. **J.Appl.Physiol**, v. 87, n. 3, p. 1009-1015, 1999.
- FITZSIMONS, D.P., DIFEE, G.M., HERRICK, R.E., BALDWIN, K.M. Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. **J Appl Physiol**. 68(5):1950-1955, 1990.
- FROHLICH, E. D. Left ventricular hypertrophy and sudden death. **J.Am.Coll.Cardiol.**, v. 32, n. 5, p. 1460-1462, 1998.

- GOLDSPINK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. **Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.**, v. 120, n. 1, p. 5-15, 1998.
- GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **J. Anat.**, v. 194 ( Pt 3), p. 323-334, 1999.
- GUNJA-SMITH, Z.; MORALES, A. R.; ROMANELLI, R.; WOESSNER, J. F., Jr. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. **Am. J. Pathol.**, v. 148, n. 5, p. 1639-1648, 1996.
- GUSTAFSON, T.A.; MARKHAM, B.E.; MORKIN, E. Analysis of thyroid hormone effects on myosin heavy chain gene expression in cardiac and soleus muscles using a novel dot-blot mRNA assay. **Biochem Biophys Res Commun.** 130(3):1161-1167, 1985.
- HADDAD, F., BODELL, P.W.; MCCUE, S.A.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Food restriction-induced transformations in cardiac functional and biochemical properties in rats. **J Appl Physiol.** 74(2):606-612, 1993.
- HADDAD F.; BODELL P.W.; BALDWIN, K.M. Pressure-induced regulation of myosin expression in rodent heart. **J Appl Physiol.** v. 78 n. 4, p.1489-1495, 1995.
- HADDAD, F.; BODELL, P.W.; MCCUE, S.A.; BALDWIN, K.M. Effects of diabetes on rodent cardiac thyroid hormone receptor and isomyosin expression. **Am J Physiol.** 272(5 Pt 1):E856-63, 1997.
- HAN, X. Y.; WANG, W.; KOMULAINEN, J.; KOSKINEN, S. O.; KOVANEN, V.; VIHKO, V. et al. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes

in rat skeletal muscle following downhill running. **Pflugers Arch.**, v. 437, n. 6, p. 857-864, 1999.

HEYMANS, S.; LUTTUN, A.; NUYENS, D.; THEILMEIER, G.; CREEMERS, E.; MOONS, L. et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. **Nat.Med.**, v. 5, n. 10, p. 1135-1142, 1999.

HICKSON, R. C.; HAMMONS, G. T.; HOLOSZY, J. O. Development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. **Am.J.Physiol**, v. 236, n. 2, p. H268-H272, 1979.

HIGASHINO, F.; YOSHIDA, K.; NOUMI, T.; SEIKI, M.; FUJINAGA, K. Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. **Oncogene**, v. 10, n. 7, p. 1461-1463, 1995.

HOGAN MC, GLADDEN LB, KURDAK SS, POOLE DC. Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. **Med. Sci. Sports Exerc.** 27: 371, 1995.

HOLUBARSCH, C.H.; HOLUBARSCH, T.; JACOB, R.; MEDUGORAC, I.; THIEDEMANN, K. Passive elastic properties of myocardium in different models of hypertrophy: a study comparing mechanical, chemical, and morphometric parameters. **Perspect. Cardiovasc. Res.** v.7, p. 323-336, 1983.

IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. **Science**, v. 231, n. 4738, p. 597-600, 1986.

- IZUMO, S.; MAHDAVI, V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. **Nature**, v. 334, n. 6182, p. 539-542, 1988.
- JACOBS I, HERMISTON AJ, SYMONS JD. Effects of prior exercise or ammonium chloride ingestion on muscular strength and endurance. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25: 809-814, 1993.
- JANICKI, J. S. & MATSUBARA, B. B. Myocardial collagen and left ventricular diastolic dysfunction. In: GAASH, W., LEWINTER, M. eds. **Left ventricular diastolic dysfunction and heart failure**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994, p. 125-140.
- JASCHINSKI, F, SCHULER, M, PEUKER, H, PETTE, D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity, **Am. J. Physiol.**, v. 274: p.365-70, 1998.
- KIM, H. E.; DALAL, S. S.; YOUNG, E.; LEGATO, M. J.; WEISFELDT, M. L.;D'ARMIENTO, J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. **J.Clin.Invest**, v. 106, n. 7, p. 857-866, 2000.
- KIM, Y. B.; INOUE, T.; NAKAJIMA, R.; SHIRAI-MORISHITA, Y.; TOKUYAMA, K.;SUZUKI, M. Effect of long-term exercise on gene expression of insulin signaling pathway intermediates in skeletal muscle. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 254, n. 3, p. 720-727, 1999.
- KNAUPER, V.; KRAMER, S.; REINKE, H.;TSCHESCHE, H. Characterization and activation of procollagenase from human polymorphonuclear leucocytes. N-terminal sequence determination of the proenzyme and various proteolytically activated forms. **Eur.J.Biochem.**, v. 189, n. 2, p. 295-300, 1990.

- KRAFT, R., BRAVO-ZEHNDER, M., TAYLOR, D. A., LEINWAND, L. A. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for rat beta cardiac myosin heavy chain. **Nucleic Acids Res.** V. 17 n. 18, p. 7529-7530, 1989.
- KUO, C. H.; BROWNING, K. S.; IVY, J. L. Regulation of GLUT4 protein expression and glycogen storage after prolonged exercise. **Acta Physiol Scand.**, v. 165, n. 2, p. 193-201, 1999.
- LAURENT, G. J. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. **Am. J. Physiol.**, v. 252, n. 1 Pt 1, p. C1-C9, 1987.
- LEE, Y., NADAL-GINARD, B., MAHDAVI, V., IZUMO, S. Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. **Mol Cell Biol.** 17(5):2745-2755, 1997.
- LEE, R. T. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 11, n. 5, p. 202-205, 2001.
- LEE, R. T.; YAMAMOTO, C.; FENG, Y.; POTTER-PERIGO, S.; BRIGGS, W. H.; LANDSCHULZ, K. T. et al. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 17, p. 13847-13851, 2001.
- LI, Y. Y.; MCTIERNAN, C. F.; FELDMAN, A. M. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. **Cardiovasc. Res.**, v. 46, n. 2, p. 214-224, 2000.
- LOMPRE, A. M.; SCHWARTZ, K.; D'ALBIS, A.; LACOMBE, G.; VAN THIEM, N.; SWYNGHEDAUW, B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. **Nature** v. 282 n. 5734, p. 105-107, 1979.

- LOMPRE, A. M.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. **J.Biol.Chem.**, v. 259, n. 10, p. 6437-6446, 1984.
- LORELL, B. H. ; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470-479, 2000.
- LYONS, G. E.; ONTELL, M.; COX, R.; SASSOON, D.; BUCKINGHAM, M. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. **J. Cell Biol.** v. 111, p. 1465-1476, 1990a.
- LYONS, G. E.; SCHIAFFINO, S.; SASSOON, D.; BARTON, P.; BUCKINGHAM, M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. **J.Cell Biol.**, v. 111, n. 6 Pt 1, p. 2427-2436, 1990.
- MACINTOSH, A.M., BALDWIN, K.M., HERRICK, R.E., MULLIN, W.M. Effects of training on biochemical and functional properties of rodent neonatal heart. **J Appl Physiol.** 59(5):1440-5, 1985.
- MACRAE HS, DENNIS SC, BOSCH AN, NOAKES TD., Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise. **J. Appl. Physiol.** 72: 1649-56, 1992.
- MAHDAVI, V.; IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. **Circ.Res.**, v. 60, n. 6, P. 804-814, 1987.
- MAINWOOD, G.W., RENAUD, J.M. The effect of acid-base on fatigue of skeletal muscle. **Can J. Physiol. Pharmacol.** 63: 403, 1985.

- MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B.; OKOSHI, M. P.; CICOGNA, A. C.; JANICKI, J. S. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. **Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol**, v. 279, n. 4, p. H1534-H1539, 2000.
- MCKOY, G.; LEGER, M. E.; BACOU, F.; GOLDSPIK, G. Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. **Dev.Dyn.**, v. 211, n. 3, p. 193-203, 1998.
- MCKOY, G.; ASHLEY, W.; MANDER, J.; YANG, S. Y.; WILLIAMS, N.; RUSSELL, B. et al. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. **J.Physiol**, v. 516 ( Pt 2), p. 583-592, 1999.
- MERCADIER, J. J.; LOMPRES, A. M.; SCHWARTZ, K. [Phenotype changes in myocardial proteins in hemodynamic overloads]. **Arch.Mal Coeur Vaiss.**, v. 81 Spec No, p. 23-27, 1988.
- MORKIN, E.; EDWARDS, J.G.; TSIKA, R.W.; BAHL, J.J.; FLINK, I.L. Regulation of human cardiac myosin heavy chain gene expression by thyroid hormone. **Adv Exp Med Biol**. 308:143-7, 1991.
- MORKIN, E., PENNOCK, G.D.; RAYA, T.E.; BAHL, J.J.; GOLDMAN, S. Studies on the use of thyroid hormone and a thyroid hormone analogue in the treatment of congestive heart failure. **Ann Thorac Surg**. Jul;56(1 Suppl):S54-60, 1993.
- NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J.Clin.Oncol.**, v. 18, n. 5, p. 1135-1149, 2000.

- PETTE, D. ; STARON, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. **Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.**, v. 116, p. 1-76, 1990.
- RUSHBROOK, J. I.; WEISS, C.; KO, K.; FEUERMAN, M. H.; CARLETON, S.; ING, A. et al. Identification of alpha-cardiac myosin heavy chain mRNA and protein in extraocular muscle of the adult rabbit. **J.Muscle Res.Cell Motil.**, v. 15, n. 5, p. 505-515, 1994.
- SAMUELS, H.H.; FORMAN, B.M.; HOROWITZ, Z.D.; YE, Z.S. Regulation of gene expression by thyroid hormone. **Annu. Rev Physiol.** v. 51, p. 623-39, 1989.
- SCHAUB, M.C.; HEFTI, M.A.; HARDER, B.A.; EPPENBERGER, H.M. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. **J Mol Med.** v. 75(11-12), p. 901-20, 1997.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiol Rev.**, v. 76, n. 2, p. 371-423, 1996.
- SHAPIRO, S.D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr. Op. Cell Biol.** v.10, p. 620-608, 1998.
- SISSMAN, N. J. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. **Am.J.Cardiol.**, v. 25, n. 2, p. 141-148, 1970.
- SKERRY, T. M. Identification of novel signaling pathways during functional adaptation of the skeleton to mechanical loading: the role of glutamate as a paracrine signaling agent in the skeleton. **J.Bone Miner.Metab**, v. 17, n. 1, p. 66-70, 1999.
- SPINALE, F. G.; COKER, M. L.; KROMBACH, S. R.; MUKHERJEE, R.; HALLAK, H.; HOUCK, W. V. et al. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. **Circ.Res.**, v. 85, n. 4, p. 364-376, 1999.

SPINALE, F. G. Novel approaches to retard ventricular remodeling in heart failure. **Eur.J.Heart Fail.**, v. 1, n. 1, p. 17-23, 1999.

SPINALE, F. G.; COKER, M. L.; HEUNG, L. J.; BOND, B. R.; GUNASINGHE, H. R.; ETOH, T. et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. **Circulation**, v. 102, n. 16, p. 1944-1949, 2000.

SPINALE, F. G.; COKER, M. L.; BOND, B. R.; ZELLNER, J. L. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. **Cardiovasc.Res.**, v. 46, n. 2, p. 225-238, 2000.

SUBRAMANIAM, A.; JONES, W. K.; GULICK, J.; WERT, S.; NEUMANN, J.; ROBBINS, J. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. **J.Biol.Chem.**, v. 266, n. 36, p. 24613-24620, 1991.

SUMIDA KD, URDIALES JH, DONOVAN CM. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 74: 782-7, 1993.

SWOAP, S.J.; HADDAD, F.; BODELL, P.; BALDWIN, KM. Effect of chronic energy deprivation on cardiac thyroid hormone receptor and myosin isoform expression. **Am J Physiol.** 266(2 Pt 1):E254-60, 1994.

SWYNGHEDAUW B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. **Physiol Rev.** v. 66(3), p. 710-71, 1986.

SWYNGHEDAUW, B.; SCHWARTZ, K.; LAUER, B.; LOMPRES, A. M.; MERCADIER, J. J.; SAMUEL, J. L. et al. Striated muscle overload. **Eur.Heart J.**, v. 9 Suppl E, p. 1-6, 1988.

- TALMADGE, R. J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 5, p. 661-679, 2000.
- THIEDEMANN, K. U.; HOLUBARSCH, C.; MEDUGORAC, I.; JACOB, R. Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. **Basic Res. Cardiol.**, v. 78, n. 2, p. 140-155, 1983.
- THOMAS, C. V.; COKER, M. L.; ZELLNER, J. L.; HANDY, J. R.; CRUMBLY, A. J., III; SPINALE, F. G. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 97, n. 17, p. 1708-1715, 1998.
- THOMPSON, W. R.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 33, p. 22678-22688, 1991.
- TORRE-AMIONE, G.; KAPADIA, S.; LEE, J.; DURAND, J-B.; BIES, R.D.; YOUNG, J.B.; MANN, D.L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. **Circulation** v.93, p. 704-711, 1996.
- TREMBLE, P.; DAMSKY, C. H.; WERB, Z. Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. **J. Cell Biol.**, v. 129, n. 6, p. 1707-1720, 1995.
- TSIKA, R. W.; BAHL, J. J.; LEINWAND, L. A.; MORKIN, E. Thyroid hormone regulates expression of a transfected human alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal rat heart cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 1, p. 379-383, 1990.

- TYAGI, S. C. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. **Mol.Cell Biochem.**, v. 168, n. 1-2, p. 1-12, 1997.
- WALKER, C. A. ; SPINALE, F. G. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. **J.Thorac.Cardiovasc.Surg.**, v. 118, n. 2, p. 375-382, 1999.
- WEBER, K. T.; PICK, R.; JALIL, J. E.; JANICKI, J. S.;CARROLL, E. P. Patterns of myocardial fibrosis. **J.Mol.Cell Cardiol.**, v. 21 Suppl 5, p. 121-131, 1989.
- WEBER, K. T. Cardioreparation in hypertensive heart disease. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 588-591, 2001.
- WEISS, A., LEINWAND, L.A. The mammalian myosin heavy chain gene family. **Ann.Rev.Cell Dev Biol.** v.12, p. 417-439, 1996.
- WEYDERT, A.; BARTON, P.; HARRIS, J.A.; PINSET, C.; BUCKINGHAM, M. Developmental pattern of mouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts in vivo and in vitro. **Cell**, v. 49, p. 121-129, 1987.
- WRIGHT, C.E.; HADDAD, F.; QIN, A.X.; BODELL, P.W.; BALDWIN, K.M. In vivo regulation of beta-MHC gene in rodent heart: role of T3 and evidence for an upstream enhancer. **Am J Physiol.** v. 276(4 Pt 1):C883-91, 1999.
- YANG, H.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.;GOLDSPINK, G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **J.Anat.**, v. 190 ( Pt 4), p. 613-622, 1997.
- YANG, S.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.;GOLDSPINK, G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. **J.Muscle Res.Cell Motil.**, v. 17, n. 4, p. 487-495, 1996.