

# Treinamento Aeróbico Contínuo de Intensidade Moderada Melhora a Contratilidade do Cardiomiócito em Camundongos com Nocaute para o Receptor $\beta_1$ -Adrenérgico

*Moderate Continuous Aerobic Exercise Training Improves Cardiomyocyte Contractility in  $\beta_1$  Adrenergic Receptor Knockout Mice*

Aurora Corrêa Rodrigues,<sup>1</sup> Antônio José Natali,<sup>1</sup> Daise Nunes Queiroz da Cunha,<sup>1</sup> Alexandre Jayme Lopes Dantas Costa,<sup>1</sup> Anselmo Gomes de Moura,<sup>1</sup> Miguel Araújo Carneiro-Júnior,<sup>1</sup> Leonardo Bonato Félix,<sup>1</sup> Patrícia Chakur Brum,<sup>2</sup> Thales Nicolau Prímola-Gomes<sup>1</sup>

Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG – Brasil<sup>1</sup>

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP – Brasil<sup>2</sup>

## Resumo

**Fundamento:** A falta de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ -AR) cardíacos afeta negativamente a regulação de inotropismo e lusitropismo cardíacos, levando, no longo prazo, a insuficiência cardíaca (IC). Recomenda-se exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada (EACM) como adjuvante no tratamento de pacientes com IC.

**Objetivo:** Testar os efeitos do EACM nas propriedades contráteis de miócitos do ventrículo esquerdo (VE) de camundongos com nocaute para o receptor  $\beta_1$ -adrenérgico ( $\beta_1$ ARKO).

**Método:** Camundongos machos com 4 a 5 meses de idade, *wild-type* (WT) e  $\beta_1$ ARKO foram divididos em grupos: WT controle (WTc) e treinado (WTt); e  $\beta_1$ ARKO controle ( $\beta_1$ ARKOc) e treinado ( $\beta_1$ ARKOt). Os grupos treinados foram submetidos a regime de EACM (60 min/dia; 60% da velocidade máxima, 5 dias/semana) em esteira rolante, por 8 semanas. Adotou-se  $P \leq 0,05$  como nível de significância em todas as comparações.

**Resultados:** Os animais  $\beta_1$ ARKO ( $\beta_1$ ARKOc +  $\beta_1$ ARKOt) correram uma distância maior do que os animais WT (WTc + WTt) ( $p < 0,05$ ). Os camundongos  $\beta_1$ ARKO apresentaram maiores pesos corporal (PC), do coração (PCo) e do ventrículo esquerdo (PVE), assim como PCo/PC e PVE/PC do que os camundongos WT. Entretanto, o EACM não afetou tais parâmetros. Os miócitos do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) amplitude e velocidades de contração e relaxamento do que os dos camundongos WT. Além disso, o EACM aumentou ( $p < 0,05$ ) a amplitude e as velocidades de contração e relaxamento nos camundongos  $\beta_1$ ARKO.

**Conclusão:** O EACM melhora a contratilidade do miócito do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO. Tal achado confirma o valor terapêutico desse tipo de treinamento físico para o tratamento de doenças cardíacas envolvendo dessensibilização ou redução de  $\beta_1$ -AR. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(3):256-262)

**Palavras-chave:** Insuficiência Cardíaca; Exercício; Contração Miocárdica; Miócitos Cardíacos; Antagonistas de Receptores Adrenérgicos beta 1; Camundongos.

## Abstract

**Background:** The lack of cardiac  $\beta_1$ -adrenergic receptors ( $\beta_1$ -AR) negatively affects the regulation of both cardiac inotropy and lusitropy, leading, in the long term, to heart failure (HF). Moderate-intensity aerobic exercise (MCAE) is recommended as an adjunctive therapy for patients with HF.

**Objective:** We tested the effects of MCAE on the contractile properties of left ventricular (LV) myocytes from  $\beta_1$  adrenergic receptor knockout ( $\beta_1$ ARKO) mice.

**Methods:** Four- to five-month-old male wild type (WT) and  $\beta_1$ ARKO mice were divided into groups: WT control (WTc) and trained (WTt); and  $\beta_1$ ARKO control ( $\beta_1$ ARKOc) and trained ( $\beta_1$ ARKOt). Animals from trained groups were submitted to a MCAE regimen (60 min/day; 60% of maximal speed, 5 days/week) on a treadmill, for 8 weeks.  $P \leq 0.05$  was considered significant in all comparisons.

**Results:** The  $\beta_1$ ARKO and exercised mice exhibited a higher ( $p < 0.05$ ) running capacity than WT and sedentary ones, respectively. The  $\beta_1$ ARKO mice showed higher body (BW), heart (HW) and left ventricle (LVW) weights, as well as the HW/BW and LVW/BW than WT mice. However, the MCAE did not affect these parameters. Left ventricular myocytes from  $\beta_1$ ARKO mice showed increased ( $p < 0.05$ ) amplitude and velocities of contraction and relaxation than those from WT. In addition, MCAE increased ( $p < 0.05$ ) amplitude and velocities of contraction and relaxation in  $\beta_1$ ARKO mice.

**Conclusion:** MCAE improves myocyte contractility in the left ventricle of  $\beta_1$ ARKO mice. This is evidence to support the therapeutic value of this type of exercise training in the treatment of heart diseases involving  $\beta_1$ -AR desensitization or reduction. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(3):256-262)

**Keywords:** Heart Failure; Exercise; Myocardial Contraction; Myocytes, Cardiac; Adrenergic beta 1 Receptor Antagonists; Mice.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Thales Nicolau Prímola Gomes •

Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Educação Física - Av. Ph. Rolfs, s/n. CEP 36570-000, Campus Universitário, Viçosa, MG – Brasil

E-mail: thales.gomes@ufv.br, thalesprimola@gmail.com

Artigo recebido em 14/05/2017, revisado em 15/09/2017, aceito em 22/09/2017

DOI: 10.5935/abc.20180025

## Introdução

Hiperatividade simpática crônica resultante de alteração do equilíbrio do sistema nervoso autônomo é comum em muitas doenças cardiovasculares, levando a insuficiência cardíaca (IC) e estando relacionada a maior incidência de morbimortalidade.<sup>1,2</sup> Tal hiperatividade acompanha-se de diminuição da densidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) e dessensibilização dos  $\beta$ -AR restantes, levando a redução da resposta cardíaca contrátil à ativação dos  $\beta$ -AR.<sup>3</sup> Nesse contexto, o  $\beta_1$ -AR, predominante no coração, é seletivamente reduzido, resultando em uma modificação da relação entre os subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ,<sup>4</sup> estando o  $\beta_2$ -AR acentuadamente acoplado à proteína G inibitória.<sup>5</sup> Como consequência, como o  $\beta_1$ -AR fosforila várias proteínas reguladoras do  $Ca^{2+}$  envolvidas na excitação-contracção do cardiomiócito,<sup>5-7</sup> o cronotropismo, o inotropismo e o lusitropismo cardíacos acham-se comprometidos na estimulação adrenérgica.<sup>8</sup>

Treinamento físico na reabilitação cardíaca é muito importante em várias doenças cardiovasculares, incluindo IC crônica.<sup>9</sup> Exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada (EACM) é, atualmente, a melhor forma de exercício para aquela população, devido à sua eficácia e segurança.<sup>10</sup> Por exemplo, o treinamento aeróbico recupera o equilíbrio autonômico de repouso em pacientes com IC ao reduzir a atividade nervosa simpática de repouso,<sup>11</sup> restaurando o tônus parassimpático ao coração.<sup>12,13</sup> No miocárdio, o treinamento aeróbico aumenta o volume de ejeção, e, portanto, o débito cardíaco em pacientes com IC<sup>14,15</sup> e modelos animais de IC,<sup>8</sup> embora alguns estudos não tenham conseguido confirmar tais benefícios.<sup>11,12</sup> No nível celular, estudos em modelos animais de hiperatividade simpática demonstraram que o treinamento aeróbico melhora o saldo das proteínas envolvidas na mobilização do  $Ca^{2+}$  cardíaco isoladamente<sup>8,16</sup> ou em combinação com betabloqueadores.<sup>17</sup> Entretanto, se o treinamento com EACM afeta as propriedades mecânicas de miócitos isolados em um coração desprovido de  $\beta_1$ -AR precisa ser elucidado.

Este estudo visou a testar os efeitos de um programa de EACM nas propriedades mecânicas de miócitos do ventrículo esquerdo (VE) isolados em camundongos com nocaute para o receptor  $\beta_1$ -adrenérgico ( $\beta_1$ ARKO). Levantamos a hipótese de que o treinamento com EACM afeta positivamente as propriedades mecânicas dos miócitos do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO.

## Métodos

### Animais experimentais

Estudou-se uma coorte de camundongos machos com 4 a 5 meses de idade, *wild-type* (WT) e  $\beta_1$ ARKO congênicos no marcador genético C57Bl6/J. Os camundongos foram mantidos em gaiolas com ciclos de claro/escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada (22°C) e livre acesso a água e dieta padrão para roedores. Os camundongos  $\beta_1$ ARKO e WT foram aleatoriamente designados para um dos seguintes grupos usando-se amostragem aleatória simples: WT controle (WTc), WT treinado (WTt),  $\beta_1$ ARKO controle ( $\beta_1$ ARKOc) e  $\beta_1$ ARKO treinado ( $\beta_1$ ARKOt). O tamanho da

amostra foi definido por conveniência. Em todos os grupos, iniciou-se o período experimental com oito animais, mas, durante o procedimento de isolamento do cardiomiócito, alguns animais/corações foram perdidos. Assim, o número final de animais em cada grupo acha-se especificado nas figuras e tabela. O peso corporal (PC) foi medido toda semana. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (protocolo #59/2012) conforme o Manual de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório/2011.

### Protocolo de treinamento físico e teste de esforço em esteira rolante

O EACM foi realizado em esteira rolante motorizada (Insight Equipamentos Científicos, Brasil), 5 dias/semana (segunda a sexta-feira), 60 min/dia, por 8 semanas. Ao longo da primeira semana, a duração e a velocidade do exercício foram progressivamente aumentadas de 10 minutos e 10% da velocidade máxima até 60 minutos e 60% da velocidade máxima obtida durante teste de esforço em esteira rolante. Ao final da quarta semana de treinamento aeróbico, repetiu-se o teste de esforço em esteira rolante para reajuste da velocidade da corrida. Essa intensidade foi mantida durante o resto do período de treinamento. Os animais dos grupos não treinados foram manipulados diariamente e submetidos a curto período de exercício leve (5 min, inclinação de 0%, 5 m/min, 3 dias/semana) durante o período de treinamento. A capacidade de exercício estimada pela distância total corrida foi avaliada usando-se um protocolo de exercício em esteira rolante para camundongos (Panlab/Harvard Apparatus, Espanha), como já descrito.<sup>18</sup> Resumidamente, após adaptação em esteira rolante por uma semana (10 min/dia, inclinação de 0%, 0,3 km/h), os camundongos foram colocados na faixa de exercício para aclimação por pelo menos 30 minutos. O teste de esforço em esteira rolante começou com 6 m/min e nenhuma inclinação, aumentando 3 m/min a cada 3 minutos até a fadiga, que foi definida como a interrupção do teste porque os animais não conseguiam mais acompanhar a velocidade da esteira rolante. O teste de esforço em esteira rolante foi realizado nos grupos WTc, WTt,  $\beta_1$ ARKOc e  $\beta_1$ ARKOt antes e depois do período de treinamento físico.

### Isolamento do cardiomiócito

Após 48 horas da última sessão de treinamento físico, os camundongos foram pesados e sacrificados por decapitação, sendo seus corações removidos rapidamente. Os miócitos do VE foram enzimaticamente isolados como descrito.<sup>19</sup> Resumidamente, os corações foram montados em um sistema Langendorff e perfundidos com solução HEPES-Tyrode sem cálcio por 6 minutos com a seguinte composição (em mM): 130 NaCl, 1,43 MgCl<sub>2</sub>, 5,4 KCl, 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,75 CaCl<sub>2</sub>, 25 HEPES, 22 glicose, 0,01  $\mu$ g/ml insulina, 0,1 EGTA, pH 7,4, a 37°C. Em seguida, os corações foram perfundidos por 7-10 minutos com uma solução contendo 1 mg/ml de colagenase tipo II (Worthington, EUA) e CaCl<sub>2</sub> (0,8  $\mu$ M). O coração digerido foi então removido do aparelho de perfusão, sendo o coração e o VE cuidadosamente pesados. O VE foi cortado em pequenos pedaços e colocado em

frascos cônicos com solução contendo colagenase. As células foram dispersadas ao se agitarem os frascos por períodos de 3 minutos a 37°C. As células isoladas foram separadas do tecido não dispersado por filtração. A suspensão de células resultante foi centrifugada e novamente suspensa em solução HEPES-Tyrode contendo  $\text{CaCl}_2$  (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , subseqüentemente). As células isoladas foram armazenadas em solução HEPES-Tyrode contendo 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  em temperatura ambiente até o uso. Estudaram-se apenas os cardiomiócitos tolerantes ao cálcio, quiescentes, em forma de bastão e com estriações transversais nítidas. Os cardiomiócitos isolados foram usados em até 2-3 horas de isolamento.

### Medida da contratilidade celular

A contratilidade celular foi avaliada como já descrito.<sup>20</sup> Resumidamente, as células isoladas foram colocadas em uma câmara com uma base de lamínula de vidro montada em uma platina de microscópio invertido (Nikon Eclipse, TS100). A câmara foi perfundida com solução HEPES-Tyrode contendo 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  a 37°C. Contrações de 1 Hz estáveis foram provocadas com eletrodos de platina em banho (Myopacer, Field Stimulator, IonOptix) com pulsos de voltagem de 5ms e intensidade de 40 V. As células foram visualizadas em um monitor de computador com câmara NTSC (MyoCam, IonOptix) em modo de *scanning* parcial. A imagem foi usada para medir o encurtamento celular (nosso índice de contratilidade) em resposta à estimulação elétrica usando um detector de borda de movimento com vídeo (IonWizard, IonOptix). A imagem da célula foi obtida a 240 Hz. Calculou-se o encurtamento celular a partir do *output* do detector de borda usando um conversor A/D (IonOptix, Milton, MA). O encurtamento celular, expresso como porcentagem do comprimento celular em repouso, e as velocidades de encurtamento e relaxamento foram calculados.

### Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov, quando apropriado. Usou-se o teste *t* pareado para comparar o PC inicial e final em cada grupo. As comparações entre os grupos dos valores de PC, de peso do coração (PCo), de peso do VE (PVE) e das razões entre esses pesos, assim como da contração celular, foram feitas usando ANOVA de duas vias seguida de teste

de Tukey com o programa SigmaPlot®, versão 12.5 (Systat Software, San Jose, CA). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. Adotou-se o nível de significância estatística de 5%. Os números de camundongos, corações e miócitos usados são apresentados nas figuras e tabela.

## Resultados

A Tabela 1 mostra o PC e o PVE. O PC inicial dos animais  $\beta_1$ ARKO foi mais alto do que os dos respectivos animais WT controle. Como esperado, o PC final de cada grupo foi mais alto do que os respectivos PC iniciais. O PC final foi mais alto ( $p < 0,05$ ) nos camundongos  $\beta_1$ ARKO ( $\beta_1$ ARKOc +  $\beta_1$ ARKOt) em comparação ao dos WT (WTc + WTt). Entretanto, o PC final não foi afetado ( $p > 0,05$ ) pelo EACM. Da mesma forma, o PCo foi mais alto nos camundongos  $\beta_1$ ARKO do que nos WT, mas não se observou nenhum efeito do EACM ( $p > 0,05$ ). Com relação ao PVE, camundongos  $\beta_1$ ARKO apresentaram valores mais altos do que os WT; entretanto, não se observou qualquer efeito do EACM ( $p > 0,05$ ). Quanto às razões, camundongos  $\beta_1$ ARKO exibiram uma razão entre PCo e PC mais alta do que camundongos WT. Entretanto, isso não foi afetado pelo EACM ( $p > 0,05$ ). A razão entre PVE e PC foi mais alta em camundongos  $\beta_1$ ARKO do que em camundongos WT, mas sem efeito do EACM.

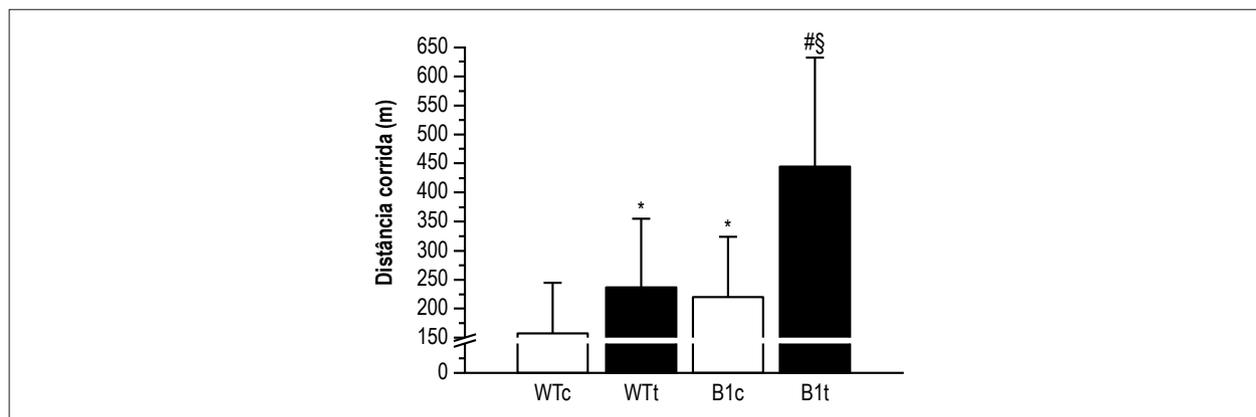
A Figura 1 mostra a capacidade física. Os animais  $\beta_1$ ARKO ( $\beta_1$ ARKOc +  $\beta_1$ ARKOt) correram uma distância maior do que os animais WT (WTc + WTt). Além disso, os animais treinados correram uma distância maior do que seus respectivos controles.

As propriedades contráteis de um único miócito de VE são mostradas na Figura 2. Os miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKO ( $\beta_1$ ARKOc +  $\beta_1$ ARKOt) apresentaram maior amplitude de encurtamento do que os dos WT (WTc + WTt). A amplitude de encurtamento dos miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKOt foi maior do que a dos  $\beta_1$ ARKOc e WTt, e a amplitude de encurtamento dos miócitos de camundongos WTc foi maior do que a dos WTt (Figura 2A). Com relação ao tempo de contração, os miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKOc exibiram maior velocidade de encurtamento do que os de camundongos WTc. Além disso, os miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKOt apresentaram maior velocidade de encurtamento do que os de camundongos  $\beta_1$ ARKOc e WTt (Figura 2B). Quanto à velocidade de relaxamento, os miócitos

**Tabela 1 – Pesos corporal e do ventrículo esquerdo em camundongos WT e  $\beta_1$ ARKO**

	WTc (n = 7)	WTt (n = 6)	$\beta_1$ ARKOc (n = 7)	$\beta_1$ ARKOt (n = 6)
PC inicial, g	27,43 $\pm$ 2,46	26,50 $\pm$ 2,45	33,86 $\pm$ 2,46	32,67 $\pm$ 2,23
PC final, g	29,86 $\pm$ 2,64*	28,67 $\pm$ 2,64*	37,14 $\pm$ 2,64*	34,33 $\pm$ 2,55*
PCo, mg	231,00 $\pm$ 37,57	226,00 $\pm$ 37,48	302,00 $\pm$ 37,57	317,00 $\pm$ 37,48
PVE, mg	146,00 $\pm$ 20,82	141,00 $\pm$ 20,82	184,00 $\pm$ 20,82	194,00 $\pm$ 20,82
PCo/PC, mg/g	7,73 $\pm$ 0,85	7,86 $\pm$ 0,86	8,12 $\pm$ 0,85	9,22 $\pm$ 0,86
PVE/PC, mg/g	4,89 $\pm$ 0,48	4,94 $\pm$ 0,49	4,96 $\pm$ 0,48	5,66 $\pm$ 0,49

Valores expressos como médias  $\pm$  DP; WTc: wild-type controle; WTt: wild-type treinado;  $\beta_1$ ARKOc: nocaute para  $\beta_1$ -AR controle;  $\beta_1$ ARKOt: nocaute para  $\beta_1$ -AR treinado; PC: peso corporal; PCo: peso do coração; PVE: peso do ventrículo esquerdo; N: número de animais; \* $p < 0,05$  vs. PC inicial dentro do mesmo grupo. Diferenças estatísticas foram determinadas por teste *t* pareado.



**Figura 1** – Distância total corrida. Valores expressos em médias  $\pm$  desvio-padrão de oito camundongos em cada grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo WTc; # $p < 0,05$  vs. grupo WTt; § $p < 0,05$  vs. grupo  $\beta_1$ ARKOc.

de camundongos  $\beta_1$ ARKOc mostraram valores maiores do que os de WTc. Além disso, os miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKOt apresentaram maior velocidade de relaxamento do que os de camundongos  $\beta_1$ ARKOc e WTt (Figura 2C).

## Discussão

Este estudo testou os efeitos do EACM nas propriedades mecânicas dos miócitos do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO. O principal achado foi que o EACM aumentou a amplitude de encurtamento e as velocidades de encurtamento e relaxamento nos miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKO.

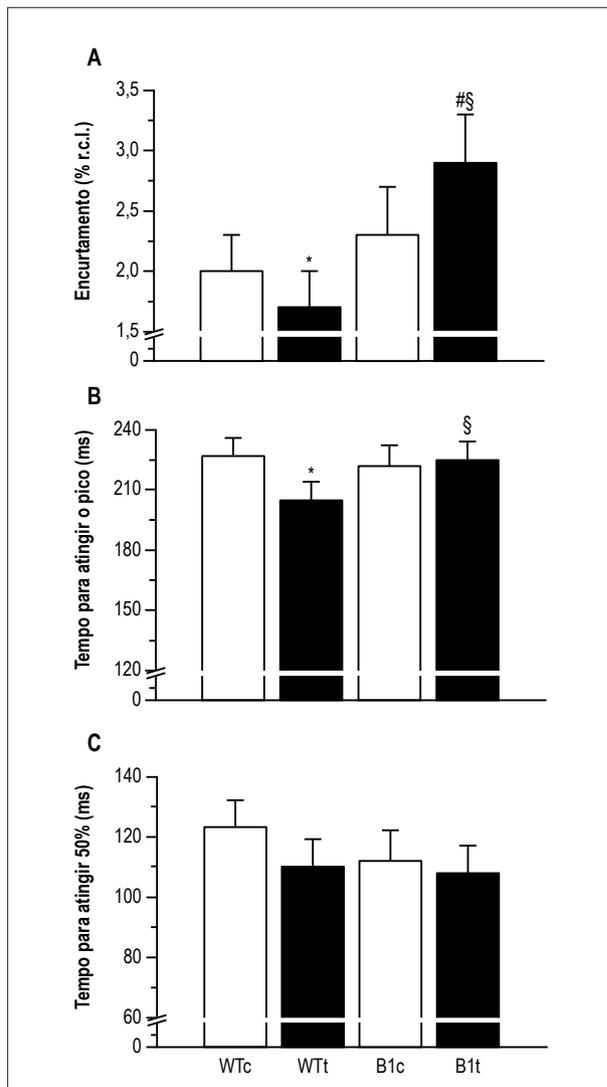
Os PCs inicial e final foram mais altos em camundongos  $\beta_1$ ARKO do que nos WT. Resultados semelhantes foram relatados.<sup>21</sup> A ativação de  $\beta$ -AR no tecido adiposo leva à produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que ativa a proteína quinase A (PKA) e estimula a lipólise. Embora o  $\beta_3$ -AR seja o receptor predominante no tecido adiposo de roedores, os camundongos com superexpressão de  $\beta_1$ -AR exibem aumento da atividade lipolítica de adipócitos.<sup>22</sup> Portanto, camundongos  $\beta_1$ ARKO podem apresentar diminuição da lipólise, que influenciaria a quantidade de gordura corporal e, conseqüentemente, o PC.<sup>23</sup> Entretanto, no nosso estudo, o EACM não afetou o PC final. Quanto ao PCo, camundongos  $\beta_1$ ARKO apresentaram corações e VEs mais pesados do que os camundongos WT, assim como razões entre PCo e PC e entre PVE e PC mais altas. Entretanto, no nosso estudo, o EACM não modificou esses parâmetros cardíacos. Hipertrofia cardíaca induzida por exercício em camundongos WT já foi demonstrada;<sup>24-26</sup> entretanto, em camundongos  $\beta_1$ ARKO, até onde sabemos, não há relato.

Observamos que os camundongos treinados (WTt e  $\beta_1$ ARKOt) correram uma maior distância total do que seus respectivos controles (WTc e  $\beta_1$ ARKOc). Esse aumento induzido por EACM pode estar associado a adaptações cardiovasculares, que são características conhecidas do treinamento aeróbico.<sup>27</sup> Estudos prévios usando o mesmo protocolo de treinamento aeróbico relataram maior capacidade de exercício em animais treinados.<sup>8,17</sup>

Especificamente, os grupos  $\beta_1$ ARKO correram uma distância total maior do que os grupos WT. Sabe-se que a ativação simpática durante exercício aeróbico promove glicogenólise pela via dos  $\beta$ -AR.<sup>28,29</sup> Provavelmente, os camundongos  $\beta_1$ ARKO têm mecanismos compensatórios no músculo esquelético, como vias de sinalização adrenérgica  $\beta_2$  e  $\alpha_1$  modificadas, que poderiam melhorar glicogenólise, gliconeogênese, captação de glicose independente de insulina e lipólise no músculo esquelético.<sup>30</sup> Tais mecanismos compensatórios podem ter levado à melhora no desempenho do exercício nos camundongos  $\beta_1$ ARKO. Entretanto, ainda que esse não seja o foco deste estudo, investigações adicionais são necessárias para testar a hipótese de que camundongos  $\beta_1$ ARKO melhoram seu desempenho do exercício quando se alteram as vias de sinalização adrenérgica  $\beta_2$  e  $\alpha_1$ .

Embora os miócitos dos camundongos  $\beta_1$ ARKO tivessem maior amplitude de encurtamento do que os dos camundongos WT, um efeito de fator independente, os miócitos do VE dos grupos  $\beta_1$ ARKOc e WTc apresentaram propriedades contráteis similares. Embora o  $\beta_1$ -AR seja o subtipo predominante de receptor adrenérgico expresso no coração em termos de densidade e modulação da contração cardíaca,<sup>31,32</sup> sua deleção teve pouco impacto na função cardíaca de repouso, mas apresentou efeitos significativos na função cardíaca após estimulação  $\beta$ -agonista.<sup>33</sup> Outros estudos não observaram alterações na contratilidade do cardiomiócito quando da perda de  $\beta_1$ -AR<sup>34</sup> ou  $\beta_{1/2}$ -AR em condições basais.<sup>35</sup> Portanto, a semelhança entre os grupos  $\beta_1$ ARKOc e WTc sugere que os  $\beta_1$ -AR tenham pouco impacto nas propriedades contráteis de cardiomiócitos em condições basais.

É importante notar que o programa de EACM aumentou a amplitude de encurtamento dos miócitos do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO. O EACM pode ter desencadeado dois mecanismos compensatórios no coração dos camundongos  $\beta_1$ ARKO. Primeiro, um aumento na sinalização  $\alpha_1$ -AR é comum em situações de dessensibilização  $\beta_1$ -AR quando a redução da sinalização  $\beta_1$ -adrenérgica é compensada por uma elevação na via de sinalização  $\alpha_1$ -adrenérgica,



**Figura 2** – Contratilidade celular. A) Encurtamento. B) Velocidade de encurtamento. C) Velocidade de relaxamento. WTc, wild-type controle ( $n = 7$ ;  $N = 14-39$  células de cada camundongo); WTt, wild-type treinado ( $n = 6$ ;  $N = 8-27$  células de cada camundongo);  $\beta_1$ ARKOc, nocaute para  $\beta_1$ -AR controle ( $n = 7$ ;  $N = 24-31$  células de cada camundongo);  $\beta_1$ ARKOt, nocaute para  $\beta_1$ -AR treinado ( $n = 6$ ;  $N = 17-29$  células de cada camundongo). Valores expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. \* $p < 0,05$  vs. grupo WTc; § $p < 0,05$  vs. grupo WTt; # $p < 0,05$  vs. grupo  $\beta_1$ ARKOc.

que poderia ajudar a preservar a função cardíaca.<sup>36</sup> Ainda que não avaliado aqui, um aumento da responsividade inotrópica dos cardiomiócitos de ratos através de estimulação  $\alpha_1$ -AR foi descoberto como uma adaptação ao treinamento aeróbico.<sup>37,38</sup> Além disso, o potencial papel terapêutico de  $\alpha_1$ -AR para manter a função cardíaca normal, especialmente em termos de comprometimento da via de sinalização  $\beta_1$ -adrenérgica, foi proposto em estudos prévios.<sup>37-40</sup> Segundo, o EACM pode ter reduzido a responsividade dos  $\beta_2$ -AR nos miócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKO. Quando há redução da ligação de  $\beta_2$ -AR com a proteína  $G_i$ , o efeito inibitório do receptor para a ativação da adenilato ciclase também é reduzido,<sup>5</sup> aumentando a produção de AMPc e a fosforilação das proteínas envolvidas na excitação-contracção do cardiomiócito.<sup>6</sup>

Os tempos de contracção e relaxamento do miócito do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO foram também melhorados pelo EACM, indicando melhores funções sistólica e diastólica. As proteínas reguladoras do  $Ca^{2+}$  modulam as propriedades mecânicas do cardiomiócito. Enquanto a contracção mais rápida do miócito está associada com maior densidade ou atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L e  $RyR_2$ , relaxamento mais rápido depende do aumento de atividade e/ou densidade de SERCA2a, PLB e NCX.<sup>6</sup> Ainda que não medido no presente estudo, o EACM pode ter melhorado o saldo das proteínas envolvidas na mobilização do  $Ca^{2+}$  cardíaco em camundongos  $\beta_1$ ARKO. Tais adaptações foram demonstradas anteriormente em um modelo diferente para hiperatividade simpática.<sup>8,16</sup> Além disso, treinamento físico de resistência pode ter reduzido a razão  $\beta/\alpha$ -MHC,<sup>20</sup> que ajudaria a explicar o aumento das velocidades de contracção e relaxamento dos miócitos do VE.

Recentemente, o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) surgiu como um método que traz significativos benefícios para a função cardíaca. Por exemplo, camundongos submetidos ao HIIT apresentaram maior função contrátil do cardiomiócito ao aumentar a expressão e a atividade das proteínas reguladoras do ciclo do cálcio, em comparação àqueles submetidos ao EACM.<sup>41-43</sup> É, portanto, possível que cardiomiócitos de camundongos  $\beta_1$ ARKO sejam mais responsivos ao HIIT. No presente estudo, entretanto, escolhemos o EACM, pois seus efeitos sobre a contratilidade de cardiomiócito isolado em camundongos  $\beta_1$ ARKO não são conhecidos. Acreditamos que estudos futuros usando HIIT obterão achados interessantes nesse modelo animal.

Este estudo tem limitações. Primeiro, usamos camundongos com nocaute global e podem ter ocorrido alterações sistêmicas que confundam os efeitos do exercício; tais resultados, portanto, têm que ser interpretados com cautela. Segundo, embora os animais WTt tenham melhorado sua capacidade de exercício, inesperadamente seus miócitos do VE apresentaram menor encurtamento do que os dos camundongos WTc. Tal achado é intrigante, e, infelizmente, não podemos explicá-lo.

## Conclusão

O treinamento com EACM melhora a contratilidade do miócito do VE de camundongos  $\beta_1$ ARKO. Tal achado tem potenciais implicações clínicas e confirma o valor terapêutico desse tipo de treinamento físico para o tratamento de doenças cardíacas envolvendo dessensibilização ou redução de  $\beta_1$ -AR.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Rodrigues AC, Natali AJ, Brum PC, Prímola-Gomes TN; Obtenção de dados: Rodrigues AC, Cunha DNQ, Costa AJLD, Moura AG; Análise e interpretação dos dados: Rodrigues AC, Natali AJ, Carneiro-Júnior MA, Prímola-Gomes TN; Análise estatística: Rodrigues AC, Félix LB; Redação do manuscrito: Rodrigues AC, Natali AJ, Prímola-Gomes TN; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Natali AJ, Prímola-Gomes TN.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq, Fapemig, Capes e Fapesp.

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Aurora Corrêa Rodrigues pela Universidade Federal de Viçosa.

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa sob o número de protocolo #59/2012.

## Referências

- Barretto AC, Santos AC, Munhoz R, Rondon MU, Franco FG, Trombetta IC, et al. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients. *Int J Cardiol.* 2009;135(3):302-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.03.056.
- Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail.* 2013 Feb;1(1):1-20. doi: 10.1016/j.jchf.2012.10.002.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982;307(4):205-11. doi: 10.1056/NEJM198207223070401.
- Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz.* 2002;27(7):683-90. doi: 10.1007/s00059-002-2434-z.
- Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science.* 2003;300(5625):1530-2. doi: 10.1126/science.1079206.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205. doi: 10.1038/415198a.
- Kubalova Z, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Nishijima Y, Gyorke I, Terentyeva R, et al. Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):14104-9. doi: 10.1073/pnas.0504298102.
- Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007;29(3):246-52. doi: 10.1152/physiolgenomics.00188.2006.
- Gielen S, Laughlin MH, O'Conner C, Duncker DJ. Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015;57(4):347-55. doi: 10.1016/j.pcad.2014.10.001.
- O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;301(14):1439-50. doi: 10.1001/jama.2009.454.
- Roveda F, Middlekauff HR, Rondon MU, Reis SF, Souza M, Nastari L, et al. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(5):854-60. PMID: 12957432.
- Ichige MH, Santos CR, Jordao CP, Ceroni A, Negrao CE, Michelini LC. Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. *J Physiol.* 2016;594(21):6241-54. doi: 10.1113/jp272730.
- Negrao CE, Middlekauff HR, Gomes-Santos IL, Antunes-Correa LM. Effects of exercise training on neurovascular control and skeletal myopathy in systolic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(8):H792-802. doi: 10.1152/ajpheart.00830.2014
- Erbs S, Linke A, Gielen S, Fiehn E, Walther C, Yu J, et al. Exercise training in patients with severe chronic heart failure: impact on left ventricular performance and cardiac size. A retrospective analysis of the Leipzig Heart Failure Training Trial. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2003 Oct;10(5):336-44. doi: 10.1097/01.hjr.0000099031.38268.27.
- Freimark D, Adler Y, Feinberg MS, Regev T, Rotstein Z, Eldar M, et al. Impact of left ventricular filling properties on the benefit of exercise training in patients with advanced chronic heart failure secondary to ischemic or nonischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2005;95(1):136-40. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.08.081.
- Medeiros A, Rolim NP, Oliveira RS, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, et al. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol (1985).* 2008 Jan;104(1):103-9. doi: 10.1152/jappphysiol.00493.2007.
- Vanzelli AS, Medeiros A, Rolim N, Bartholomeu JB, Cunha TF, Bechara LR, et al. Integrative effect of carvedilol and aerobic exercise training therapies on improving cardiac contractility and remodeling in heart failure mice. *PLoS One.* 2013;8(5):e62452. doi: 10.1371/journal.pone.0062452.
- Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(8):760-5. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.
- Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol.* 2001;204(Pt 6):1191-9. PMID: 11222134.
- Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Apr;57:119-28. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.013.
- Ueta CB, Fernandes GW, Capelo LP, Fonseca TL, Maculan FD, Gouveia CH, et al. beta(1) Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *J Endocrinol.* 2012;214(3):359-65. doi: 10.1530/JOE-12-0155.
- Soloveva V, Graves RA, Rasenick MM, Spiegelman BM, Ross SR. Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol Endocrinol.* 1997;11(1):27-38. doi: 10.1210/mend.11.1.9870.
- Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res.* 1993;34(7):1057-91. PMID: 8371057.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol (1985).* 2001;90(5):1900-8. PMID: 11299284.
- Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):H1167-73. PMID: 8092282.

26. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(4):1301-9. doi: 10.1152/jappphysiol.00231.2002.
27. Moore RL, Korzick DH. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;37(6):371-96. PMID: 7777668.
28. Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16694-700. PMID: 10358008.
29. Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16701-8. PMID: 10358009.
30. Boyda HN, Procyshyn RM, Pang CC, Barr AM. Peripheral adrenoceptors: the impetus behind glucose dysregulation and insulin resistance. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(3):217-28. doi: 10.1111/jne.12002.
31. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*. 1986;59(3):297-309. PMID: 2876788.
32. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1607-12. doi: 10.1073/pnas.98.4.1607.
33. Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP Jr, Barsh GS, et al. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14):7375-80. PMID: 8693001.
34. Zhu WZ, Chakir K, Zhang S, Yang D, Lavoie C, Bouvier M, et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ Res*. 2005;97(3):244-51. doi: 10.1161/01.RES.0000176764.38934.86
35. Zhou YY, Yang D, Zhu WZ, Zhang SJ, Wang DJ, Rohrer DK, et al. Spontaneous activation of beta(2)- but not beta(1)-adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from beta(1)beta(2) double knockout mice. *Mol Pharmacol*. 2000;58(5):887-94. PMID: 11040034.
36. O'Connell TD, Jensen BC, Baker AJ, Simpson PC. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol Rev*. 2014;66(1):308-33. doi: 10.1124/pr.112.007203.
37. Korzick DH, Hunter JC, McDowell MK, Delp MD, Tickerhoof MM, Carson LD. Chronic exercise improves myocardial inotropic reserve capacity through alpha1-adrenergic and protein kinase C-dependent effects in Senescent rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(11):1089-98. PMID: 15602054.
38. Korzick DH, Moore RL. Chronic exercise enhances cardiac alpha 1-adrenergic inotropic responsiveness in rats with mild hypertension. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 2):H2599-608. PMID: 8997321.
39. Beaulieu M, Brakier-Gingras L, Bouvier M. Upregulation of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor mRNAs in the heart of cardiomyopathic hamsters. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(1):111-9. doi: 10.1006/jmcc.1996.0256.
40. Milligan G, Svoboda P, Brown CM. Why are there so many adrenoceptor subtypes? *Biochem Pharmacol*. 1994;48(6):1059-71. PMID: 7945399.
41. Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, et al. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*. 2005;67(1):161-72. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.03.010.
42. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Sep;43(3):354-61. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.013.
43. Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL, Wisloff U. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008 Apr;15(2):145-8. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282efd4e0.

