



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE,
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES.

HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À
NATAÇÃO EM DIFERENTES VOLUMES E INTENSIDADES DE
TREINAMENTO: AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

DOUGLAS DOS SANTOS SOARES

Porto Alegre

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE,
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À
NATAÇÃO EM DIFERENTES VOLUMES E INTENSIDADES DE
TREINAMENTO: AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

DOUGLAS DOS SANTOS SOARES

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Biolo

Co-orientador: Dr. Santiago Alonso Tobar Leitão

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Douglas dos Santos

Hipertrofia cardíaca em camundongos submetidos à natação em diferentes volumes e intensidades de treinamento: avaliação do sistema renina angiotensina / Douglas dos Santos Soares. -- 2017.
69 f.

Orientadora: Andreia Biolo.

Coorientador: Santiago Alonso Tobar Leitão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. sistema renina angiotensina. 2. hipertrofia cardíaca. 3. exercício. I. Biolo, Andreia, orient. II. Leitão, Santiago Alonso Tobar, coorient. III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental e do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Apoio experimental

Unidade de Experimentação Animal (HCPA),
Unidade de Patologia Experimental (HCPA),
Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (HCPA),

Apoio financeiro

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA)

Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família.

Sem seu apoio não estaria onde estou.

*Aos professores Andreia Biolo e Santiago Tobar
pela orientação, oportunidade e confiança depositada. Vocês são um
exemplo para mim. Obrigado!*

*Ao Professor Michael Andrades,
pelo o apoio intelectual e parceria.*

Você é um exemplo!

*À colega e amiga Graziela H. Pinto,
pelo apoio intelectual, parceria e conselhos durante o meu mestrado.*

Sua participação foi fundamental na realização deste projeto.

Ainda quero aprender muito mais com você. Obrigado!

*Ao alunos de iniciação científica,
Daniel Sturza e Amanda Lopes pelo apoio e parceria neste trabalho.*

Vocês fizeram a diferença.

Aos professores Rohde e Nadine

*por oportunizar a realização desde e de muitos outros trabalhos na
área da cardiologia. Obrigado por fazerem história.*

*Ao amigos e colegas de laboratório
pelos momentos de aprendizado e companheirismos.*

Vocês são demais!

À UFRGS e HCPA por todo o apoio e estrutura.

*Às Unidades de Experimentação Animal, Patologia Experimental e
Análises Moleculares e de Proteínas pelo apoio e estrutura.*

*E o apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital
de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) Conselho de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CNPq).*

SUMÁRIO

PARTE I	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Hipertrofia Cardíaca	17
1.1.1. Hipertrofia Cardíaca Fisiológica	18
1.1.2. Hipertrofia Cardíaca Patológica	20
1.2. Sistema Renina Angiotensina e a hipertrofia cardíaca	22
2. JUSTIFICATIVA:	25
3. HIPÓTESE	26
4. OBJETIVO	27
4.1. Objetivo Principal	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. Referências parte I:	28
PARTE II	36
6. Artigo Original	36
ABSTRACT	38
6.1. INTRODUCTION	39
6.2. MATERIAL AND METHODS	40
6.2.1. Animals and experimental protocol	40
6.2.2. Exercise adaptation - Aerobic Capacity Assessment	40
6.2.3. Euthanasia and tissue collection	41
6.2.4. Cardiomyocyte Fibrosis	41
6.2.5. Angiotensin Quantification	42
6.2.6. Angiotensin Receptor Analysis	43
6.2.7. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	44
6.2.8. Statistical analyses	44
6.3. RESULTS	46
6.3.1. Hypertrophy and Oxidative Capacity Assessment	46
6.3.2. Angiotensin System Assessment	47
6.3.3. Fetal Genes	49
6.4. DISCUSSION	50
6.5. CONCLUSIONS	53

6.6. FUNDING.....	54
6.7. DISCLOSURES.....	54
6.8. REFERENCES.....	55
PARTE III.....	59
7. DISCUSSÃO:.....	60
8. CONCLUSÃO:.....	65
9. PERSPECTIVAS:.....	66
10. REFERÊNCIAS PARTE III:.....	67

RESUMO:

O exercício físico modula o sistema renina angiotensina (SRA), que tem um importante papel na fisiologia cardíaca, especialmente na promoção da hipertrofia cardíaca. O SRA pode ser dividido em dois eixos principais: o eixo clássico – representado pelo receptor AT1 (AT1R) ativado pela angiotensina II (ANG II) – e o eixo alternativo – que é ativado pela interação da angiotensina 1-7 (ANG 1-7) com o receptor MAS (MASR). O balanço entre os eixos do SRA pode determinar um remodelamento cardíaco fisiológico ou patológico. Estudos têm demonstrado que altos volumes de exercício físico podem desencadear possíveis efeitos deletérios ao sistema cardiovascular. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar a hipertrofia cardíaca, o eixo clássico e o eixo alternativo do SRA no miocárdio de camundongos submetidos a variados volumes e intensidades de treinamento em natação. Para tal, camundongos balb/c foram divididos em três grupos: (I) sedentário (SED), (II) treinados 2x ao dia (T2) sem sobrecarga e (III) treinado 3x ao dia com sobrecarga de 2% do peso corporal (T3), totalizando 6 semanas de treinamento efetivo. Ambos os grupos treinados desenvolveram hipertrofia cardíaca, sem diferença nos níveis de fibrose. Bioquimicamente, observamos um aumento nos níveis do receptor MASR somente no grupo T2, enquanto que os níveis de AT1R aumentaram somente no grupo T3. Contudo, não foi observada alteração na concentração dos peptídeos ANGI, ANGII e ANG 1-7 no tecido cardíaco entre os grupos. Além do mais, o grupo T3 demonstrou um aumento na expressão de miosina de cadeia pesada- β em comparação ao grupo SED e redução da expressão da isoforma- α em relação ao grupo T2. Em conclusão, nossos resultados sugerem que ambos os protocolos de exercício promoveram uma hipertrofia cardíaca semelhante, mas o protocolo com maior volume e intensidade promoveu uma ativação diferencial dos receptores do SRA e reativação de genes fetais. Estudos que avaliem protocolos com maior duração são necessários para esclarecer se estas mudanças representam uma ativação precoce dos mecanismos relatados para o desenvolvimento de um fenótipo com características patológicas.

Palavras-chaves: sistema renina angiotensina, hipertrofia cardíaca, exercício.

ABSTRACT

Exercise promotes physiological cardiac hypertrophy and induces the activation of the renin angiotensin system (RAS), which plays an important role in cardiac physiology, both through the classical axis – represented by the angiotensin II receptor type 1 (AT1) activated by angiotensin II (ANG II) – and the alternative axis – which is activated by the angiotensin 1-7 interaction with the MAS receptor. However, very intense exercise protocols could have deleterious effects on the cardiovascular system. In this context, we aimed to analyze the cardiac hypertrophy phenotype, as well as the classical (ANGII/AT1) and alternative (ANG1-7/MAS) RAS axes, in the myocardium of mice submitted to varying volume and intensity swimming exercises for the development of cardiac hypertrophy. To this end, male balb/c mice were divided into three groups: (I) sedentary (SED), (II) swimming twice a day (T2) without overload, and (III) swimming three times a day with a 2% body weight overload (T3), totaling six weeks of training. Both training groups developed cardiac hypertrophy. Interestingly, we observed an increase in MAS receptor levels only in group T2, while AT1 levels increased only in group T3. However, no change was observed regarding the levels of angiotensin peptides ANG-I, ANG-II, and ANG1-7, in either group. In addition, group T3 displayed a higher expression of myosin heavy chain- β (MHC- β) and lower expression levels of the alpha isoform (MHC- α). Fibrosis was not observed in any of the groups. In conclusion, our results suggest that both exercise protocols promoted a similar cardiac hypertrophy phenotype, but the protocol applying increased volume and intensity resulted in differential activation of RAS receptors and fetal gene reactivation. Studies applying longer duration protocols could elucidate if these changes represent early activation of mechanisms related to hypertrophy development with phenotypic pathological characteristics.

KEYWORDS: renin angiotensin system, cardiac hypertrophy, exercise.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 – Representação esquemática da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica ^[1].

Figura 2 – Representação esquemática do SRA ^[2]

LISTA DE ABREVIATURAS:

AMPK – Adenosina monofosfato Ativada por Proteína Quinase

ANGI – Angiotensina I

ANGII – Angiotensinas II

ANG1-7 – Angiotensina 1-7

ANG1-9 – Angiotensina 1-9

ANP – Peptídeo Natriurético Atrial

AT1 – Receptor AT1

AT2 – Receptor AT2

AT3 – Receptor AT3

AT4 – Receptor AT4

A.U – Unidades Arbitrárias

BNP – Peptídeo Natriurético Cerebral

Ca⁺²/ATPase SERCA2 – Enzima ATPase Cálcio Dependente

cDNA – DNA complementar

CHI – Índice de Hipertrofia Cardíaca

ECAI – Enzima Conversora de Angiotensina I

ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina II

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HF – Insuficiência Cardíaca

HW/BW – Razão do peso do coração e peso corporal

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IQR – Intervalo Interquartil

LV – Ventrículo Esquerdo

MAS – Receptor MAS

MHC- α – Miosina de Cadeia Pesada Alfa

MHC- β – Miosina de Cadeia Pesada Beta

MLSS – Máxima Fase Estável de Lactato

mRNA – Micro-RNA

Myh6 – Gene α -MHC

Myh7 – Gene β -MHC

NPPA – Gene ANP

NRF-1 - fator de respiratório nuclear 1

PAGE – Gel de Poliacrilamida

PCR – reação em cadeia da polimerase

PGC1- α - co-ativador do PPAR γ 1- Alfa

PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bifostato 3 Quinase

PI3K α – Fosfoinositol 3 Cinase Alfa

PPAR- α – Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma

p110- α – Subunidade catalítica da PI3K

RAS – Sistema Renina Angiotensina

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-qPCR – PCR em tempo real

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SED – Animal Sedentário

Src - Proteínas Tirosina Cinases

Tfam A - Fator de Transcrição Mitocondrial A

T2 – Animal treinado duas vezes ao dia

T3 – Animal treinado três vezes ao dia com sobrecarga de 2% do peso corporal

UEA – Unidade de Experimentação Animal

α -actina – Alfa Actina Esquelética

β -arrestina – Beta Arrestina

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado está organizada em três partes principais, descritas abaixo:

- **Parte I:** Introdução, justificativa, hipótese e objetivos
- **Parte II:** Resultados apresentados na forma de um artigo científico, em substituição às seções de Material e Métodos e Resultados;
- **Parte III:** Discussão, Conclusões e Perspectivas.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertrofia Cardíaca

A Hipertrofia Cardíaca se caracteriza pelo incremento da massa do coração devido a estímulos mecânicos, como a sobrecarga de pressão e volume, impostos ao órgão ^[1, 3, 4] em consequência a um aumento na demanda de oxigênio e nutrientes pelos tecidos periféricos. No intuito de melhorar a função cardíaca, uma série de adaptações ocorrem no coração, em um processo denominado como remodelamento cardíaco ^[5], que se caracteriza por alterações estruturais, funcionais, metabólicas, bioquímicas e moleculares ^[6].

A hipertrofia cardíaca está associada a diversas doenças cardiovasculares agravando distúrbios de ritmo, aumento de tecido fibrótico, déficit de relaxamento, redução da fração de encurtamento e, como consequência o estabelecimento da insuficiência cardíaca ^[7], que é a principal causa de morte devido a complicações cardiovasculares. Atualmente, a insuficiência cardíaca acomete em torno de 38 milhões de pessoas em todo o mundo ^[8-10]. Portanto, entender os mecanismos que levam a progressão desta patologia é de primordial importância para a saúde pública.

O tipo e o grau de transformações que ocorrerão durante o remodelamento cardíaco irá variar em função do tipo de estímulo ao qual o coração é submetido. Por exemplo, quando ocorre sobrecarga de pressão, as paredes das câmaras cardíacas aumentam em espessura ^[11], devido à adição de sarcômeros em paralelo ^[6], o que caracteriza uma hipertrofia concêntrica ^[12]. Já quando o estímulo é por sobrecarga de volume, as câmaras cardíacas tendem a dilatar e o remodelamento ocorre por adição de sarcômeros em série ^[6, 7]. Quando essas mudanças promovem perda de função cardíaca, esta é denominada hipertrofia cardíaca patológica ^[1, 7] (Figura 1). No entanto, uma questão que ainda está em debate sobre a biologia cardíaca é como funcionam as diferentes vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica ^[13].

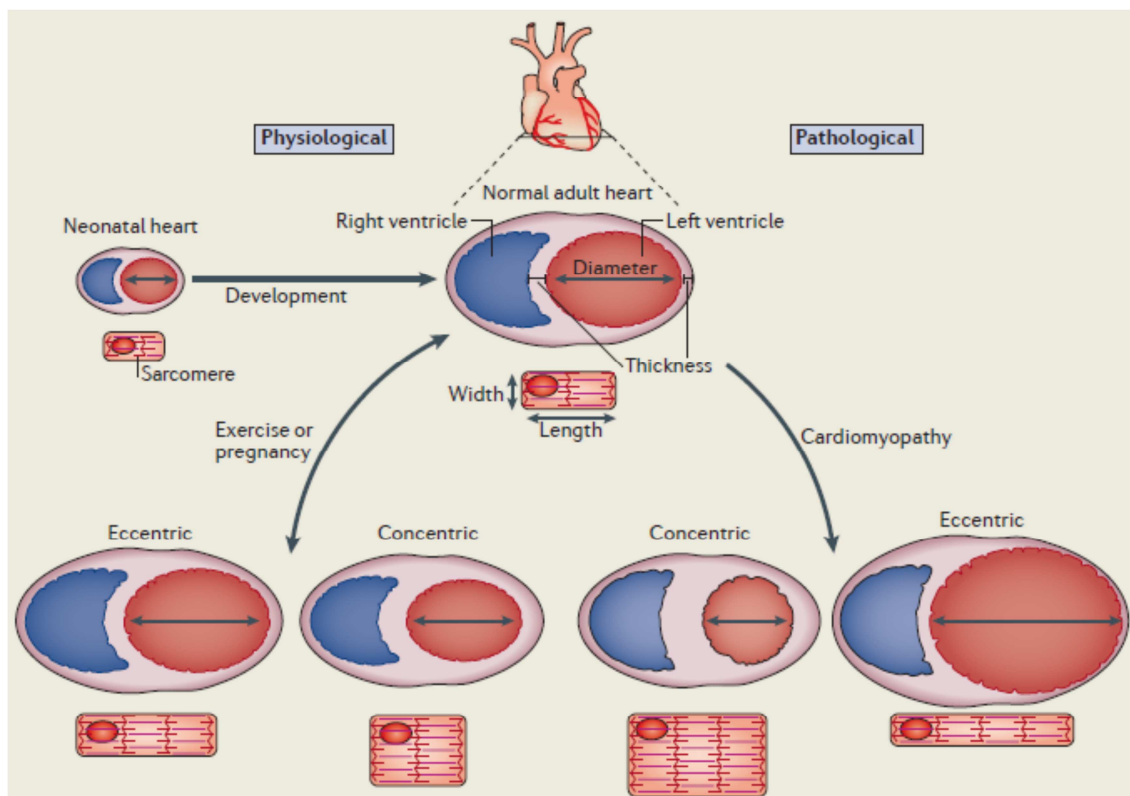


Figura 1 – Representação esquemática da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica ^[1].

1.1.1. Hipertrofia Cardíaca Fisiológica

A hipertrofia cardíaca fisiológica pode ser causada por diferentes estímulos como a gestação, crescimento e o exercício físico ^[14].

Os benefícios do exercício físico ao sistema cardiovascular são conhecidos e constantemente debatidos em mídias de massa e por mídias especializadas. Diversos estudos científicos têm focado na utilização de animais - principalmente modelos murinos – para o desenvolvimento de uma hipertrofia cardíaca fisiológica. A utilização de modelos murinos é vantajosa, devido à rápida reprodução e maturação dos animais, além de apresentarem uma estrutura cardíaca e um padrão de crescimento cardíaco similares ao coração humano ^[15, 16].

As principais modalidades de exercícios utilizadas em estudos de hipertrofia cardíaca fisiológica em animais são: (I) exercício forçado em esteira ^[17-24], (II) exercício em natação forçado ^[25-27] e (III) exercício voluntário ^[28-30],

que podem ainda ter variações no tempo das sessões de treinamento (volume de treinamento) e/ou incremento de carga (intensidade de treinamento).

Didaticamente, os tipos de exercícios podem ser classificados em termos mecânicos (dinâmicos e estáticos) e metabólicos (aeróbios e anaeróbios). O exercício dinâmico resulta em movimento muscular, por outro lado, o exercício estático resulta em nenhum movimento. A classificação metabólica refere-se principalmente à disponibilidade de oxigênio para o processo de contração e inclui os processos aeróbio (oxigênio disponível) ou anaeróbio (sem oxigênio). A maioria dos exercícios envolvem uma combinação de contrações dinâmicas e estáticas, bem como dos metabolismos aeróbio e anaeróbio [31].

Exercícios de predominância aeróbia exercem uma sobrecarga volumétrica ao sistema cardiovascular, desencadeando uma hipertrofia com característica excêntrica [32, 33]. Neste cenário, cronicamente ocorre um aumento do volume sistólico e uma redução da frequência cardíaca de repouso [34]. Em contrapartida, exercícios de predominância anaeróbia exercem uma sobrecarga de pressão ao sistema, desencadeando uma hipertrofia com característica concêntrica sem redução da cavidade interna na diástole, assim aumentando a força de contração e função [32] [33].

Metabolicamente, o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica promove a indução de genes de rotas lipogênicas - como as vias da AMPK e PPAR- α - que melhoram a taxa de oxidação dos ácidos graxos, da glicose e promovem aumento da biogênese mitocondrial [35-37]. Desta forma, o aumento de produção de energia cria um ambiente propício para a melhora da contratilidade ao melhorar a capacidade de reabsorção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático por meio da Ca^{+2} /ATPase SERCA2. Além disso, a síntese de sarcômeros para o remodelamento sarcomérico também melhorará a contratilidade cardíaca [6].

Estruturalmente, a hipertrofia cardíaca fisiológica se caracteriza pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos com remodelamento de sarcomêros e aumento da angiogênese, a matriz extracelular mantém função mecânica coordenada, com prevalência de fibras rápidas - miosina de cadeia alfa (MHC- α) - e sem formação de tecido fibrótico [5, 37]. Evidências sugerem que este processo é controlado pela ativação da fosfoinositol 3-fosfato cinase (PI3K) [13], [38] [39] [37].

A ação da PI3K parece ser crucial na diferenciação da hipertrofia fisiológica da patológica, como demonstrado por Shioi e cols., no qual um modelo transgênico que expressa a isoforma p110- α da enzima PI3K com atividade enzimática mais alta teve aumento de 20% no índice de hipertrofia cardíaca (HW/BW), sem fibrose ou desarranjo do miocárdio e com função cardíaca preservada^[40]. Por outro lado, modelos transgênicos negativos da mesma enzima desenvolvem hipertrofia patológica quando submetidos à constrição aórtica, mas não desenvolvem hipertrofia quando submetidos a protocolos de exercício de natação^[13].

1.1.2. Hipertrofia Cardíaca Patológica

A hipertrofia cardíaca patológica ocorre por uma sobrecarga persistente de pressão ou volume que podem ser desencadeada por diversas patologias cardiovasculares, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS), as doenças valvulares, o infarto agudo do miocárdio (IAM) ou anormalidades que levam às cardiomiopatias^[6, 41].

Durante o início do remodelamento hipertrófico, a função cardíaca se mantém normal, uma etapa descrita como fase adaptativa. Posteriormente, há uma transição da fase adaptativa para a fase mal adaptativa, acarretando prejuízos à função cardíaca^[7].

Estruturalmente, a hipertrofia cardíaca patológica se desenvolve com perda de cardiomiócitos^[42], que disparam mecanismos pró-inflamatórios e pró-fibróticos devido a maior infiltração de fibroblastos, macrófagos e linfócitos e, conseqüentemente ocorre aumento de tecido fibrótico^{[43],[44]}. O excesso de fibrose irá reduzir a complacência do músculo cardíaco com a perda do relaxamento e força de contração, prejuízo na condução elétrica e redução da densidade capilar^{[45][6]}.

Além das alterações estruturais e funcionais são observadas mudanças no perfil metabólico, bioquímico e molecular. O consumo e produção de energia sofrem alterações no perfil patológico. Por exemplo, um coração sadio de 60-90% de sua fonte de energética é derivada de ácidos graxos e 10-40% da glicose e lactato^[44, 46]. No cenário patológico ocorre uma redução da

utilização da via metabólica dos ácidos graxos ^[47] e predominância da via glicolítica ^[48-50]. Essa mudança metabólica pode ser associada a uma disfunção mitocondrial, principalmente pela diminuição da expressão de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, como o co-ativador do PPAR γ 1- α (PGC1- α), o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam A) e o fator de respiratório nuclear 1 (NRF-1). Outra hipótese associada à mudança metabólica é a reativação de genes fetais, já que o metabolismo dos cardiomiócitos utilizam preferencialmente as rotas glicolíticas, ocorreria diminuição na expressão de proteínas envolvidas na oxidação dos ácidos graxos e aumento de expressão daquelas envolvidas na via glicolítica ^[44, 49, 51-53].

A hipótese de mudança metabólica estar associada à reativação de genes fetais é mais factível, pois observa-se também um aumento na expressão de miosina de cadeia pesada- β (MHC- β), a qual está associada à redução de contratilidade miocárdica e a redução da miosina de cadeia pesada- α (MHC- α) responsáveis por uma maior eficiência contrátil. Uma redução na razão MHC- α / MHC- β é associada com a hipertrofia cardíaca^[3, 6]. Além disso, outros importantes marcadores da reprogramação de genes fetais que estão com a expressão aumentada são a α -actina esquelética (altamente expressa no período fetal) que está associada com a disfunção cardíaca, o peptídeo natriurético atrial e cerebral (ANP e BNP) - que são hormônios secretados com o aumento do estresse cardíaco ^[44, 54].

Apesar do exercício físico estar associado à hipertrofia cardíaca fisiológica, existe um debate sobre os possíveis efeitos deletérios do exercício de longa duração, que poderiam aumentar o risco de fibrilação atrial e desenvolvimento de hipertrofia cardíaca com fibrose miocárdica e progressão para cardiomiopatias ^[55]. Benito et al., demonstrou que ratos submetidos ao treinamento em esteira durante 16 semanas desenvolveram hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo, disfunção diastólica e fibrose no átrio e ventrículo direito., também, taquicardia ventricular durante o teste eletrofisiológico em 42% dos animais treinados^[56].

1.2. Sistema Renina Angiotensina e a hipertrofia cardíaca

Compreender os mecanismos moleculares que permitem o crescimento do coração em resposta a um determinado estímulo, mantendo sua função fisiológica, é de grande interesse clínico/científico, pois pode apontar potenciais alvos terapêuticos para inibir a hipertrofia patológica ^[13].

Neste contexto, o estudo do sistema renina-angiotensina (RAS) é de grande interesse. O RAS é um sistema peptidérgico que pode ser, didaticamente, dividido em dois braços principais: a via clássica – composta pelo peptídeo da angiotensina II (ANGII) e o receptor AT1 – e a via alternativa – composta pela angiotensina 1-7 (ANG1-7) e o receptor MAS ^[2] (Figura 2).

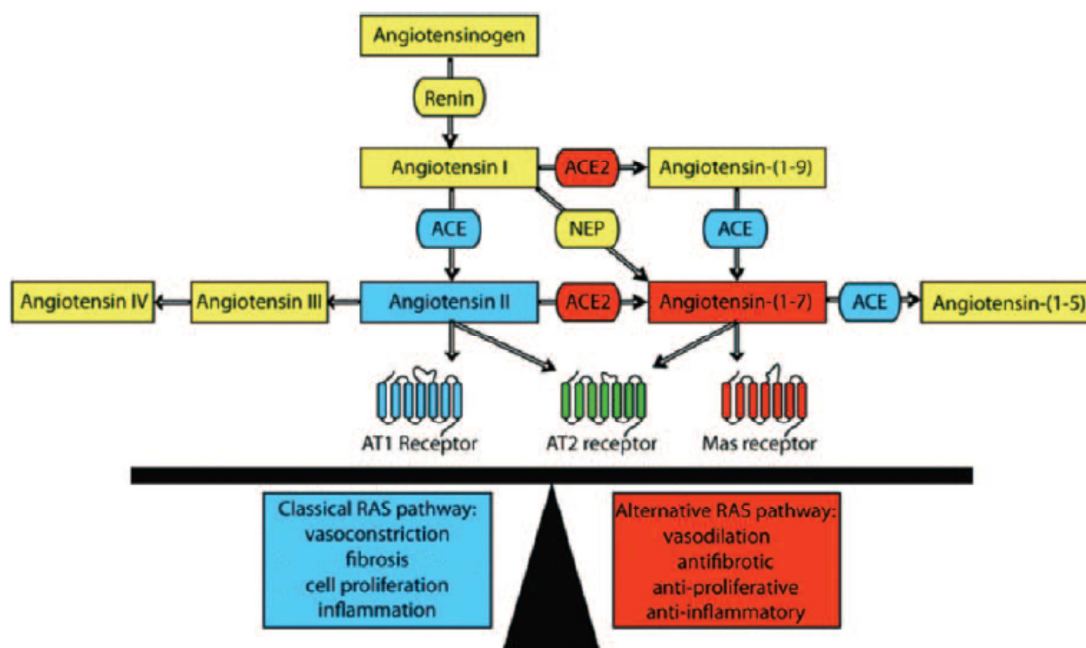


Figura 2: Representação esquemática do SRA ^[2].

A ativação da via clássica do SRA ocorre pela hidrólise do angiotensinogênio pela enzima renina formando um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG-I). Posteriormente, a ANG-I é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECAI), formando o octapeptídeo ativo ANG-II, que ao se ligar no receptor AT1 desencadeará uma série de efeitos incluindo elevação da pressão arterial, estimulação da síntese e liberação de

aldosterona, indução da sede e apetite por sal ^[57] vasoconstrição, fibrose, proliferação celular e inflamação ^[2].

Já a via alternativa pode ser ativada por três mecanismos: (I) pela ação enzimática da neprilisina sobre a ANGI removendo três aminoácidos; (II) por meio da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que irá clivar a ANGI em Angiotensina 1-9 (ANG1-9) e posteriormente a ECA cliva a ANG1-9, formando a ANG1-7; e (III) pela ação da ECA2 sobre a ANGII formando a ANG1-7. O heptapeptídeo ANG1-7, se ligará ao MAS estimulando uma série de efeitos englobando vasodilatação, ação antifibrótica, antiproliferativa e anti-inflamatória ^[2].

Logo de sua descoberta, conhecia-se apenas a função sistêmica do RAS no controle do equilíbrio hídrico. Contudo, esta percepção foi desafiada por diversos estudos que mostraram que diferentes tecidos eram capazes de sintetizar os principais componentes do RAS ^[58, 59], incluindo coração ^[58, 60, 61], rim ^[62], vasculatura ^[62], pâncreas ^[59, 63], retina ^[64, 65], cérebro ^[59, 66] e outros ^[67]. Esta ação local tem encorajado a comunidade científica a investigar profundamente o RAS em tecidos específicos.

Uma atenção especial tem sido dada à participação do RAS no tecido cardíaco, isso por que a concentração de ANGI e ANGII no coração é maior do que aquela observada no plasma ^[59, 68, 69]. Deste então, diversos estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos do RAS sobre o tecido cardíaco.

No início da década de 1990 foi demonstrado que em cultura de células, o tratamento com ANG-II promovia crescimento dos cardiomiócitos e proliferação de fibroblastos ^[70]. Estes dados indicaram que a ANG-II teria importante participação no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica e que esta ação era mediada pelo receptor da angiotensina II (AT1) causando uma indução imediata dos genes (c-fos, c-jun, jun B, Egr-1, and c-myc) e expressão de genes fetais ANP e α -actina esquelética (α -actina) ^[70].

O AT1 é um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembrana. No entanto, sua ativação pode ocorrer por dois mecanismos principais: (I) em resposta à ligação da ANGII ou (II) em resposta a um estresse mecânico, que parece provocar uma cascata por vias ativadas pela β -arrestina (independente de proteína G), principalmente por meio de proteínas tirosina cinases (Src) e PI3K α . Uma rota fortemente associada à hipertrofia fisiológica,

enquanto que a sinalização promovida pela ligação da ANGII parece ativar a PI3Ky que está associada à hipertrofia patológica [71-76].

Posteriormente, diversos estudos comprovaram os achados de Sadoshima (1993) e demonstraram que a ANGII e o AT1 participam no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica com aumento de fibrose [77], [78-82] e disfunção diastólica [77].

Recentemente foi descoberto que a via alternativa do RAS tem efeitos cardioprotetores que contrabalançam os efeitos da via clássica (ANG-II/AT1), como por exemplo: atenuam a hipertrofia cardíaca patológica [83-88], o estresse oxidativo [89], a proliferação celular [83] e a apoptose [90]. Por outro lado, animais que sofreram deleção do receptor da angiotensina 1-7 (MAS) tiveram maior disfunção cardíaca e aumento de colágeno do tipo I e III e fibronectina [91].

O MAS também é um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembrana. No entanto, seu principal papel parece ser no controle da resposta induzida pelo AT1. Este mecanismo está associado a uma interação receptor-receptor, que inibe a ação da ANGII sobre o AT1 [92].

O sistema renina-angiotensina (RAS) é o principal mecanismo vasoconstritor fisiológico, o eixo clássico é caracterizado pela interação da angiotensina II com receptor AT1 e tem papel fundamental na hipertrofia cardíaca patológica. Antagonicamente, o eixo alternativo, classificado pela ação da angiotensina 1-7 sobre o receptor MAS, gera vasodilatação, ação antifibrótica, antiproliferativa e anti-inflamatória. Este mecanismo parece ter importante papel no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica.

2. JUSTIFICATIVA:

Compreender os mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca e em especial na diferenciação dos processos que levam ao fenótipo fisiológico ou patológico é passo essencial para que se desenvolvam estratégias protetoras e/ou terapêuticas que visem evitar o desenvolvimento e a progressão da hipertrofia patológica e da insuficiência cardíaca.

A sobrecarga hemodinâmica transitória imposta pelo exercício ao sistema cardiovascular tem importante participação no equilíbrio entre as vias, diminuindo o efeito do eixo clássico, que é ativado através de sobrecarga hemodinâmica persistente, sendo associada ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca fisiológica. Sugerimos que altos volumes de treinamento submeterão o sistema cardiovascular a uma sobrecarga hemodinâmica mais prolongada e, portanto, poderá causar maior ação do eixo clássico do sistema renina-angiotensina, o que poderia resultar em modificação do fenótipo da hipertrofia cardíaca fisiológica para patológica.

3. HIPÓTESE

A hipertrofia cardíaca fisiológica resultante de um programa de natação de intensidade e volume moderados sofrerá uma mudança para fenótipo patológico com aumento de volumes e intensidade, caracterizado por alterações dos níveis de ANGII, ANG 1-7, AT1 e MAS e ativação de genes fetais.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo Principal

Avaliar o eixo clássico (ANGII/AT1) e alternativo (ANG1-7/MAS) do sistema renina-angiotensina em músculo cardíaco de camundongos submetidos ao exercício em diferentes volumes e cargas de treinamento durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

4.2. Objetivos específicos

- Quantificar a hipertrofia cardíaca por meio do índice de hipertrofia cardíaca (peso do ventrículo esquerdo/comprimento da tíbia);
 - Avaliar fibrose por meio da técnica de tricrômio de masson;
 - Quantificar os peptídeos ANGI, ANGII, ANG1-7 em tecido cardíaco por HPLC;
 - Avaliar a expressão proteica dos receptores AT1 e MAS por Western Blotting;
 - Avaliar a expressão dos Genes Fetais α -MHC, β -MHC e ANP por PCR em tempo real.

5. Referências parte I:

1. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 38-48.
2. Farag, E., et al., *An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis*. Anesth Analg, 2015. **120**(2): p. 275-92.
3. Gupta, S., B. Das, and S. Sen, *Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(6): p. 623-52.
4. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
5. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 962-70.
6. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
7. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
8. Braunwald, E., *The war against heart failure: the Lancet lecture*. Lancet, 2015. **385**(9970): p. 812-24.
9. Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
10. Carbone, S., C.J. Lavie, and R. Arena, *Obesity and Heart Failure: Focus on the Obesity Paradox*. Mayo Clin Proc, 2017. **92**(2): p. 266-279.
11. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
12. Ganau, A., et al., *Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension*. J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(7): p. 1550-8.

13. McMullen, J.R., et al., *Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12355-60.
14. Weeks, K.L. and J.R. McMullen, *The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?* Physiology (Bethesda), 2011. **26**(2): p. 97-105.
15. Hasenfuss, G., *Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 60-76.
16. Wang, Y., U. Wisloff, and O.J. Kemi, *Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy*. Physiol Res, 2010. **59**(5): p. 633-44.
17. Diffie, G.M. and D.F. Nagle, *Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(1): p. 35-42.
18. Moore, R.L., et al., *Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 1): p. C1180-9.
19. Fenning, A., et al., *Cardiac adaptation to endurance exercise in rats*. Mol Cell Biochem, 2003. **251**(1-2): p. 51-9.
20. Wisloff, U., et al., *Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats*. Cardiovasc Res, 2001. **50**(3): p. 495-508.
21. Kemi, O.J., et al., *Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(4): p. 1301-9.
22. White, F.C., et al., *Adaptation of the left ventricle to exercise-induced hypertrophy*. J Appl Physiol (1985), 1987. **62**(3): p. 1097-110.
23. Laughlin, M.H., et al., *Biochemical characterization of exercise-trained porcine myocardium*. J Appl Physiol (1985), 1991. **71**(1): p. 229-35.
24. Carroll, J.F. and C.K. Kyser, *Exercise training in obesity lowers blood pressure independent of weight change*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(4): p. 596-601.

25. Iemitsu, M., et al., *Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism*. *Hypertens Res*, 2003. **26**(10): p. 829-37.
26. Medeiros, A., et al., *Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats*. *Braz J Med Biol Res*, 2004. **37**(12): p. 1909-17.
27. Evangelista, F.S., P.C. Brum, and J.E. Krieger, *Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice*. *Braz J Med Biol Res*, 2003. **36**(12): p. 1751-9.
28. Natali, A.J., et al., *Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes*. *J Exp Biol*, 2001. **204**(Pt 6): p. 1191-9.
29. Lerman, I., et al., *Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains*. *J Appl Physiol* (1985), 2002. **92**(6): p. 2245-55.
30. Allen, D.L., et al., *Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse*. *J Appl Physiol* (1985), 2001. **90**(5): p. 1900-8.
31. Fletcher, G.F., et al., *Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2013. **128**(8): p. 873-934.
32. Fernandes, T., U.P. Soci, and E.M. Oliveira, *Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants*. *Braz J Med Biol Res*, 2011. **44**(9): p. 836-47.
33. Johnson, E.J., B.P. Dieter, and S.A. Marsh, *Evidence for distinct effects of exercise in different cardiac hypertrophic disorders*. *Life Sci*, 2015. **123**: p. 100-6.
34. Rondon, M.U.P.B., et al., *Fisiologia integrativa no exercício físico*, in *Cardiologia do exercício - Do atleta ao cardiopata*, C.E. Negrão and A.C.P. Barreto, Editors. 2010, Manole: São Paulo, Brasil. p. 38-72.
35. O'Neill, B.T., et al., *A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy*. *Cell Metab*, 2007. **6**(4): p. 294-306.

36. Dobrzyn, P., et al., *Expression of lipogenic genes is upregulated in the heart with exercise training-induced but not pressure overload-induced left ventricular hypertrophy*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(12): p. E1348-58.
37. Bernardo, B.C. and J.R. McMullen, *Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling*. Cardiol Clin, 2016. **34**(4): p. 515-530.
38. McMullen, J.R. and G.L. Jennings, *Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(4): p. 255-62.
39. Pretorius, L., et al., *Reduced phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) activation increases the susceptibility to atrial fibrillation*. Am J Pathol, 2009. **175**(3): p. 998-1009.
40. Shioi, T., et al., *The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2537-48.
41. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. **128**(4): p. 388-400.
42. Cohn, J.N., et al., *Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research*. Circulation, 1997. **95**(4): p. 766-70.
43. Weber, K.T., C.G. Brilla, and J.S. Janicki, *Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(3): p. 341-8.
44. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets*. Arch Toxicol, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
45. Pinto, G.H., *Sinalização autofágica e níveis de miostatina em modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos*, in *PPG em Ciências da Saúde, Cardiologia e Ciências Cardiovasculares*. 2014, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre/RS. p. 73.
46. Stanley, W.C. and M.P. Chandler, *Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 115-30.

47. Heather, L.C., et al., *Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart*. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(3): p. 430-7.
48. Neely, J.R. and H.E. Morgan, *Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle*. *Annu Rev Physiol*, 1974. **36**: p. 413-59.
49. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(1): p. 207-58.
50. van Bilsen, M., F.A. van Nieuwenhoven, and G.J. van der Vusse, *Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental?* *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(3): p. 420-8.
51. Allard, M.F., et al., *Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(2 Pt 2): p. H742-50.
52. el Alaoui-Talibi, Z., et al., *Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat hearts*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(4 Pt 2): p. H1068-74.
53. Morissette, M.R., et al., *Upregulation of GLUT1 expression is necessary for hypertrophy and survival of neonatal rat cardiomyocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(10): p. 1217-27.
54. Cox, E.J. and S.A. Marsh, *A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92903.
55. Eijsvogels, T.M., A.B. Fernandez, and P.D. Thompson, *Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise?* *Physiol Rev*, 2016. **96**(1): p. 99-125.
56. Benito, B., et al., *Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training*. *Circulation*, 2011. **123**(1): p. 13-22.
57. Soci, U.P., et al., *MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats*. *Physiol Genomics*, 2011. **43**(11): p. 665-73.
58. Dzau, V.J. and R. Re, *Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift?* *Circulation*, 1994. **89**(1): p. 493-8.

59. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
60. Danser, A.H. and M.A. Schalekamp, *Is there an internal cardiac renin-angiotensin system?* *Heart*, 1996. **76**(3 Suppl 3): p. 28-32.
61. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
62. Paul, M., J. Wagner, and V.J. Dzau, *Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2058-64.
63. Tahmasebi, M., et al., *The tissue renin-angiotensin system in human pancreas*. *J Endocrinol*, 1999. **161**(2): p. 317-22.
64. Wagner, J., et al., *Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system*. *Br J Ophthalmol*, 1996. **80**(2): p. 159-63.
65. Tikellis, C., et al., *Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina*. *Curr Eye Res*, 2004. **29**(6): p. 419-27.
66. Baltatu, O., et al., *The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy*. *Hypertension*, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 409-12.
67. Patel, V.B., et al., *Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure*. *Circ Res*, 2016. **118**(8): p. 1313-26.
68. Lindpaintner, K., et al., *Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role*. *Circulation*, 1988. **77**(6 Pt 2): p. 118-23.
69. Danser, A.H., et al., *Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis*. *Hypertension*, 1994. **24**(1): p. 37-48.
70. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. *Circ Res*, 1993. **73**(3): p. 413-23.
71. Guimaraes, G.G., et al., *Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice*. *Peptides*, 2012. **38**(1): p. 54-61.

72. Higuchi, S., et al., *Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology*. Clin Sci (Lond), 2007. **112**(8): p. 417-28.
73. Zhai, P., et al., *Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3045-56.
74. Wang, S., et al., *Src is required for mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy through angiotensin II type 1 receptor-dependent beta-arrestin2 pathways*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e92926.
75. Rakesh, K., et al., *beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress*. Sci Signal, 2010. **3**(125): p. ra46.
76. Wu, J., et al., *Insights into the activation and inhibition of angiotensin II type 1 receptor in the mechanically loaded heart*. Circ J, 2014. **78**(6): p. 1283-9.
77. Billet, S., et al., *Gain-of-function mutant of angiotensin II receptor, type 1A, causes hypertension and cardiovascular fibrosis in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1914-25.
78. van de Wal, R.M., et al., *Addition of an angiotensin receptor blocker to full-dose ACE-inhibition: controversial or common sense?* Eur Heart J, 2005. **26**(22): p. 2361-7.
79. Dostal, D.E., et al., *Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C838-50.
80. Campbell, S.E. and L.C. Katwa, *Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(7): p. 1947-58.
81. Lee, A.A., et al., *Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(10): p. 2347-57.
82. Khan, R. and R. Sheppard, *Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia*. Immunology, 2006. **118**(1): p. 10-24.
83. McCollum, L.T., P.E. Gallagher, and E. Ann Tallant, *Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling associated with*

- upregulation of dual-specificity phosphatase 1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H801-10.
84. Patel, V.B., et al., *Cardioprotective effects mediated by angiotensin II type 1 receptor blockade and enhancing angiotensin 1-7 in experimental heart failure in angiotensin-converting enzyme 2-null mice*. Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1195-203.
 85. Mercure, C., et al., *Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart*. Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1319-26.
 86. Tallant, E.A., C.M. Ferrario, and P.E. Gallagher, *Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(4): p. H1560-6.
 87. Flores-Munoz, M., et al., *Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45564.
 88. Papinska, A.M., et al., *Angiotensin-(1-7) administration benefits cardiac, renal and progenitor cell function in db/db mice*. Br J Pharmacol, 2015.
 89. Liao, X.X., et al., *[Effects of angiotensin-(1-7) on oxidative stress and functional changes of isolated rat hearts induced by ischemia-reperfusion]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008. **28**(8): p. 1345-8.
 90. Liu, H.Z., et al., *[Angiotensin(1-7) attenuates left ventricular dysfunction and myocardial apoptosis on rat model of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy]*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2012. **40**(3): p. 219-24.
 91. Santos, R.A., et al., *Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice*. Hypertension, 2006. **47**(5): p. 996-1002.
 92. Kostenis, E., et al., *G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor*. Circulation, 2005. **111**(14): p. 1806-13.

PARTE II

6. Artigo Original

**Cardiac hypertrophy in mice submitted to a swimming protocol:
Does higher training volume and intensity influence myocardial or renin
angiotensin system responses?**

Brief Title: Physiological Cardiac Hypertrophy in Mice and the Renin-
Angiotensin System

Douglas dos Santos Soares ^{a,b}, Graziela Hünning Pinto ^{a,b}, Amanda Lopes ^a,
Daniel Sturza Lucas Caetano ^a, Michael E. Andrades ^{a,b}, Nadine Clausell ^{a,b},
Luis E. Paim Rohde ^{a,b}, Santiago Alonso Tobar Leitão ^{a,b}, Andreia Biolo ^{a,b}.

^a Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory and the Heart Failure
and Cardiac Transplant Unit from the Cardiology Division, Hospital de Clínicas
de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil,

^b Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Federal
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Word count: 5217

Address for correspondence:

Andréia Biolo MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598844

E-mail address: biolo.andreia@gmail.com

ABSTRACT

Exercise promotes physiological cardiac hypertrophy and induces the activation of the renin angiotensin system (RAS), which plays an important role in cardiac physiology, both through the classical axis – represented by the angiotensin II receptor type 1 (AT1) activated by angiotensin II (ANG II) – and the alternative axis – which is activated by the angiotensin 1-7 interaction with the MAS receptor. However, very intense exercise protocols could have deleterious effects on the cardiovascular system. In this context, we aimed to analyze the cardiac hypertrophy phenotype, as well as the classical (ANGII/AT1) and alternative (ANG1-7/MAS) RAS axes, in the myocardium of mice submitted to varying volume and intensity swimming exercises for the development of cardiac hypertrophy. To this end, male balb/c mice were divided into three groups: (I) sedentary (SED), (II) swimming twice a day (T2) without overload, and (III) swimming three times a day with a 2% body weight overload (T3), totaling six weeks of training. Both training groups developed cardiac hypertrophy. Interestingly, we observed an increase in MAS receptor levels only in group T2, while AT1 levels increased only in group T3. However, no change was observed regarding the levels of angiotensin peptides ANG-I, ANG-II, and ANG1-7, in either group. In addition, group T3 displayed a higher expression of myosin heavy chain- β (MHC- β) and lower expression levels of the alpha isoform (MHC- α). Fibrosis was not observed in any of the groups. In conclusion, our results suggest that both exercise protocols promoted a similar cardiac hypertrophy phenotype, but the protocol applying increased volume and intensity resulted in differential activation of RAS receptors and fetal gene reactivation. Studies applying longer duration protocols could elucidate if these changes represent early activation of mechanisms related to hypertrophy development with phenotypic pathological characteristics.

KEYWORDS: renin angiotensin system, cardiac hypertrophy, exercise.

6.1.INTRODUCTION

Cardiac hypertrophy is an adaptive process in response to hemodynamic overloads in the heart ^[1, 2] and is characterized by a number of biochemical, metabolic, molecular, functional, and structural changes ^[3, 4]. Adaptive or physiological cardiac hypertrophy may occur transiently, due to gestation or exercise, promoting heart mass increases, either preserving or improving cardiac function. On the other hand, pathological stimuli inflict long-term hemodynamic overloads, leading to permanent cardiac remodeling, which is associated to rhythm disturbances, fibrotic tissue deposition, diastolic dysfunction, reduction of the fractional shortening and progression to heart failure (HF) ^[5], the leading cause of cardiovascular mortality ^[6-8].

The renin-angiotensin system (RAS) is a peptidergic system that plays an important role in cardiovascular homeostasis ^[9,10] and is divided into two main axis: the classical pathway, controlled by the angiotensin II peptide (ANGII) and AT1 receptor (AT1), and the alternative axis, controlled by the angiotensin 1-7 peptide (ANG1-7) and MAS receptor (MAS) ^[10]. Angiotensin-II binding to the AT1 receptor triggers a range of effects, including high blood pressure, aldosterone synthesis stimulation ^[11], vasoconstriction, fibrosis, cell proliferation, oxidative stress and inflammation ^[10]. In contrast, the activation of the MAS receptor by ANG1-7 binding counteracts the effects of the ANGI/AT1 axis by inducing vasodilation, as well as antifibrotic, antiproliferative and anti-inflammatory effects ^[10].

Transient hemodynamic overload on the cardiovascular system due to exercise has a marked influence on the RAS activation, reducing the classical pathway (ANGII/AT1) and enhancing the alternative axis (ANG1-7/MASR) ^[10]. These changes are opposed to those observed in conditions associated to pathological cardiac hypertrophy ^[10]. However, it has been discussed whether very intense exercise could lead to deleterious effects to the cardiovascular system ^[12]. If so, a protocol comprising increased volume and intensity training could trigger changes in molecular mechanisms, promoting the activation of pathological processes, and could even result in pathological findings within the hypertrophied myocardium. In this context, we aimed to compare two swimming training protocols (one regular protocol and one applying increased volume and

intensity) to evaluate the implications of increased volume and intensity training on the cardiac hypertrophy phenotype and associated mechanisms, focusing on the classical and alternative RAS axes.

6.2. MATERIAL AND METHODS

6.2.1. Animals and experimental protocol

Thirty-three 8-week-old male balb/c mice were randomized into three experimental swimming training groups, using the WinPepi software (Version 11.48): sedentary (SED) (n = 7), that trained for 5 minutes, twice a week for seven weeks; trained 2x (T2) (n = 13) in 90-minute sessions, twice a day for seven weeks; and trained 3x (T3) (n = 13) in 90-minute sessions, three times a day, with a 2% total body weight load, for seven weeks. The first training week was used for exercise adaptation (Supplementary Fig. 1).

All animals were kept in specific mice cages (3-4 animals/cage) with standard balanced rodent chow and water *ad libitum*, in the Animal Experimentation Unit (UEA) at the Experimental Research Center of the Porto Alegre Hospital de Clínicas, under a 12-hour photoperiod (07:00/19:00h), controlled temperature of 22 ± 2 °C and 40-60% relative air humidity.

The protocol was carried out in accordance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals^[13] and the ARRIVE guideline^[14] and was approved by the Ethics Committee on Animal Use from the Porto Alegre Hospital de Clínicas (CEUA/HCPA) and registered under number 15-0303.

6.2.2. Exercise adaptation - Aerobic Capacity Assessment

Aerobic capacity was assessed by increases in lactate levels after the swimming exercise test with a constant load of 8% body weight for 10 minutes. The exercise test was performed at the beginning and at the end of the 7-week training protocol, in order to evaluate animal adaptation to the exercise.

Briefly, blood (10 μ L) was collected from a tail incision with a cannula previously rinsed with 1% sodium fluoride and subsequently diluted 1:2 in 1% sodium fluoride. Lactate concentrations were measured by adding 25 μ L of the sample to a YSI 1500 SPORT lactate enzyme analyzer. The value determined by the equipment was corrected by the dilution factor (3x) and expressed as mmol of lactate/L of blood.

Two blood collections were performed: (I) before the exercise test and (II) after the exercise test.

6.2.3. Euthanasia and tissue collection

The animals were euthanized by deep anesthesia (12% isoflurane), 24 hours after the last exercise session. Immediately after euthanasia, the heart was removed and weighed, and the atria and ventricles were excised and weighed separately. Subsequently, the left ventricle (LV) was sectioned into three portions: the first, frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -80 °C; the second, incubated in RNA later solution for 24 h and then stored at -80 °C; and the third, immersed in 10 % buffered formalin for 24 h and then fixed in paraffin. The right hind paws of the animals were also collected and stored in a buffered formalin solution (10%) for X-ray analyses to assess tibia size, determined using the Image J 1.45s software, in order to calculate cardiac hypertrophy index (LV weight/tibial length).

6.2.4. Cardiomyocyte Fibrosis

Left Ventricle fibrosis was assessed by Masson's trichrome method ^[15, 16] with adaptations, as follows: briefly, left ventricle sections were deparaffinized with xylol, ethanol and water. The cellular nuclei were then stained after incubation for 1 h in a Boiun solution (Picric acid, formalin, and acetic acid at a 75:25:5 ratio, respectively) followed by incubation with 1 % hematoxylin in 95 % ethanol. The background was reduced by water washing. The cytoplasm was then stained with Briebrich fucsin (Briebrich scarlate 1%; acidic fucsin and acetic acid, at a 90:10:1 ratio, respectively) and, finally, the

interstitial collagen was stained after incubation with 2.5% phosphomolybdic acid and 2.5% phosphotungstic acid, followed by incubation with 2.5% aniline blue in 2% acetic acid. The slides were then washed in distilled water, dried and mounted accordingly.

Each slide had four random microscopic fields photographed using a light microscopy (200 x magnification) assisted by the Q Capture v.2.81.0 software, (Q Imaging Co., CA). Fibrosis was quantified using the color deconvolution plug-in of the Image J 1.45s software (n=7-13 per group). Fibrosis intensity was calculated according to the formula: $f=255-I$, where f is final blue intensity and I is the mean blue intensity, varying from 0 (dark blue, highest expression) to 255 (white, no expression). All histological analyses were performed by two blinded and independent investigators.

6.2.5. Angiotensin Quantification

Left ventricle samples were weighed and homogenized (1:9) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, containing 1% triton X-100, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate and SigmaFast protease inhibitor cocktail (1 tablet/100 mL – Sigma Aldrich) and then centrifuged (10,000xg, 4 °C, 20 min). The collected supernatants were then filtered through a C₁₈ classic cartridge (Waters, USA), previously activated with methanol (5 mL), tetrahydrofuran (5 mL), hexane (5 mL), methanol (5 mL), and water (10 mL). Samples were then loaded onto the columns (100-500 µL sample), washed with water and eluted with ethanol/acetic acid/water at a 90%/4%/6% ratio, respectively. The eluted fractions were dried under a nitrogen flow and resuspended in 100 µL of mobile phase A (5% acetonitrile in 0.1% orthophosphoric acid, pH 3.00) and filtered through 0.22 µm centrifuge filters (CLS8160, Sigma-Aldrich, USA) before the HPLC analyses (Shimadzu System, Japan).

Angiotensin peptides of each sample were separated on a reversed phase ODS Aquapor 300 column (250×4.6 mm), 7 µ (PerkinElmer's Browlee Columns, USA) using a gradient ranging from 5 to 37% of mobile phase B (95% acetonitrile in 0.1% phosphoric acid) at a 1.5 mL.min⁻¹ flow for 80 minutes. The angiotensins were identified by comparisons to the retention time of standard

angiotensins (Ang I – H-1680.0025; Ang II – 1705.0025; Ang 1-7 – 1715.0025 - Bachem - USA). Results were expressed as nmol/g of LV.

6.2.6. Angiotensin Receptor Analysis

Samples were homogenized as described above and immediately centrifuged (10.000xg, 4 °C, 20 min). The supernatants were collected and protein concentrations were determined by the Bradford method ^[17]. Samples were diluted in 0.1 M Tris, 6.8 pH, to achieve final protein concentrations of 4 µg/µL in Laemmli buffer (250 mM Tris, 8% SDS, 40% glycerol, 0.008% bromophenol blue, pH 6.8 and 20% β-mercaptoethanol). They were then heated at 70°C for 10 min and 50 µg of total protein were loaded on SDS-PAGE (12%) gels and run for 60 min, first at 50V, and then for 90 min at 120V. The proteins in the gel were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore Corporation, Inc., Billerica, MA) using a transfer buffer (48 mM Tris, pH 9-9.3, 39 mM glycine, 20% methanol) on a semi-dry system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) for 30 min at 260 mA. The membranes were stained with Comassie Blue and the molecular weights of the proteins were determined by comparison to standard molecular weights (1610374, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

The membranes were then blocked for 1 h (5% nonfat milk) with TTBS buffer (100 ml TBS 10x, 0.1% Tween 20, 800mL deionized water) followed by overnight incubation at 4 °C with the primary antibody diluted in TTBS buffer with 5 % non-fat milk at an AT1 (1:1000) (c-1173-G); MAS (1:1000) (sc-135063) ratio (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA). After incubation, membranes were washed 3 times with TTBS and incubated with anti-rabbit (IgG) secondary goat antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:1000) (Cod.7074s - Cell Signaling Technology). Chemiluminescent detection was performed using the Immobilon Western kit (Millipore Corporation, Inc., Billerica, MA) and the membranes were then exposed to a digital image acquisition system (L-Pix Chemi Molecular Imaging, Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil). The densitometry of the protein bands was quantified using the free software

ImageJ K 1.45. Results were expressed as arbitrary units (%A.U.) using the receptor densitometry by comassie blue densitometry ratio.

6.2.7. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from 26 mg LV applying the Trizol/Chloroform method as described by the manufacturer (Life Technologies/USA). Briefly, LV sections were homogenized in a Trizol solution (1:9), centrifuged at 12,000 x g, 4 °C for 10 min, and the supernatants were then collected and mixed with chloroform (half volume of Trizol used for each sample) and centrifuged in same conditions. The RNA-enriched supernatants were precipitated in 100% isopropanol, washed with cold ethanol 75%, then dried and resuspended in distilled water. The RNA concentrations of the samples were measured using the 260/280nm ratio (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific, USA) and mRNA integrity was assessed by ribosomal RNA analysis using an RNA ScreenTape electrophoresis assay (4200 TapeStation System, Agilent Technologies, USA).

Double-strand cDNA was synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Inc., Foster, CA), according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR runs were performed on a 7500 Real-time PCR System, using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems Inc., Foster, CA), also following the manufacturer's instructions. Gene expression was normalized by the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH); assay number 4352339E. NPPA, Myh6 and Myh7 gene expressions were also measured (Applied Biosystems Inc., Foster, CA, assay numbers (MM01255747_g1, MM00440359_m1, MM01319006_g1). The efficacy of the primers was tested in RT-qPCR reactions, and were close to 100%. Thus, the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula could be applied to calculate relative gene expression [18].

6.2.8. Statistical analyses

Data are expressed as means and standard deviation or as medians and interquartile ranges. The statistical analyses were performed using one-way and two-way ANOVA tests, followed by the Bonferroni post-hoc test. The level of significance was set at 5%.

6.3. RESULTS

6.3.1. Hypertrophy and Oxidative Capacity Assessment

6.3.1.1. Cardiac Hypertrophy - The exercise protocol induced an increase in cardiac mass index in animals from groups T2 (8.26 ± 0.53 mg/mm) and T3 (8.73 ± 0.70 mg/mm), in comparison to sedentary animals (7.45 ± 0.31 mg/mm) ($p < 0.001$), with no difference between both trained groups. As displayed in Figure 1A, this increase in cardiac mass was due to LV hypertrophy, with an LV hypertrophy index of 6.34 ± 0.44 mg/mm in group T2 and 6.74 ± 0.70 mg/mm in group T3, in comparison to sedentary animals (5.55 ± 0.50 mg/mm) ($p < 0.001$), while no difference was observed in right ventricle weight among the groups ($p = 0.84$). Again, no difference was observed in LV hypertrophy between both trained groups, although the relative values (%) showed a greater LV mass increase in group T3 (17.6%) when compared to group T2 (12.5%).

6.3.1.2. Cardiac Fibrosis – No increase in cardiac fibrosis among the groups was observed, with values of 154.30 ± 6.24 A.U for the sedentary group, 160.00 ± 13.54 A.U for T2 and 157.10 ± 11.08 A.U for T3 ($p = 0.56$) (Figure 1B).

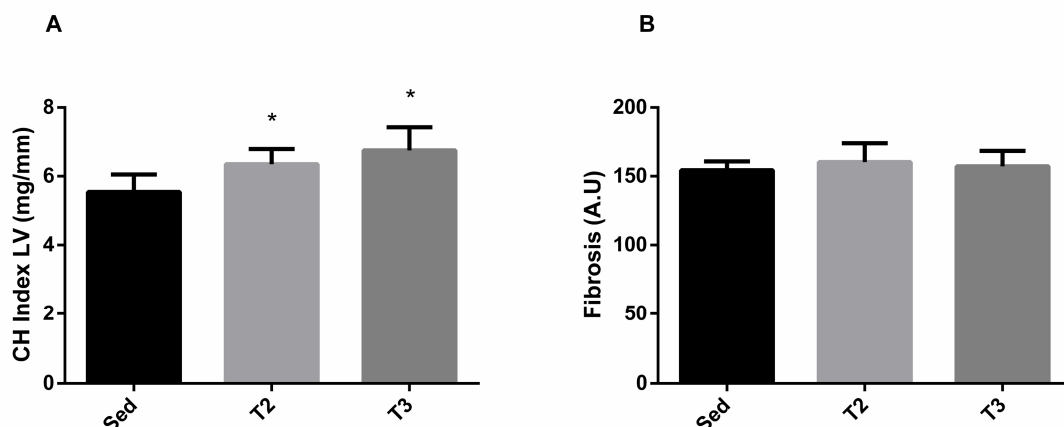


Figure 1. A, Cardiac hypertrophy analyses in mice. Left ventricle weight/tibial length ratio after 6 weeks; N per group = 7-13 mice; **B,** Cardiac fibrosis analyses in mice. Fibrosis arbitrary units were calculated in Masson's trichrome stained sections using Image J after 6 weeks; N per group = 7-13 mice. Values are presented as means \pm SD. Comparisons were performed using ANOVA with subsequent Bonferroni's post-hoc test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

6.3.1.3. Aerobic Capacity Assessment – A decrease in lactate levels was observed, reflecting an improvement of aerobic capacity in group T3 (3.99 ± 1.48 mmol/L) compared to both T2 (6.46 ± 1.76 mmol/L) and sedentary animals (7.28 ± 1.47 mmol/L) ($p=0.010$), with no differences between T2 and the sedentary group ($p>0.99$) (Supplementary Figure 2).

6.3.2. Angiotensin System Assessment

6.3.2.1. Angiotensin Receptors – As depicted in Figure 2A, AT1 angiotensin receptor levels were increased in group T3 (238.2, IQR 176.2 – 282.5 %A.U) compared to sedentary animals (65.14, IQR 37.08 – 113.5 %A.U) ($p<0.05$). The increase in T2 was non-significant (151.7, IQR 118.5 – 181.4, $p=0.14$ %A.U). On the other hand, MAS receptor levels were higher in T2 (220.0, IQR 140.5 – 262.8 %A.U) compared to the sedentary group (67.78, IQR 55.89 – 124.6 %A.U) ($p<0.05$), and no significant alteration was observed in T3 (143.6, IQR 88.47 – 248.8 %A.U) ($p=0.086$) (Figure 2B).

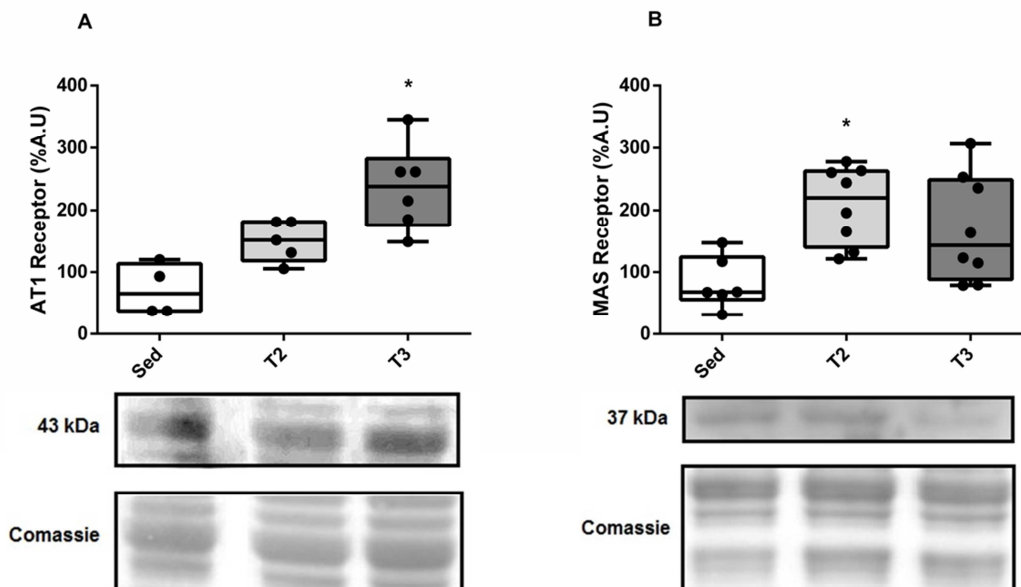


Figure 2. A, AT1 receptor analyses. AT1 receptor units were calculated by the densitometry of the bands using the free software Image J after 6 weeks, N per group = 4 – 6; **B**, MAS receptor analyses. MAS receptor units were calculated

by the band densitometry, using the free software Image J after 6 weeks, N per group = 6 – 8. Comparisons were performed using ANOVA with subsequent Bonferroni's post-hoc test, $p < 0.05$. Values are presented as medians and interquartile ranges.

6.3.2.2. *Angiotensin measurements* - No differences were observed for ANGI, ANGII and ANG 1-7 cardiac tissue levels among the groups (all p values >0.2) (Figures 3A, 3B and 3C).

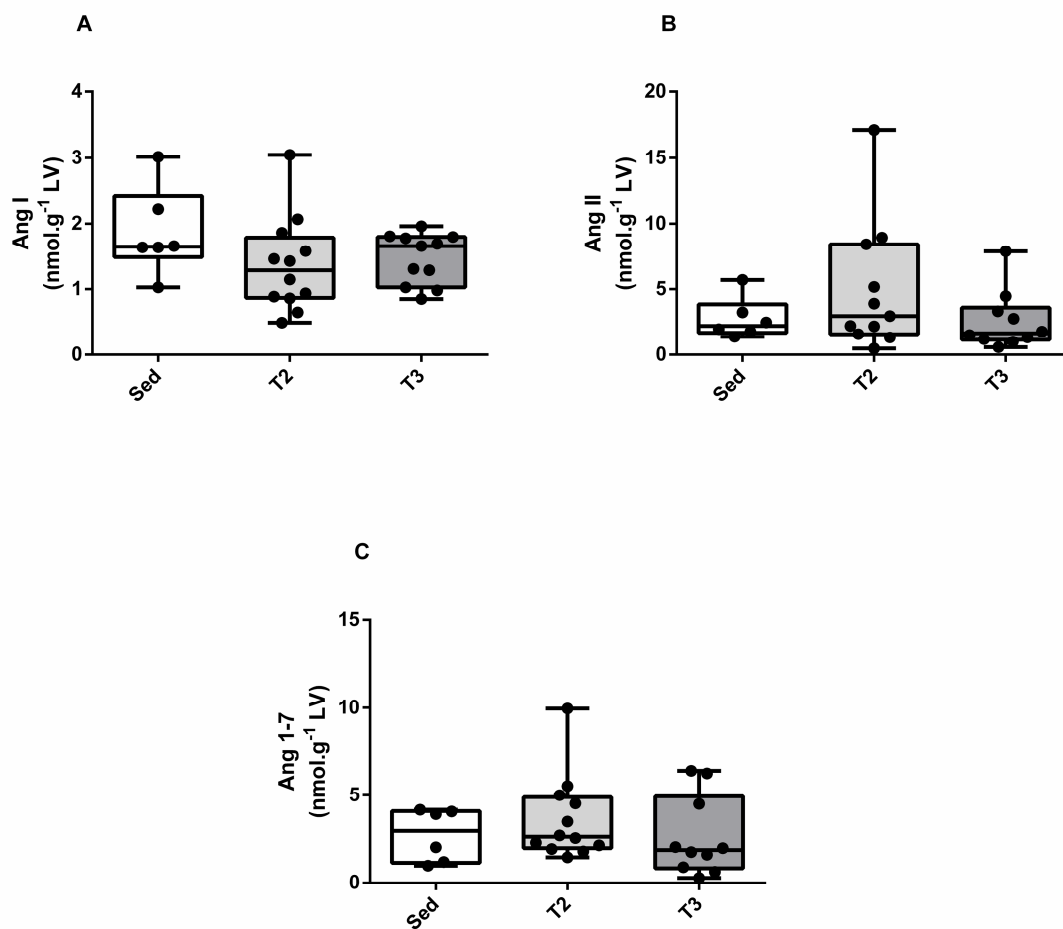


Figure 3. **A**, ANGI analyses in mice. ANGI units were calculated using the software LabSolutions V.5.84 and the values are expressed as nmol.g⁻¹, after 6 weeks, N per group = 6 – 12; **B**, ANGII analyses in mice. N per group = 6 - 11; **C**, ANG1-7 analyses in mice. N per group = 6 – 12. Comparisons were performed using ANOVA with subsequent Bonferroni's post-hoc test. Values are presented as medians and interquartile ranges.

6.3.3. Fetal Genes

MHC- α , MHC- β , and NPPA assessments – As displayed in Figures 4A and 4B, group T3 presented an increase of β -MHC (2.16, IQR 0.69 - 5.95 fold change) compared to T2 (0.65, IQR 0.10 - 1.14 fold change) ($p < 0.05$), as well as a decrease of α -MHC (0.52 IQR 0.29 - 0.81 fold change) compared to the sedentary group (1.12, IQR 0.44 - 2.42 fold change) ($p < 0.05$). The β -MHC/ α -MHC ratio and ANP levels were similar among the groups ($p = 0.50$ and 0.13 , respectively) (Figures 4C and 4D).

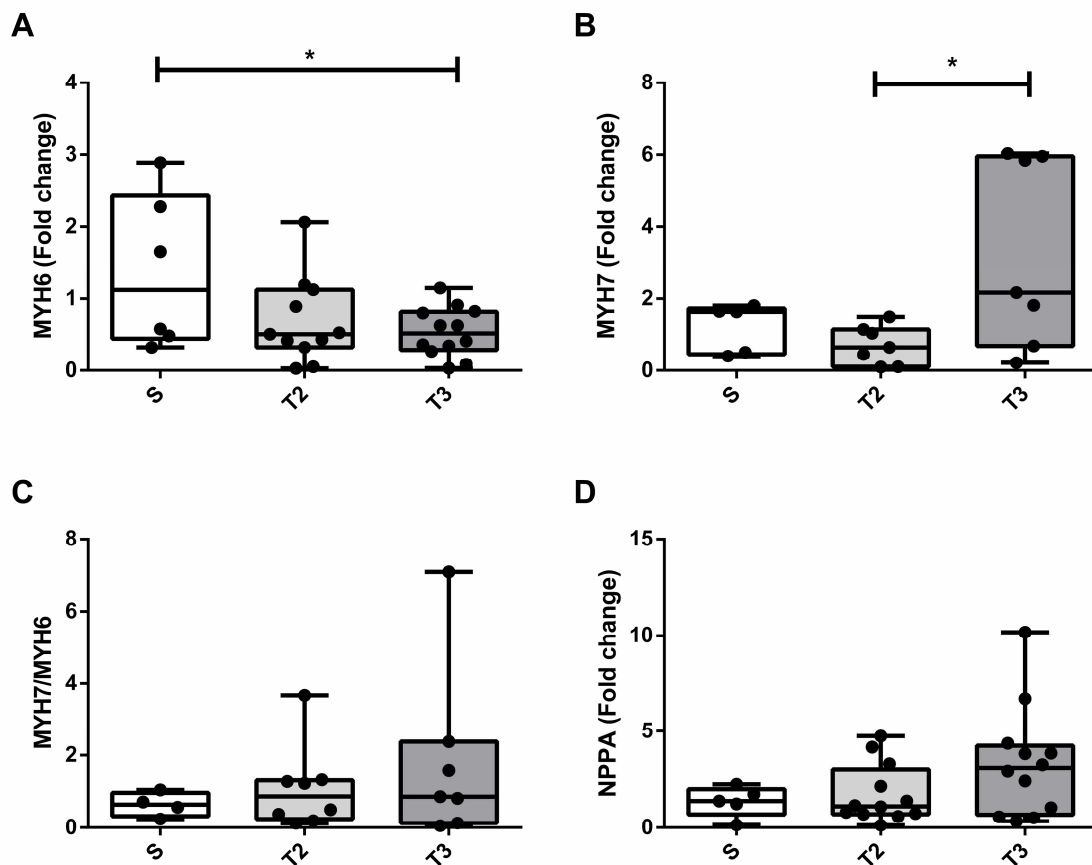


Figure 4. **A**, Real-time PCR of the MYH6 gene – N per group = 6 - 12; **B**, Real-time PCR of the MYH7 gene – N per group = 5 - 7; **C**, Real-time PCR of the MYH7/MYH6 gene – N per group = 4 - 8; **D**, Real-time PCR of the NPPA gene – N per group = 4 - 13. Data were normalized by GAPDH gene. Comparisons were performed using ANOVA with subsequent Bonferroni's post-hoc test. Values are presented as medians and interquartile ranges.

6.4. DISCUSSION

The present study presents two main findings: on one hand, higher exercise volume and intensity promoted cardiac hypertrophy with a similar phenotype when compared to less intense training. On the other hand, more intense training resulted in differential changes in the AT1 and MAS receptors of the RAS, as well as increased expression of myosin heavy chain beta, which are markers of pathological cardiac hypertrophy.

It is important to highlight that cardiac hypertrophy occurs in response to hemodynamic stress and may either maintain or improve cardiac function (physiological phenotype) or result in reduced function (pathological phenotype). Physical exercise induces a transient increase in pressure and/or volume overload, thus triggering the development of physiological cardiac hypertrophy [1-4, 19, 20]. The molecular mechanisms involved in the physiological and pathological processes of cardiac hypertrophy are different, although they involve several similar routes. It has been postulated that physiological molecular mechanisms prevail early in the development of pathological cardiac hypertrophy, and that deleterious mechanisms emerge later, resulting in the pathological phenotype [21]. We hypothesized that a more intense and frequent exercise protocol might result in more pronounced cardiac hypertrophy and that pathological hypertrophy characteristics could be observed. Therefore, we developed increased volume and intensity swimming protocols and assessed the cardiac hypertrophy phenotype and markers for this condition, such as the activation of the classical axis of the RAS, deposition of fibrotic tissue and fetal gene reactivation.

In the present study, we tested two forced swimming exercise protocols. Cardiac hypertrophy was demonstrated, with an approximate increase of 13% in LV mass, similar to a previous study conducted in our laboratory, applying the same T2 protocol (data not published), and other studies using similar protocols [22, 23]. In fact, LV mass increased by 12.5% when applying this protocol in the present study. Both frequency and load were increased in group T3, resulting in higher hemodynamic stress, with higher volume and pressure and lower recovery intervals. Indeed, group T3 displayed an LV mass increase of 17.6%, higher than T2, but with no statistical difference between training groups. Our

findings are in accordance with different studies that evaluated cardiac hypertrophy induced by physical exercise ^[23-27].

Pathological cardiac hypertrophy is often characterized by the deposition of fibrotic tissue in the interstitium ^[4]. Our results demonstrated no increase in interstitial fibrosis in either trained group in comparison to sedentary mice. Curiously, Benito et al. ^[28], observed an increase in right ventricle fibrosis in rats submitted to a 16-week treadmill exercise protocol, but no difference in fibrosis was found in the groups that performed the same exercise protocol for 4 and 8 weeks ^[28]. It is possible that, in this model, fibrosis occurs late and predominantly in the right ventricle. Therefore, lack of fibrosis in the present study might be related to the shorter intervention period and/or to evaluations restricted to the LV.

The role of the RAS, through the ANGII / AT1 axis in cardiac hypertrophy has been demonstrated in several studies ^[29-34]. However, little is known about the effect of the RAS alternative axis in this process. It is important to emphasize that the pathological or physiological phenotype of hypertrophy is related to the balance between the classic (ANGII / AT1R) and alternative (ANG1-7 / MASR) axes ^[10]. In fact, the RAS alternative axis seems to be involved in cardiac hypertrophy induced by physical exercise ^[24, 35, 36]. We aimed to evaluate the classical and alternative RAS routes in the two tested exercise protocols. We observed higher levels of the MAS receptor in group T2 and higher levels of the AT1 receptor in group T3. These findings suggest that the alternative axis could be activated in physiological cardiac hypertrophy, while more intense training would result in the activation of the classic RAS axis. However, we did not observe changes in cardiac tissue angiotensin peptides I, II and 1-7 concentrations with either protocol. Since the binding rate of the peptides to their specific receptor is a function of the peptide and receptor concentrations, an increase in AT1 or MAS might highlight which pathway is predominantly active. Interestingly, Barauna et al. ^[27] demonstrated that rats submitted to a strength exercise protocol developed cardiac hypertrophy without increasing ANGII cardiac levels, but treatment with the AT1 blocker losartan prevented LV mass increases, suggesting cardiac hypertrophy induction by ANGII-independent activation of AT1 ^[27].

The discovery of MAS is relatively new ^[38], however several studies have already demonstrated its importance for the cardiovascular system ^[9, 38-40]. The MAS receptor, similarly to AT1, is a G protein-coupled receptor with seven transmembrane domains, but, unlike AT1, MASR can only be activated by the binding of ANG1-7 heptapeptides ^[10]. On the other hand, the MAS receptor can form a constitutive hetero-oligomeric complex with AT1, preventing the interaction of ANGII with AT1, thus exerting an antagonist action on the pathological pathway ^[41]. Indeed, Guimarães et al. ^[25] demonstrated that MAS receptor deletion in mice produces an imbalance in the RAS axis, increasing the activation of the ANGII/AT1R and promoting cardiac hypertrophy with increased collagen I and III synthesis after physical exercise, while wild type animals developed physiological cardiac hypertrophy with increased production of ANG1-7 ^[25]. In addition, the exercise effects were similar to the administration of ANG1-7 in spontaneously hypertensive rats, decreasing blood pressure and heart rate, improving end-diastolic LV pressure and reducing the cardiac hypertrophy index ^[35]. In the present study, group T2 displayed higher MAS receptor levels, without changes in ANG1-7, as opposed to the higher AT1 levels and no changes in the MAS receptor observed in group T3. We speculate that this finding might underscore the activation of molecular mechanisms participating in pathological cardiac hypertrophy in response to increased exercise volume and intensity. In fact, this is reinforced by the modest increase of fetal genes observed in group T3. The β -MHC isoform reduces contractile velocity and is associated with high glycolytic activity, thus disturbing cardiac function ^[1, 4].

6.5. CONCLUSIONS

In conclusion, our results suggest that increased exercise volume and intensity promote a similar cardiac hypertrophy phenotype when compared to usual physiological cardiac hypertrophy protocols. However, the more intense and frequent protocol favored the activation of the RAS classical axis and fetal genes, which may represent early mechanisms in the transition to a more pathological process. Studies applying more prolonged protocols are needed in order to confirm these findings.

6.6. FUNDING

This work was supported in part by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos of the Porto Alegre Hospital de Clínicas (FIPEHCPA).

6.7. DISCLOSURES

None

6.8. REFERENCES

1. Gupta, S., B. Das, and S. Sen, *Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(6): p. 623-52.
2. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
3. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 962-70.
4. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
5. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
6. Braunwald, E., *The war against heart failure: the Lancet lecture*. Lancet, 2015. **385**(9970): p. 812-24.
7. Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
8. Carbone, S., C.J. Lavie, and R. Arena, *Obesity and Heart Failure: Focus on the Obesity Paradox*. Mayo Clin Proc, 2017. **92**(2): p. 266-279.
9. Patel, V.B., et al., *Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1313-26.
10. Farag, E., et al., *An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis*. Anesth Analg, 2015. **120**(2): p. 275-92.
11. Speth, R.C. and M.J. Giese, *Update on the Renin-Angiotensin System*. J Pharmacol Clin Toxicol, 2013. **1**(1): p. 1004.
12. Eijsvogels, T.M.H et al., *Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise?* Physiol Rev. 2016. **96**(1): p. 99-125.
13. in *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2011: Washington (DC).
14. Kilkeny, C., et al., *Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(4): p. 991-3.

15. Bancroft, J.D.L., C., *Connective and mesenchymal tissues with their stains*, in *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, S.K.L. Suvarna, C. Bancroft, J.D., Editor. 2013, Churchill Livingstone: China. p. 202-203.
16. Masson, P., *Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique*. Bulletin of the International Association of Medicine, 1929. **12**: p. 75.
17. 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, 1976. **72**: p. 248-54.
18. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
19. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 38-48.
20. Bernardo, B.C. and J.R. McMullen, *Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling*. Cardiol Clin, 2016. **34**(4): p. 515-530.
21. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets*. Arch Toxicol, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
22. Pinto, G.H., *Sinalização autofágica e níveis de miostatina em modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos*, in *PPG em Ciências da Saúde, Cardiologia e Ciências Cardiovasculares*. 2014, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre/RS. p. 73.
23. Evangelista, F.S., P.C. Brum, and J.E. Krieger, *Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(12): p. 1751-9.
24. Fernandes, T., et al., *Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)*. Hypertension, 2011. **58**(2): p. 182-9.

25. Guimaraes, G.G., et al., *Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice*. Peptides, 2012. **38**(1): p. 54-61.
26. van de Wal, R.M., et al., *Addition of an angiotensin receptor blocker to full-dose ACE-inhibition: controversial or common sense?* Eur Heart J, 2005. **26**(22): p. 2361-7.
27. Barauna, V.G., et al., *AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(2): p. R381-7.
28. Benito, B., et al., *Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training*. Circulation, 2011. **123**(1): p. 13-22.
29. Zhang, G.X., et al., *Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(4): p. 804-11.
30. Nakashima, H., et al., *Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature*. Curr Vasc Pharmacol, 2006. **4**(1): p. 67-78.
31. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. Circ Res, 1993. **73**(3): p. 413-23.
32. Wu, J., et al., *Insights into the activation and inhibition of angiotensin II type 1 receptor in the mechanically loaded heart*. Circ J, 2014. **78**(6): p. 1283-9.
33. Akazawa, H., Komuro, I., *Mechanical stress induces cardiomyocyte hypertrophy through agonist-independent activation of angiotensin II type 1 receptor*. Mechanosensitivity of the heart, ed. A. Kamkin, Kiseleva, I. 2010, Dordrecht, the Netherlands: Springer. 83 – 95.
34. Yasuda, N., et al., *Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation*. EMBO Rep, 2008. **9**(2): p. 179-86.
35. Bertagnolli, M., et al., *An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats*. Peptides, 2014. **51**: p. 65-73.

36. Motta-Santos, D., et al., *Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise*. *Hypertens Res*, 2016. **39**(7): p. 506-12.
37. Dostal, D.E., et al., *Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C838-50.
38. Bader, M., *ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin*. *Pflugers Arch*, 2013. **465**(1): p. 79-85.
39. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
40. Santos, R.A., et al., *Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice*. *Hypertension*, 2006. **47**(5): p. 996-1002.
41. Kostenis, E., et al., *G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor*. *Circulation*, 2005. **111**(14): p. 1806-13.

PARTE III

7. DISCUSSÃO:

Os principais achados do estudo são: (I) diferentes volumes/intensidades de exercícios promovem hipertrofia cardíaca com fenótipo similar em ambos os grupos treinados, (II) promove alterações nos receptores AT1 e MAS do RAS, e (III) maiores volumes/intensidade de exercício, resultam na reativação de genes fetais.

A hipertrofia cardíaca ocorre em resposta a um estresse hemodinâmico e pode evoluir com melhora da função (fenótipo fisiológico) ou perda de função cardíaca (fenótipo patológico). O exercício físico pode causar um aumento transitório da sobrecarga de pressão e volume, desta forma atuando como um gatilho para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica [1-6].

Os mecanismos moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos da hipertrofia cardíaca são diferentes, apesar de envolver diversas rotas similares. A busca de novos marcadores moleculares que diferenciam as duas fenótipos é extremamente relevante, pois pode apontar para alvos terapêuticos que inibam o processo de hipertrofia cardíaca patológica [4].

Sabe-se que nas primeiras semanas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica se inicia com mecanismos moleculares fisiológicos e, que em sua progressão o fenótipo patológico começa a aparecer [7]. A partir destes dados, surgiu a ideia deste trabalho que trata de desenvolver uma hipertrofia cardíaca patológica a partir de estímulos fisiológicos intermitentes de exercício. Para isso, desenvolvemos protocolos de natação com aumento de volume e intensidade e propomos avaliar marcadores clássicos da hipertrofia cardíaca com perfil patológico, como a ativação do eixo clássico do sistema renina-angiotensina, deposição de tecido fibroso e reativação de genes fetais.

Neste estudo testamos dois protocolos de exercício forçado em piscina, sendo, (i) T2: treinamento de 90min, 2x ao dia, por 6 semanas – Estudos anteriores do nosso grupo demonstrou que este protocolo de exercício promoveu uma hipertrofia cardíaca fisiológica, com aumento da massa do VE em aproximadamente 13% [8]. Neste estudo reproduzimos este dado, com aumento da massa do VE em 12,47%. (ii) T3: treinamento de 90min, 3x ao dia com sobrecarga de 2% de peso corporal, por 6 semanas – Este protocolo foi desenvolvido imaginando que ao aumentar o estresse hemodinâmico, por

aumento de volume e pressão com intervalos de recuperação menores, imaginamos que desta maneira a hipertrofia cardíaca seria maior e poderia ativar mecanismos moleculares característicos da hipertrofia cardíaca patológica. De fato, o grupo T3 teve aumento na massa do VE em 17,62%, apesar de numericamente maior não houve diferença estatística no grau de hipertrofia cardíaca entre o T2 e T3. Nossos achados são reforçados pelos diferentes estudos que avaliaram a hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício físico [9-13].

Estruturalmente, uma das principais características que diferenciam a hipertrofia cardíaca fisiológica da patológica é a deposição de tecido fibroso no interstício, que como consequência irá diminuir a capacidade de dilatação do coração, causando uma disfunção diastólica [4]. No nosso estudo esperávamos um aumento de fibrose no grupo T3, no entanto não obtivemos diferença nos níveis de fibrose cardíaca no ventrículo esquerdo nos grupos T2 e T3 em relação ao grupo sedentário, o que são evidências estruturais de um remodelamento hipertrófico fisiológico. Por outro lado, a sobrecarga de volume e pressão afeta mais o ventrículo direito que o esquerdo. De fato, Benito e Cols. 2011, observaram um aumento de fibrose do ventrículo direito de ratos submetidos a um protocolo de exercício físico de 16 semanas em esteira, não encontrando diferença nos grupos que realizaram o protocolo por 4 e 8 semanas [14]. Estes dados indicam que a deposição de fibrose após o estresse hemodinâmico ocorre tardiamente e é possível que ocorra predominantemente no ventrículo direito (VD) e não no VE. Acreditamos que uma das limitações do nosso estudo tenha sido não avaliar a fibrose no ventrículo direito. Não obstante, quando avaliamos a hipertrofia do VD não observamos diferença entre os grupos treinados em relação aos sedentários.

Curiosamente, apesar de não encontrarmos aumento de fibrose entre os grupos, tampouco observamos um aumento da área dos cardiomiócitos (em cortes transversais) nos grupos treinados em comparação aos animais controles. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que tenha ocorrido o aumento da massa cardíaca pela adição de sarcômeros em série, característico da hipertrofia cardíaca excêntrica, que seria melhor visualizada em cortes longitudinais.

A literatura científica está repleta de artigos que mostram o papel do sistema renina-angiotensina (SRA), por meio do eixo ANGII/AT1, no desenvolvimento do fenótipo patológico da hipertrofia cardíaca [15-20]. No entanto, pouco se fala sobre o efeito do eixo alternativo do SRA neste processo. Evidências mostram que o fenótipo patológico ou fisiológico da hipertrofia depende do balanço entre os eixos clássico (ANGII/AT1R) e alternativo (ANG1-7/MASR) [21].

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que na hipertrofia cardíaca causada pelo exercício físico tem importante participação da via alternativa do SRA [10, 22, 23]. Em nosso trabalho buscamos avaliar as vias clássicas e alternativas do SRA após diferentes estímulos hemodinâmicos provocados por protocolos de exercícios, no entanto não observamos mudanças na concentração dos peptídeos angiotensina I, II e 1-7 no tecido cardíaco. Ainda assim, os níveis que observamos de ANGII e ANG1-7 - em coração de camundongos - parecem ser pelo menos duas vezes maior daqueles observados por Fernandes (2011) em coração de ratos [10].

Contudo, observamos alterações nos receptores AT1 e MAS, com aumento da expressão do receptor MAS no grupo T2 em relação ao SED e aumento do AT1 no T3 em relação ao SED. Estes resultados mostram que o eixo alternativo está predominante no grupo T2 enquanto que no T3 o eixo clássico do SRA parece exercer papel mais importante. Ainda que não ocorram alterações nas concentrações teciduais dos peptídeos de angiotensina, pois velocidade de ligação do peptídeo ao seu receptor específico é uma função dependente das concentrações dos peptídeos e de seus receptores, portanto o aumento do AT1 ou MAS podem evidenciar quais vias estão predominantemente ativas.

Nossos dados corroboram com o trabalho de Baraúna e Cols. que mostraram que ratos submetidos a protocolo de exercício de força desenvolvem hipertrofia cardíaca sem o aumento de ANGII cardíaco. Quando os animais foram tratados previamente com losartana (bloqueador do AT1) não teve aumento na massa do VE, sugerindo uma indução na hipertrofia cardíaca sem a participação de ANGII [11].

A ANGII desencadeia efeitos através de sua ligação ao receptor de Angiotensina (ATR, do inglês Angiotensin receptor). Existem quatro isoformas

dos receptores de angiotensinas classificados como AT1, AT2, AT3 e AT4 [24]. No entanto, a principal mecanismo de ação da ANGII na hipertrofia cardíaca é por meio de sua interação com o receptor AT1, como evidenciado em modelos *in vitro* [17] e *in vivo* [25].

O AT1 tem dois mecanismos de ação: (i) desencadeada pela ligação de ANGII ou; (ii) por estresse mecânico [18, 19]. Em ambos os casos ativando vias intracelulares relacionadas à hipertrofia cardíaca.

O mecanismo desta ação independente de ANGII foi demonstrado por Yasuda e Cols., cujos resultados demonstraram que o estresse mecânico causa a ativação do receptor AT1 através da mudança de conformação no sétimo domínio transmembrana do receptor [20]. No entanto, o fenótipo da hipertrofia desencadeado pela ativação do AT1 por meio do estresse mecânico parece ser fisiológico, ao contrário do fenótipo causado pela ligação da ANGII [18]. Isso pode ocorrer, já que o AT1 pode disparar cascatas de sinalização por meio de proteínas G ou por β -arrestinas [18].

Nossos resultados sugerem que a hipertrofia cardíaca dos grupos T2 e T3 tem perfil estrutural de um fenótipo fisiológico, o que nos levam a crer que o aumento nos níveis de AT1 no grupo T3 possa estar associado a um mecanismo de sinalização intracelular desencadeado pelo estresse mecânico.

É inegável a importância do receptor AT1 para o correto funcionamento dos cardiomiócitos. No entanto, tão importante quanto os mecanismos de ativação deste receptor é o controle de sua ativação e de suas vias de sinalização e, neste cenário não há como não ressaltar a importância do eixo alternativo do SRA, principalmente do receptor MAS.

Apesar da descoberta do MAS ser relativamente recente [26] existem diversos estudos que demonstram a sua importância para o sistema cardiovascular [26-29].

O receptor MAS, assim como o AT1, também é um receptor acoplado à proteína G, com sete domínios transmembrana, mas diferente do AT1, o MASR somente é ativado pela ligação do heptapeptídeos ANG1-7 [21]. Por outro lado, o receptor MAS pode formar complexo hetero-oligomérico constitutivo com o AT1, impedindo a interação da ANGII com o AT1, assim exercendo uma ação antagônica a via patológica [30].

De fato, Guimarães e Cols. demonstraram que a deleção do receptor MAS em camundongos produz um desequilíbrio do SRA aumentando a ativação do eixo ANGII/AT1R e, desta forma o exercício físico promoveu uma hipertrofia cardíaca com aumento de colágeno I e III no grupo nocaute, enquanto o grupo selvagem teve aumento de ANG1-7 e uma hipertrofia cardíaca fisiológica ^[13]. Em outro estudo, o exercício físico aeróbico demonstrou efeitos semelhantes aos da administração de ANG1-7 em ratos espontaneamente hipertensos, como redução da pressão arterial e frequência cardíaca, melhora na pressão diastólica final do VE e redução do índice de hipertrofia cardíaca ^[22].

Nosso estudo apresentou um aumento na expressão protéica do receptor MAS no grupo T2 em comparação ao sedentário, sem o incremento nos níveis cardíacos de ANG1-7. Nossos resultados sugerem que a maior expressão do receptor MAS no grupo T2 pode ter suprimido a ativação da via clássica através da ação do receptor MAS sobre o receptor AT1, impedindo a formação do complexo ANGII/AT1.

Opostamente, o grupo T3 teve aumento no receptor AT1 sem aumento do receptor MAS, estes dados podem indicar que o aumento de volume/intensidade do exercício pode estar promovendo mudanças moleculares moderadas de vias envolvidas com a hipertrofia cardíaca patológica. Apesar desta afirmativa ser precipitada, ela é reforçada por uma modesta reativação de genes fetais no grupo T3, principalmente pelo aumento da expressão do gene da β -MHC. No entanto, os dados de reativação fetal quando analisados pela razão β -MHC/ α -MHC e ANP sugerem um perfil fenotípico fisiológico.

A isoforma β -MHC promove baixa velocidade contrátil e está associada à alta atividade glicolítica, podendo gerar prejuízos à função cardíaca ^[1, 4]. O aumento de expressão da β -MHC que observamos no grupo T3 pode ser início da indução de reprogramação fetal induzido pelo exercício físico e, portanto um trabalho pioneiro em demonstrar associação entre exercício físico e um perfil molecular de hipertrofia patológica.

8. CONCLUSÃO:

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o aumento de volume e intensidade do exercício, promoveu um fenótipo de hipertrofia cardíaca semelhante entre os grupos treinados. No entanto, o protocolo de maior intensidade e volume favoreceu a ativação do eixo clássico RAS e genes fetais, o que pode representar o início de mecanismos envolvidos na transição para um processo mais patológico. Estudos que aplicam protocolos mais prolongados são necessários para confirmar esses achados.

9. PERSPECTIVAS:

O protocolo de maior intensidade/volume evidenciou uma modesta modificação da β -MHC e um aumento da expressão do receptor AT1 no grupo T3. Neste contexto, pretendemos avaliar as futuras vias de sinalização intracelular ativadas pelo receptor AT1 como uma proteína G e uma β -arrestina.

10. REFERÊNCIAS PARTE III:

1. Gupta, S., B. Das, and S. Sen, *Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(6): p. 623-52.
2. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(8): p. 589-600.
3. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. *Hypertension*, 2007. **49**(5): p. 962-70.
4. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. *Pharmacol Ther*, 2010. **128**(1): p. 191-227.
5. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(1): p. 38-48.
6. Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2016. **133**(4): p. e38-360.
7. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
8. Pinto, G.H., *Sinalização autofágica e níveis de miostatina em modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos*, in *PPG em Ciências da Saúde, Cardiologia e Ciências Cardiovasculares*. 2014, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre/RS. p. 73.
9. Evangelista, F.S., P.C. Brum, and J.E. Krieger, *Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice*. *Braz J Med Biol Res*, 2003. **36**(12): p. 1751-9.
10. Fernandes, T., et al., *Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)*. *Hypertension*, 2011. **58**(2): p. 182-9.

11. Barauna, V.G., et al., *AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **295**(2): p. R381-7.
12. Soci, U.P., et al., *MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats*. *Physiol Genomics*, 2011. **43**(11): p. 665-73.
13. Guimaraes, G.G., et al., *Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice*. *Peptides*, 2012. **38**(1): p. 54-61.
14. Benito, B., et al., *Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training*. *Circulation*, 2011. **123**(1): p. 13-22.
15. Zhang, G.X., et al., *Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(4): p. 804-11.
16. Nakashima, H., et al., *Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006. **4**(1): p. 67-78.
17. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. *Circ Res*, 1993. **73**(3): p. 413-23.
18. Wu, J., et al., *Insights into the activation and inhibition of angiotensin II type 1 receptor in the mechanically loaded heart*. *Circ J*, 2014. **78**(6): p. 1283-9.
19. Akazawa, H., Komuro, I., *Mechanical stress induces cardiomyocyte hypertrophy through agonist-independent activation of angiotensin II type 1 receptor*. *Mechanosensitivity of the heart*, ed. A. Kamkin, Kiseleva, I. 2010, Dordrecht, the Netherlands: Springer. 83 – 95.
20. Yasuda, N., et al., *Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation*. *EMBO Rep*, 2008. **9**(2): p. 179-86.
21. Farag, E., et al., *An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis*. *Anesth Analg*, 2015. **120**(2): p. 275-92.

22. Bertagnolli, M., et al., *An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats*. *Peptides*, 2014. **51**: p. 65-73.
23. Motta-Santos, D., et al., *Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise*. *Hypertens Res*, 2016. **39**(7): p. 506-12.
24. van de Wal, R.M., et al., *Addition of an angiotensin receptor blocker to full-dose ACE-inhibition: controversial or common sense?* *Eur Heart J*, 2005. **26**(22): p. 2361-7.
25. Dostal, D.E., et al., *Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C838-50.
26. Bader, M., *ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin*. *Pflugers Arch*, 2013. **465**(1): p. 79-85.
27. Santos, R.A., et al., *Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice*. *Hypertension*, 2006. **47**(5): p. 996-1002.
28. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
29. Patel, V.B., et al., *Cardioprotective effects mediated by angiotensin II type 1 receptor blockade and enhancing angiotensin 1-7 in experimental heart failure in angiotensin-converting enzyme 2-null mice*. *Hypertension*, 2012. **59**(6): p. 1195-203.
30. Kostenis, E., et al., *G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor*. *Circulation*, 2005. **111**(14): p. 1806-13.