



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Papel das espécies reativas do oxigênio na hipertrofia
cardíaca fisiológica induzida pelo exercício.***

Aluna: Carolina Rodrigues Cohen

Orientadora: Prof. Dr^a Andréia Biolo

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Paim Rohde

Porto Alegre, 06 de Outubro de 2011.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele eu nada seria.

*Aos meus pais, Jaques e Rita,
pelo exemplo, amor incondicional, compreensão e dedicação.*

*Aos meus irmãos, Alexandre, André, Maurício e meu namorado Gustavo
pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão.*

*Aos Professores Rohde, Nadine e Andréia
pela orientação, confiança e
pelo apoio intelectual e científico.*

*À Kátia,
por ser minha professora e amiga,
por querer de mim sempre o melhor e
por me ensinar muito mais do que ciência.*

*Ao Michael,
pela amizade, ensino e exemplo profissional.
A tua participação nesse trabalho foi essencial.*

*À Nidiane,
por todos os anos de amizade e de parceria,
por tornar meus dias mais alegres.
Sem a tua participação esse projeto não teria se tornado realidade.*

*Às amigas Daiane e Stéfanie,
pela amizade, carinho e preocupação.*

*Aos meus queridos colegas de laboratório,
pela companhia agradável e por mostrarem-se sempre dispostos a ajudar.*

*À UFRGS, ao HCPA e aos professores do PPG Cardio
pela estrutura e conhecimento que proporcionaram.*

*Às Unidades de Experimentação Animal e de Análise Moleculares e de Proteínas
pelo apoio fundamental em toda a realização deste projeto.*

*Ao apoio financeiro do CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA,
por tornar realidade este e tantos outros projetos.*

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
1. INTRODUÇÃO.....	1
HIPERTROFIA CARDÍACA.....	1
HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO.....	4
HIPERTROFIA CARDÍACA E ANGIOGÊNESE.....	5
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO.....	9
ANTIOXIDANTES.....	11
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E A SINALIZAÇÃO CELULAR.....	14
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO, ANGIOGÊNESE E HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA.....	15
EXERCÍCIO E HIPERTROFIA FISIOLÓGICA: O PAPEL DAS EROS E SEU BLOQUEIO.....	17
2. HIPÓTESE.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
<i>3.1. OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>21</i>
<i>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>21</i>
4. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	22
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	29
6. CONCLUSÕES.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.

Figura 2 – Modelo ilustrando as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica e patológica.

Figura 3 – Representação da ativação e inativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e normóxia.

Figura 4 – Esquema da geração de espécies reativas do oxigênio a partir da redução do oxigênio.

Figura 5 – Reações de Fenton e de Haber-Weiss.

Figura 6 – Reações das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase.

Figura 7 – Estrutura dos compostos formadores da vitamina E.

Figura 8 – Esquema das fontes, defesas e funções das EROs em altos e baixos níveis.

Figura 9 – Possíveis mecanismos de ativação do HIF-1 α pelas EROs.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB: Proteína quinase B
Ang II: Angiotensina II
AP-1: Proteína ativadora-1
ATP: Adenosina trifosfato
CAT: Catalase
DNA: Ácido desoxirribonucléico
ERK1/2: Cinase reguladora do sinal extracelular
EROs: Espécies reativas do oxigênio
ET-1: Endotelina 1
FIH: Fator inibidor da HIF
GSH: Glutathiona reduzida
GPx: Glutathiona peroxidase
HIF: Fator de transcrição induzível por hipóxia
IAM: Infarto agudo do miocárdio
IGF: Fator de crescimento insulínico
mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NF-κB: Fator nuclear κB
p38: Proteína 38 tirosina cinase ativada por mitógenos
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1: Cinase piruvato desidrogenase
PHD: Enzima prolil-hidroxilase
PI3K: Fosfoinositol-3-cinase
PTEN: Proteína homóloga a fosfatase e tensina
SOD: Superóxido dismutase
SP-1: *Specificity protein 1*
VD: Ventrículo direito
VE: Ventrículo esquerdo
VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular
VHL: Proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau

1. INTRODUÇÃO

Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca é definida como o aumento da massa cardíaca devido ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos. Este crescimento pode resultar de sobrecarga hemodinâmica, de pressão ou de volume impostas ao coração [1, 2]. Diversos estímulos mecânicos e neuro-humorais têm sido implicados, e diversas moléculas e rotas de sinalização interdependentes estão associadas ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca [3, 4].

A hipertrofia cardíaca é um dos mais importantes marcadores de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares. Tendo em vista que está associada a uma série de condições patológicas que afetam o aparelho cardiovascular, existe grande interesse no estudo de mecanismos celulares e subcelulares que controlam a expressão de genes que irão determinar o aumento da massa cardíaca em resposta à sobrecarga de trabalho [1, 2].

A hipertrofia pode ser dividida em dois tipos principais: a hipertrofia excêntrica e a concêntrica. A hipertrofia excêntrica tem como estímulo inicial uma sobrecarga de volume e é caracterizada por uma parede cardíaca delgada e dilatação ventricular (aumentando o diâmetro da câmara), onde ocorre a adição dos sarcômeros em série. A hipertrofia concêntrica é causada, geralmente, por uma sobrecarga de pressão, que leva a um espessamento da parede ventricular e gera a deposição de novos sarcômeros em paralelo, sem mudanças no diâmetro ventricular [1, 2].

A hipertrofia cardíaca também pode ser classificada como hipertrofia fisiológica ou patológica. A hipertrofia patológica apresenta padrão mais concêntrico, reprogramação de genes fetais, remodelamento da matriz extracelular, fibrose e disfunção cardíaca. Esta pode evoluir para um coração dilatado, apresentando fibrose extensa, morte de cardiomiócitos e insuficiência cardíaca. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca fisiológica, que resulta de um estímulo fisiológico, como o exercício, tem padrão mais excêntrico e se caracteriza por manter a função cardíaca normal ou até aumentada. Se for retirado o estímulo inicial o coração retorna ao padrão normal (Figura1) [5].

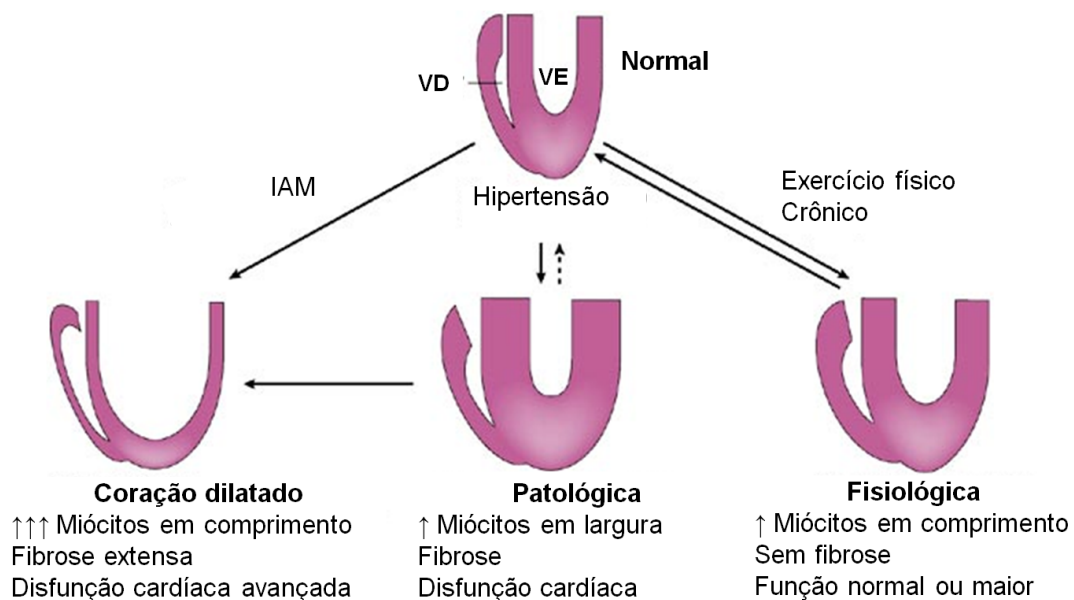


Figura 1. Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. (adaptado de Heineke, 2006). VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; IAM, infarto agudo do miocárdio.

Diversos estudos têm tentado demonstrar as diferenças bioquímicas e moleculares entre as hipertrofias fisiológica e patológica. De maneira geral, estímulos neuro-humorais como a angiotensina II (Ang II) e endotelina 1 (ET-1),

resultam na ativação da proteína G, através dos receptores Gαq que estão associados à hipertrofia patológica e progressão para insuficiência cardíaca [6-9]. Por outro lado, a ativação de fatores de crescimento como o fator de crescimento insulínico (IGF), que estimulam a ativação da proteína cinase B (PKB ou Akt) e fosfoinositol-3-cinase (PI3K), estão implicados em um crescimento fisiológico ou adaptativo [6, 7, 10, 11]. Ainda, há rotas comuns as duas hipertrofias como a calcineurina e ERK1/2 (cinase reguladora do sinal extracelular) que parecem ser ativadas tanto por estímulos patológicos como pelo exercício. A elucidação de cascatas de sinalização que podem ter papéis distintos nestas duas formas de hipertrofia é crítica para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o tratamento da insuficiência cardíaca (Figura 2).

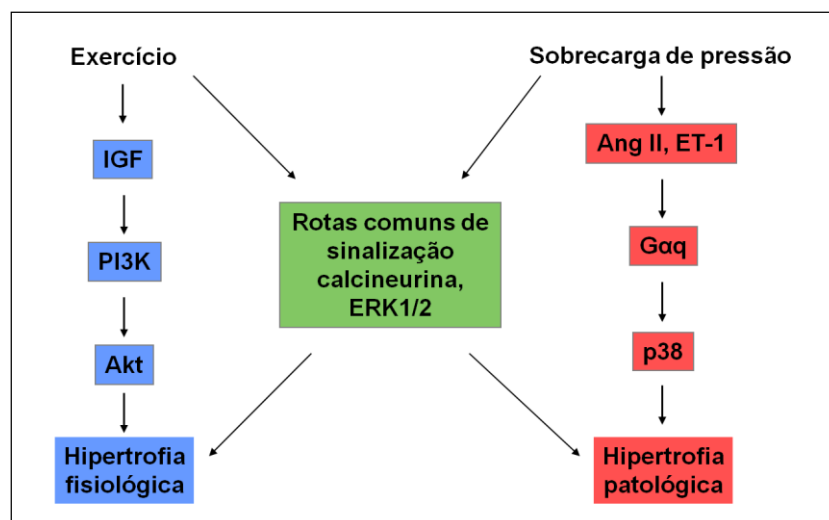


Figura 2. Modelo ilustrando as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica e patológica (adaptado de McMullen, 2003). IGF, fator de crescimento insulínico; PI3K, fosfoinositol-3-cinase; Akt, proteína cinase B; Ang II, angiotensina II; ET-1, endotelina-1; Gαq, receptor αq; p38, proteína 38 tirosina cinase ativada por mitógenos.

Hipertrofia Cardíaca Fisiológica Associada ao Exercício

A prática regular de exercícios físicos leva a uma série de adaptações fisiológicas no organismo que se instalam de forma gradual e variam conforme as características do treinamento. Entre as adaptações cardiovasculares se destaca a hipertrofia cardíaca fisiológica, que ocorre em resposta às alterações hemodinâmicas, que geram sobrecarga cardíaca durante as sessões de treinamento [11, 12].

O exercício físico é um estímulo já conhecido para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda. As alterações estruturais, resultantes do treinamento físico, dependem da natureza, duração e intensidade do exercício. As diversas modalidades esportivas têm sido classificadas, fundamentalmente, em dois grandes grupos: esportes de resistência, nos quais predominam as formas isotônicas ou dinâmicas do exercício, e esportes de força, nos quais predominam as formas isométricas ou estáticas do exercício. Entretanto, raramente o condicionamento atlético é puramente isotônico ou isométrico, e a maioria das atividades físicas envolve um componente dinâmico e estático, embora com predomínio de um deles [13]. A hipertrofia induzida pelo treinamento físico resulta em aumento de massa muscular em resposta à sobrecarga de trabalho. Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos [13, 14].

Diversos estudos têm utilizado modelos de exercício físico aeróbico em animais a fim de compreender os mecanismos da hipertrofia cardíaca

fisiológica [15]. Dentre esses protocolos, os mais utilizados são: exercício forçado em esteira, nado forçado e exercício voluntário em rodas de treinamento. Há diferentes protocolos de exercício em esteira que variam em duração, inclinação e velocidade. No entanto, alguns estudos têm falhado em demonstrar hipertrofia cardíaca com este modelo [16, 17]. Outro protocolo muito utilizado é o nado forçado, que tem demonstrado hipertrofia cardíaca em torno de 15% nos animais treinados [18]. Já o exercício em rodas de treinamento, apesar de ser voluntário, tem apresentado 12% a 20% de hipertrofia cardíaca em quatro semanas de treinamento [19, 20]. Além disso, este tipo de protocolo produz menos estresse para os animais e mimetiza o exercício em humanos [15].

Hipertrofia Cardíaca e Angiogênese

O crescimento dos cardiomiócitos e a angiogênese devem ocorrer de forma coordenada durante a hipertrofia, pois à medida que aumentam os cardiomiócitos precisa aumentar a disponibilidade de oxigênio e nutrientes [21, 22]. A hipertrofia cardíaca fisiológica está associada a uma densidade capilar aumentada, enquanto em modelos de hipertrofia patológica esta densidade está reduzida e têm sido implicada em disfunção contrátil e progressão para insuficiência cardíaca [22, 23]. Em um modelo de hipertrofia cardíaca induzida por aumento na expressão da proteína Akt, estímulos hipertróficos induziram a expressão de fatores angiogênicos na fase de hipertrofia adaptativa, e o bloqueio destes fatores resultou em redução na densidade capilar e acelerou a progressão para insuficiência cardíaca [24]. Desta forma, o balanço entre o crescimento de cardiomiócitos e angiogênese parece ser um dos

determinantes do quanto a hipertrofia cardíaca é fisiológica ou patológica.

O exercício físico é um estímulo mecânico e bioquímico à angiogênese. O aumento do fluxo sanguíneo e do estresse de cisalhamento, assim como, estímulos de crescimento e o aumento das necessidades energéticas do músculo estimulam a adaptação aguda do fluxo sanguíneo, principalmente por vasodilatação e formação de novos vasos [25]. O aumento no consumo de oxigênio e/ou diminuição da tensão tecidual de oxigênio (hipóxia) iniciam um vasto leque de respostas adaptativas, sistêmicas, locais e a nível celular, todas com o objetivo de restaurar a homeostase do oxigênio. As respostas celulares à hipóxia são mediadas pelos fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs).

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico com papel importante em rotas de sinalização que transmitem informações sobre os níveis celulares de oxigênio [26-29]. O HIF-1 é composto por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . O HIF-1 β é constitutivamente expresso e não é afetado pela hipóxia. O HIF-1 α é expressado principalmente pela ação do fator de transcrição Sp1 (*specificity protein 1*), porém existem na região promotora do gene sítios de ligação dos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora -1) e NF- κ B (fator nuclear κ B) [30, 31]. Em situações de normóxia o HIF-1 α é hidroxilado pelas enzimas prolil-hidroxilases (PHD). Essas enzimas têm sua atividade dependente de O₂ como substrato e do ferro (Fe⁺²), ascorbato e α -cetoglutarato como cofatores obrigatórios [30-34]. O processo de hidroxilação aumenta a afinidade do HIF-1 α pela proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL). A ligação do HIF-1 α hidroxilado com o VHL o marca para a degradação pelo proteossomo. Há ainda o fator inibidor da HIF (FIH) que regula a atividade da

HIF-1 α sob normóxia, hidroxilando o sítio de ligação do complexo co-ativador p300/CBP, impedindo assim sua ligação a HIF-1 α [26, 30]. Entretanto, em situações de hipóxia a PHD é inibida e o HIF-1 α se acumula e dimeriza com o HIF-1 β , recrutando o p300/CBP (Figura 3). Este complexo se liga ao DNA para desencadear a transcrição de mais de 100 genes de resposta à hipóxia, coordenando um amplo espectro de processos celulares e fisiológicos, incluindo angiogênese, eritropoiese, metabolismo energético, sobrevivência e proliferação celular [26, 27, 35]. Com relação à angiogênese, HIF-1 α regula a transcrição de fatores angiogênicos como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e seus receptores [27, 28]. Outro papel importante do HIF é estabelecer um balanço ótimo entre metabolismo glicolítico e oxidativo em qualquer concentração de oxigênio para maximizar a produção de ATP sem aumentar os níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs) [35, 36]. Desta forma, sob hipóxia o HIF-1 ativa a cinase piruvato desidrogenase (PDK1) o que causa inibição da atividade da enzima piruvato desidrogenase e diminuição da entrada de substrato no ciclo de Krebs. Assim, a célula sob hipóxia mantém a produção de ATP pela glicólise anaeróbica, preservando o oxigênio intracelular e diminuindo a produção de EROs [35-37].

Mesmo em situações de normóxia, fatores de crescimento como o IGF e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), citocinas e hormônios parecem ser capazes de induzir e/ou ativar a expressão do HIF-1 α , através da ativação da via PI3K. Esse mecanismo seria suficiente para desencadear a expressão de genes de resposta à hipóxia, apesar da PHD e FIH estarem ativas [30, 38, 39]. Desta forma, o HIF-1 α participaria de processos como hipertrofia cardíaca através, também, de estímulos de crescimento e não

apenas modulado pela hipóxia.

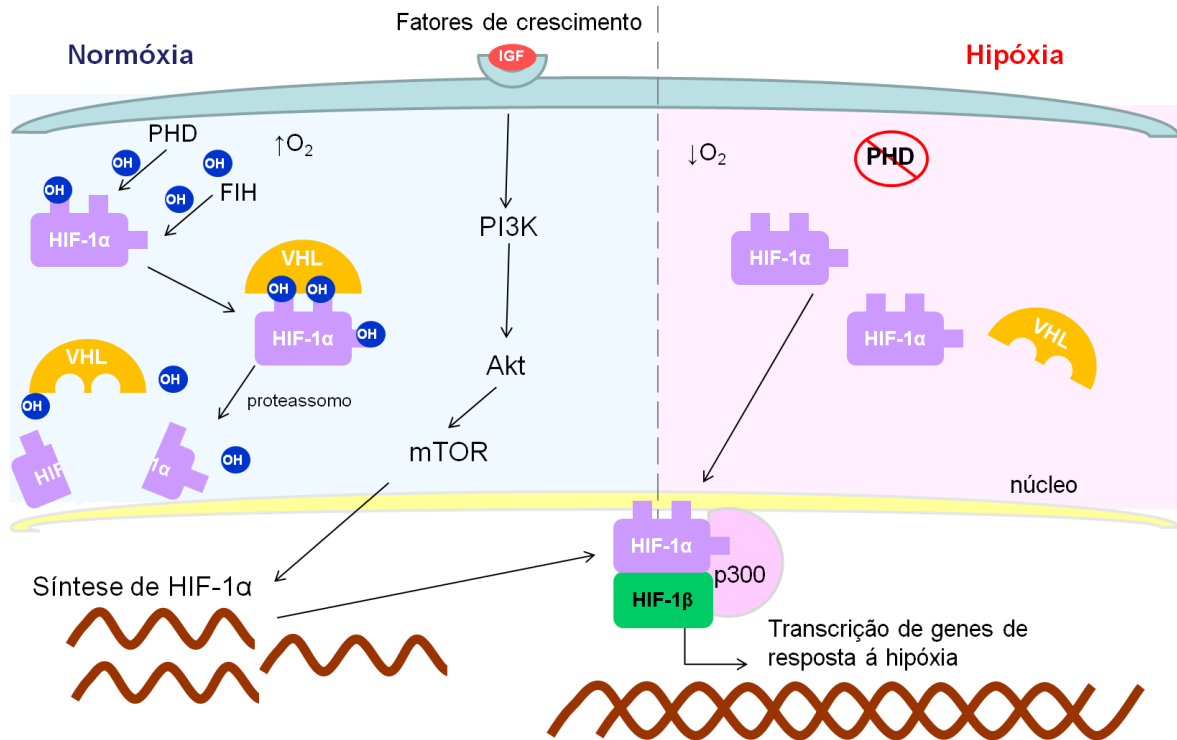


Figura 3 – Representação da ativação e inativação do HIF-1α em situações de hipóxia e normóxia. IGF, fator de crescimento insulínico; PHD, enzimas prolii-hidroxi-lases; VHL, proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau; FIH, fator inibidor da HIF; HIF, fator de transcrição induzível por hipóxia; PI3K, fosfoinositol-3-cinase; Akt, proteína cinase B; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; OH, representa a hidroxilação.

O HIF-1α parece ter papel fundamental na adaptação cardíaca a estímulos hipertróficos e na coordenação entre hipertrofia e angiogênese [22, 39-42]. A deleção cardiomiócito-específica do HIF-1α, em condições de normóxia, leva à alteração na expressão de vários genes envolvidos no controle do cálcio, na angiogênese e no metabolismo da glicose, com consequente redução da contratilidade cardíaca e vascularização [43]. Em um modelo de hipertrofia patológica por constrição aórtica, a hipertrofia inicial compensada foi acompanhada por neovascularização, a qual ocorreu através da estimulação HIF-1α-dependente de fatores angiogênicos [44]. Na transição para fase maladaptativa, a supressão do HIF-1α se associou à angiogênese

reduzida e disfunção sistólica, enquanto o bloqueio desta supressão atenuou a progressão para a fase descompensada [44]. Além disso, Marini e colaboradores (2008), utilizando um protocolo de treinamento em esteira com ratos, observou aumento na angiogênese e vascularização nos animais treinados após 10 semanas. Esse aumento na angiogênese foi acompanhado de um aumento na expressão de VEGF e HIF-1 α [45]. Desta forma, HIF-1 α parece ser crucial na sinalização entre o miocárdio e a vasculatura para permitir seu crescimento coordenado [46-48].

Espécies Reativas do Oxigênio

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, e por isso tornam-se extremamente reativos e capazes de atacar outras biomoléculas com o objetivo de se estabilizar. No processo de respiração celular, o oxigênio recebe quatro elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons, resultando sua redução até água. Porém, neste processo formam-se compostos intermediários que são bastante reativos (Figura 4). Esses compostos são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs). A formação das EROs ocorre em 2-5% do todo oxigênio que passa pelo processo de respiração celular na mitocôndria [49]. Situações como a hipóxia ou que aumentam o consumo de oxigênio, como o exercício físico, podem estar associadas ao aumento da produção de EROs [32, 37, 50, 51].

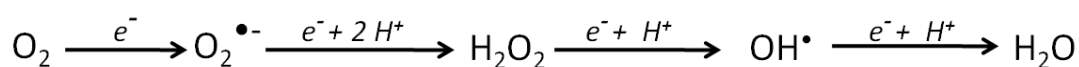
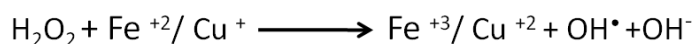


Figura 4 – Esquema da geração de espécies reativas do oxigênio a partir da redução do oxigênio. (adaptado de Halliwell 2007)

Entre as EROs pode-se destacar: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^\bullet) e os oxigênios “singlet” (estado excitado do oxigênio). Os oxigênios “singlet” são altamente reativos, causando danos às proteínas devido à oxidação de aminoácidos, em especial do triptofano, metionina, histidina e cisteína. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o radical mais comum e abundante na célula, sendo formado pela cadeia de transportadora de elétrons, por células fagocitárias e por reações de auto-oxidação. O radical superóxido é mais estável e tem meia-vida mais longa que o radical hidroxila. A enzima superóxido dismutase realiza a dismutação deste radical formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas é considerado uma ERO devido ao potencial de gerar o radical hidroxila (OH^\bullet), após reagir com metais de transição. Ainda, devido a sua baixa reatividade é capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas, agindo como sinalizador inter e intracelular. As reações de geração do radical hidroxila mediada pela interação metais- H_2O_2 foram descritas por Fenton e Haber-Weiss são apresentadas na Figura 5. O radical hidroxila, mesmo tendo uma meia-vida extremamente curta, é o mais potente das EROs, podendo reagir com praticamente todas as biomoléculas. Sua capacidade oxidante é superior a das demais EROs, porque o organismo não dispõe de sistemas enzimáticos de defesa contra este radical [49].

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss

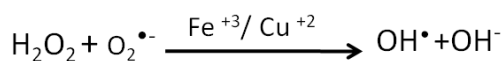


Figura 5 – Reações de Fenton e de Haber-Weiss (adaptado de Halliwell 2007).

Antioxidantes

O organismo humano possui um sistema de defesa antioxidante que evita o aumento excessivo das EROs e mantêm o equilíbrio redox. O sistema antioxidante é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e por compostos não-enzimáticos como as vitaminas A, C e E, e a glutathiona. As superóxidos dismutases são metaloenzimas que dismutam o radical superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio e constituem a primeira linha de defesa contra os radicais livres (Figura 6). Há três tipos de SOD: A SOD1, que usa cobre e zinco como cofatores, e está presente no citoplasma; a SOD2, que usa o manganês como cofator e é a isoforma presente na mitocôndria e, finalmente, a SOD3, que é uma isoforma encontrada no meio extracelular e que também usa cobre e zinco como cofatores. A catalase (CAT) é uma enzima que atua na conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Figura 6). A catalase está presente principalmente nos peroxissomos, por isso seus níveis de atividade podem variar nos diferentes tecidos [52]. Órgãos que contêm poucos peroxissomos, como coração e cérebro, têm menores níveis de catalase. Nesses órgãos, como um mecanismo de defesa, pode ocorrer a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue onde irá reagir com a catalase eritrocitária. A glutathiona peroxidase (GPx) reage com peróxidos, principalmente peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. Para redução dos peróxidos, a GPx utiliza como cofator a glutathiona reduzida (GSH). A GPx é capaz de oxidar a GSH e transformar a molécula do peróxido em álcool ou, no caso do peróxido de hidrogênio, em água (Figura 6) [49]. Condições fisiológicas e patológicas podem alterar a atividade dessas enzimas. Modelos de exercício físico em

ratos e camundongos demonstram o aumento da atividade da CAT e diminuição das enzimas SOD e GPx [53-55] .

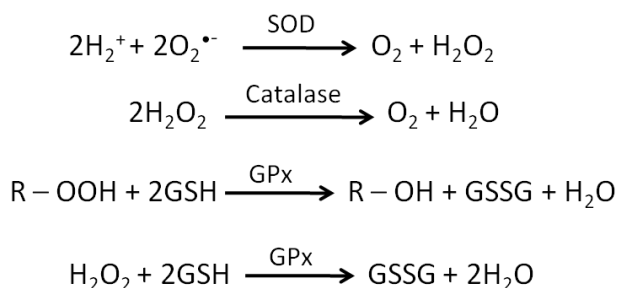


Figura 6 – Reações das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona redutase. (adaptado de Halliwell 2007).

O sistema antioxidante não-enzimático é formado por compostos lipofílicos, como os tocoferóis, carotenóides, flavonóides e os hidrofílicos, como a vitamina A, o ácido ascórbico, o ácido úrico. Dentre eles destaca-se a vitamina E que é constituída por uma mistura de tocoferóis e tocotrienóis que são sintetizadas pelas plantas. Todos são derivados de 6-cromanol com uma cadeia lateral alifática. Os tocoferóis são nomeados de acordo com a posição e o número de grupos metila no anel de fenol, como α , β , γ e δ (Figura 7). Estas diferenças estruturais determinam a atividade biológica, sendo o α -tocoferol o mais biologicamente ativo [56].

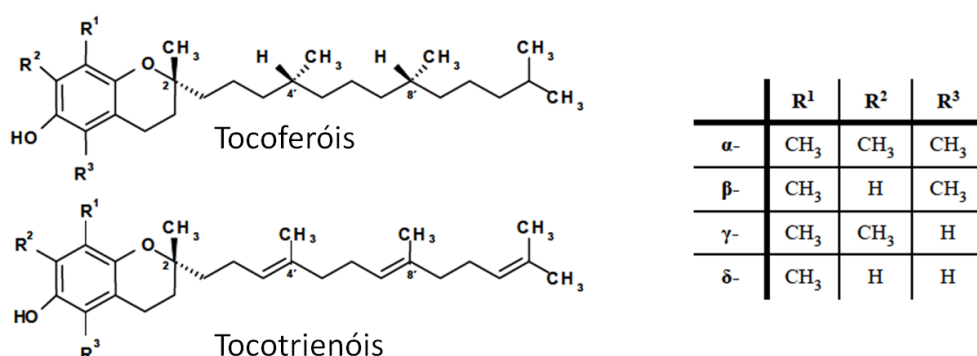


Figura 7 – Estrutura dos compostos formadores da vitamina E (adaptado de Rimbach 2010).

A vitamina E atua como *scavenger* (varredor) de radicais livres, pois possui em sua molécula um grupo hidroxila, do qual o átomo de hidrogênio é facilmente removido. Após sua atividade antioxidante, o α -tocoferol torna-se α -tocoferil, um radical livre de baixa reatividade que pode reagir com outros antioxidantes, como a vitamina C, para ser regenerada ao seu estado original [52]. A vitamina E preserva a integridade das membranas biológicas, estabiliza sua permeabilidade e fluidez e previne a apoptose induzida por estresse oxidativo. Além disso, o α -tocoferol é capaz de prender óxidos de nitrogênio na membrana solúvel eletrofílica e, assim, de forma eficiente inibir danos derivados de espécies reativas de nitrogênio [56].

O estresse oxidativo ocorre quando radicais livres são gerados além da capacidade antioxidante intrínseca. A geração excessiva de EROs desencadeia disfunção celular, peroxidação de lipídios, mutagênese de DNA e pode levar a danos celulares irreversíveis ou morte (Figura 8) [49].

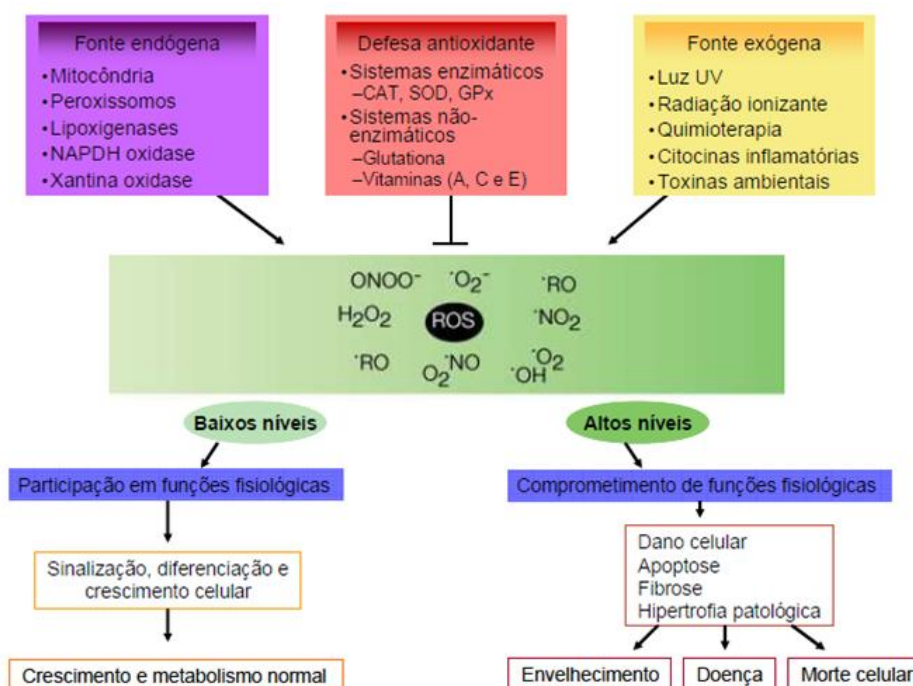


Figura 8 – Esquema das fontes, defesas e funções das EROs em altos e baixos níveis. (adaptado de Finkel 2000).

Espécies reativas do oxigênio e a sinalização celular

A geração de EROs é normal na fosforilação oxidativa, peroxissomos, retículo endoplasmático, leucócitos e endotélio. Em cada sítio as EROs desempenham papéis como: a defesa contra microorganismos invasores, metabolismos de aminoácidos, detoxificação de drogas e controle de rotas de sinalização [49]. Estudos têm demonstrado a participação das EROs em rotas de sinalização fisiológicas, estimulando fatores de transcrição e cinases sinalizadoras de hipertrofia cardíaca (Figura 8) [32, 51, 57]. As EROs parecem ter um papel importante como segundo mensageiro de estímulos principalmente dos fatores de crescimento IGF e PDGF e na modulação de fatores de transcrição como o fator nuclear κB (NF- κB) e a proteína ativadora-1 (AP-1) [51]. Um estudo demonstrou que ratos que recebiam vitamina E apresentaram uma diminuição da Akt fosforilada quando comparados ao grupo controle, sugerindo que o H_2O_2 é um possível mediador da ativação da via da Akt e PI3K [58]. Há evidências desta relação em um estudo com camundongos heterozigotos para o HIF-1 α (*Hif1a*^{+/-}) que passaram pelo pré-condicionamento de isquemia e reperfusão (PIR). Este trabalho observou que os animais *Hif1a*^{+/-} não aumentaram a produção de EROs mitocondrial, a inativação da proteína homóloga a fosfatase e tensina (PTEN) ou a fosforilação da Akt, diferentemente dos animais selvagens que tiveram todas essas respostas ao PIR. Esses dados sugerem que o HIF-1 α leva ao acúmulo de EROs que inativa a PTEN, um regulador negativo da via da Akt [40]. Além disso, a hipóxia aguda leva ao aumento da produção de EROs a partir da mitocôndria e isso pode ser necessário para inibir a prolil hidroxilase e acumular o HIF-1 α . Assim, as EROs participariam da ativação da via da HIF/ Akt [35, 36, 59, 60].

O potencial papel das EROs na hipertrofia mal adaptativa e na progressão para insuficiência cardíaca tem sido extensivamente estudado. Experimentos *in vitro* e modelos animais demonstraram a participação das EROs nas respostas celulares hipertróficas [61-67], bem como ativação e aumento do estresse oxidativo em resposta a estímulos patológicos e na presença de insuficiência cardíaca [68-74]. O estresse oxidativo participa do estímulo hipertrófico acoplado a proteína G por estimulação dos receptores da Ang II e α -adrenérgicos [8, 51, 72, 75]. O papel do estresse oxidativo na hipertrofia patológica e insuficiência cardíaca foi também demonstrado através do uso de antioxidantes e seu papel no remodelamento cardíaco e progressão para insuficiência cardíaca. Em diversos modelos experimentais de hipertrofia patológica, antioxidantes como vitamina E, n-acetilcisteína e estatinas (através de seu efeito antioxidante), ou mesmo a superexpressão geneticamente determinada de antioxidantes, reduziram hipertrofia cardíaca e/ou progressão para insuficiência cardíaca [76-78].

Espécies Reativas do Oxigênio, Angiogênese e Hipertrofia Cardíaca Fisiológica

A importância da participação das EROs em processos biológicos normais tem sido reconhecida nos últimos anos. As EROs parecem participar de processos celulares em uma maneira concentração-dependente, onde em baixas doses participaria de processos fisiológicos como sinalização de rotas hipertróficas, e em concentrações elevadas como um estímulo a rotas de toxicidade e morte celular [61, 66, 72]. Diversos estudos têm explorado a

inter-relação entre EROs e a ativação do HIF-1 α . As EROs parecem ser necessárias para a ativação de HIF-1 α tanto em resposta a hipóxia quanto em resposta a estímulos hipertróficos como IGF [36, 40, 60, 79-81]. Enquanto antioxidantes bloqueiam completamente a ativação de HIF-1 α insulino-estimulada, o peróxido de hidrogênio restabelece esta ativação, o que confirma o papel das EROs na sinalização do crescimento celular e angiogênese [79]. Da mesma forma, células tronco embrionárias utilizam EROs como sinalizadores para diferenciação celular induzida por estiramento mecânico, resultando em cardiogênese e vasculogênese coordenadas [82]. Neste processo, o bloqueio das EROs com o antioxidante vitamina E inibe o aumento na expressão de HIF-1 α e a angiogênese, mais uma vez demonstrando o papel das EROs como mecanotransdutoras do estímulo hipertrófico e como reguladoras da resposta coordenada de crescimento e angiogênese [82].

Os mecanismos envolvidos nesta possível interação EROs-HIF-1 α não estão estabelecidos, mas acredita-se que envolvam a inativação das PHDs [83]. As EROs inibiriam sua atividade por utilizar o Fe⁺² na reação de Fenton, que é um cofator obrigatório para a reação de hidroxilação do HIF-1 α [23, 32, 33, 84, 85]. Além disso, as EROs têm uma estreita relação com fatores de crescimento como o IGF. O estímulo do IGF desencadeia a ativação da via PI3K, mas também aumenta a produção de EROs. As EROs inibem a PTEN que é um conhecido inibidor da via do IGF/PI3K. Desta forma, as EROs podem ativar a HIF-1 α indiretamente a partir do estímulo do IGF (Figura 9) [32, 33, 35, 40, 79, 86, 87].

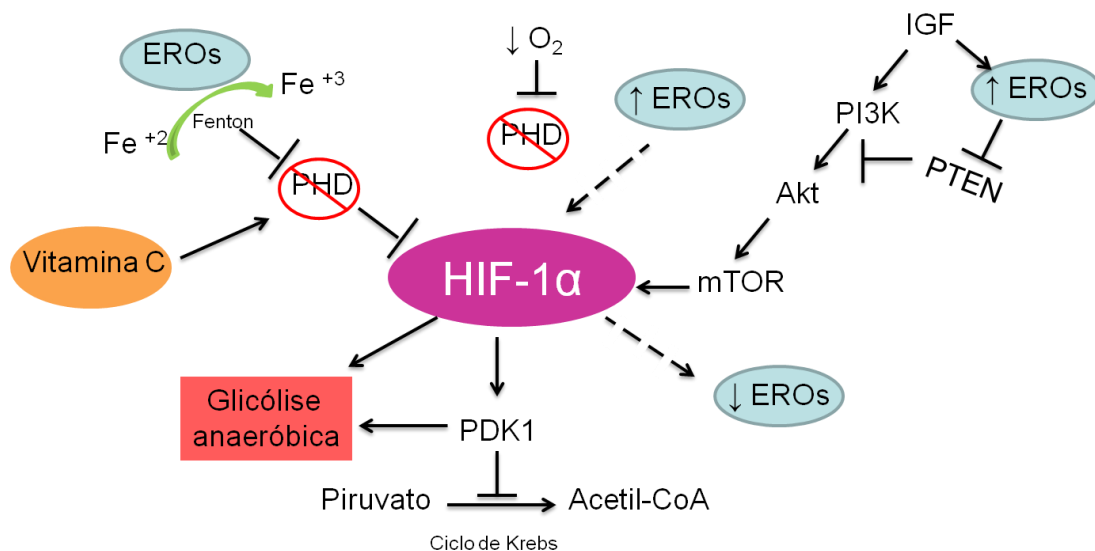


Figura 9 – Possíveis mecanismos de ativação do HIF-1 α pelas EROs. EROs, espécies reativas do oxigênio; PHD, enzimas prolil-hidroxilases; PDK1, cinase piruvato desidrogenase; IGF, fator de crescimento insulínico; HIF-1 α , fator de transcrição induzível por hipóxia 1 α ; PI3K, fosfoinositol-3-cinase; Akt, proteína cinase B; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; PTEN, proteína homóloga a fosfatase e tensina

Exercício e Hipertrofia Fisiológica: o Papel das EROs e seu Bloqueio

O exercício físico é um potencial gerador de EROs na musculatura esquelética e no coração. Devido á isso, diversos estudos têm avaliado as EROs e dano oxidativo em atletas e modelos animais de exercício. Enquanto alguns estudos têm associado o exercício á alterações e adaptações benéficas outros têm reforçado a hipótese inicial [88-91]. Essas respostas diferentes parecem ser devidas ao tipo e intensidade do treinamento, em que a alta carga de exercícios levaria a dano, enquanto exercícios moderados seriam benéficos [91, 92]. Desta forma, o exercício moderado tem sido associado ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, assim como a diminuição de marcadores de dano á lipídeos e proteínas [53-55, 88]. Assim, estudos com intervenção antioxidante (vitaminas E e C) não observaram melhora para o exercício e além disso, as adaptações metabólicas e de enzimas antioxidantes

foram abolidas pela intervenção [93, 94]. Por outro lado, estudos com atletas têm observado aumento de marcadores de dano oxidativo e benefícios em suplementação antioxidantes [89, 90].

Além disso, apesar dos efeitos benéficos de intervenções antioxidantes em modelos experimentais de hipertrofia patológica, os estudos em humanos não têm demonstrado benefício clínico com esta intervenção [95-101]. Uma meta-análise recente que reuniu mais de 200 mil participantes, demonstrou efeito neutro ou até aumento na incidência de eventos cardiovasculares com o uso de diferentes intervenções antioxidantes [99].

Uma vez que as EROs participam de forma fundamental em rotas fisiológicas como a hipertrofia cardíaca, o seu bloqueio pode de fato ser deletério para a adaptação a estímulos fisiológicos. Entretanto, o papel das EROs em modelos de hipertrofia fisiológica é pouco conhecido.

Racional do Estudo

Na presença de estímulos hipertróficos, tanto o crescimento cardíaco como a manutenção de sua função parecem ser dependentes de angiogênese adequada. Desta forma, o cardiomiócito deixa de ser o único foco e sua interação com as células endoteliais assume papel fundamental para o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica adaptativa e manutenção da função miocárdica. A presença de espécies reativas de oxigênio parece ser fundamental para a sinalização adequada entre os estímulos hipertróficos e as respostas celulares adaptativas de crescimento, metabólicas e angiogênese, especialmente nas respostas de ativação e transcrição relacionadas ao HIF-1 α . Entretanto, a participação de espécies reativas do oxigênio no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício e na resposta coordenada entre hipertrofia dos cardiomiócitos e angiogênese permanecem desconhecidas. Ainda que se conheça seu papel em processos patológicos, as espécies reativas do oxigênio parecem ter participação crucial em respostas fisiológicas como a hipertrofia adaptativa. A identificação deste papel pode auxiliar no conhecimento de mecanismos fisiológicos da hipertrofia cardíaca e no entendimento da complexidade das respostas a intervenções que bloqueiam espécies reativas do oxigênio em diferentes cenários. Além disso, o conhecimento de rotas indispensáveis que viabilizem respostas adaptativas que não interfiram com a função miocárdica ou resultem na progressão para insuficiência cardíaca possibilitaria o desenvolvimento de estratégias atrativas para interromper processos patológicos indesejados como a hipertrofia maladaptativa.

2. HIPÓTESE

A hipertrofia cardíaca fisiológica é mediada por espécies reativas do oxigênio, as quais são essenciais para o balanço entre hipertrofia e angiogênese, através da modulação da ativação do HIF-1 α .

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel das espécies reativas do oxigênio, através do bloqueio com vitamina E, no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer e caracterizar um modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício em camundongos;
- ✓ Avaliar a capacidade máxima para o exercício basal e sua alteração em camundongos submetidos ao protocolo de exercício;
- ✓ Avaliar a expressão dos genes HIF-1 α e VEGF, envolvidos na hipertrofia fisiológica e angiogênese;
- ✓ Avaliar o papel das espécies reativas do oxigênio, através do uso de antioxidante nas seguintes medidas:
 - Magnitude da hipertrofia cardíaca;
 - Capacidade para o exercício;
 - Estresse oxidativo;
 - Expressão gênica de HIF-1 α e VEGF.

4. Referências bibliográficas

1. Gupta, S., B. Das, and S. Sen, *Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(6): p. 623-52.
2. Kong, S.W., et al., *Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats*. Physiol Genomics, 2005. **21**(1): p. 34-42.
3. Carreno, J.E., et al., [*Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events*]. Rev Esp Cardiol, 2006. **59**(5): p. 473-86.
4. Richey, P.A. and S.P. Brown, *Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review*. J Sports Sci, 1998. **16**(2): p. 129-41.
5. 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.
6. Carrenõ JE, et al., *Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events*. Revista espanola de cardiologia, 2006. **59**(5): p. 473-486.
7. Gerald W Dorn, I.I., *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**: p. 962-970.
8. Zamo, F.S., et al., *The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats*. Life Sci, 2011. **89**(3-4): p. 93-9.
9. 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.
10. McMullen J R, Shioi T, and Zhang L, *Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy*. PNAS, USA, 2003. **100**: p. 12355-12360.
11. Ellison, G.M., et al., *Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms*. Heart, 2011. 10.1136/heartjnl-2011-300639
12. Gielen, S., G. Schuler, and V. Adams, *Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms*. Circulation, 2010. **122**(12): p. 1221-38.
13. Michel Batlouni, *Hipertrofia Cardíaca. Fatores Determinantes e Mecanismos Moleculares*. Arq Bras Cardiol., 1995. **65** (6): p. 533-539.
14. Mill J G, et al., *Hipertrofia cardíaca: Mecanismos Bioquímicos*. Revista da Soc. de Cardiol. do RS, 2004. **03**: p. 1-4.
15. 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.

16. Moran, M., A. Saborido, and A. Megias, *Ca²⁺ regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training*. Pflugers Arch, 2003. **446**(2): p. 161-8.
17. Bellafiore, M., et al., *Increased cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts*. Int J Sports Med, 2007. **28**(9): p. 749-55.
18. 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.
19. Allen, D.L., et al., *Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse*. J Appl Physiol, 2001. **90**(5): p. 1900-8.
20. Lerman, I., et al., *Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains*. J Appl Physiol, 2002. **92**(6): p. 2245-55.
21. Dorn, G.W., 2nd, *Myocardial angiogenesis: its absence makes the growing heart founder*. Cell Metab, 2007. **5**(5): p. 326-7.
22. Walsh, K. and I. Shiojima, *Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3176-9.
23. Gerald, D., et al., *JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress*. Cell, 2004. **118**(6): p. 781-94.
24. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
25. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
26. Smith, T.G., P.A. Robbins, and P.J. Ratcliffe, *The human side of hypoxia-inducible factor*. Br J Haematol, 2008. **141**(3): p. 325-34.
27. Semenza, G.L., *Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling*. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 840-7.
28. Semenza, G.L., *Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1177**: p. 2-8.
29. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
30. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 535-40.
31. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.
32. Kietzmann, T. and A. Gorch, *Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 474-86.
33. Traber, M.G. and J.F. Stevens, *Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(5): p. 1000-13.

34. Page, E.L., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(1): p. 86-94.
35. Cerretelli, P. and C. Gelfi, *Energy metabolism in hypoxia: reinterpreting some features of muscle physiology on molecular grounds*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(3): p. 421-32.
36. Cadenas, S., J. Aragonés, and M.O. Landazuri, *Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(2): p. 219-28.
37. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
38. Lee, J.W., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions*. Exp Mol Med, 2004. **36**(1): p. 1-12.
39. Ikeda, H., et al., *Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(5): p. 664-75.
40. Cai, Z., et al., *Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(3): p. 463-70.
41. Kim, C.H., et al., *Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway*. Circ Res, 2002. **90**(2): p. E25-33.
42. Qing, M., et al., *The hypoxia-inducible factor HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(3): p. 224-32.
43. Huang, Y., et al., *Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart*. FASEB J, 2004. **18**(10): p. 1138-40.
44. Sano, M., et al., *p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload*. Nature, 2007. **446**(7134): p. 444-8.
45. Marini, M., et al., *Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(4): p. 479-87.
46. Shohet, R.V. and J.A. Garcia, *Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(12): p. 1309-15.
47. Zolk, O., et al., *Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(2): p. 315-20.
48. Shyu, K.G., et al., *Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(3): p. 576-83.

49. Halliwell, B.G., J.M., *Free radicals in biology medicine*. New York: Oxford University Press, 2007.
50. Chua, Y.L., et al., *Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31277-84.
51. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
52. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol Rev, 1994. **74**(1): p. 139-62.
53. Silva, L.A., et al., *Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle*. Eur J Appl Physiol, 2009. **105**(6): p. 861-7.
54. Silva, L.A., et al., *Interval training does not decrease oxidative stress in the heart of mice*. Int J Cardiol, 2011. **147**(2): p. 308-9.
55. Souza-Rabbo, M.P., et al., *Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats*. Exp Clin Cardiol, 2003. **8**(4): p. 201-5.
56. Rimbach, G., et al., *Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol*. Molecules, 2010. **15**(3): p. 1746-61.
57. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
58. Araujo, A.S., et al., *The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism*. J Mol Endocrinol, 2008. **41**(6): p. 423-30.
59. Brunelle, J.K., et al., *Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation*. Cell Metab, 2005. **1**(6): p. 409-14.
60. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25130-8.
61. Pimentel, D.R., et al., *Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes*. Circ Res, 2001. **89**(5): p. 453-60.
62. Semenza, G.L., *Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without*. Circ Res, 2000. **86**(2): p. 117-8.
63. Xiao, L., et al., *Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(4): p. C926-34.
64. Takano, H., et al., *Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(6): p. 789-94.
65. Sabri, A., H.H. Hughie, and P.A. Lucchesi, *Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(6): p. 731-40.

66. Kwon, S.H., et al., *H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(6): p. 615-21.
67. Araujo, A.S., et al., *Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine*. Mol Cell Biochem, 2007. **303**(1-2): p. 89-95.
68. Singh, N., et al., *Oxidative stress and heart failure*. Mol Cell Biochem, 1995. **147**(1-2): p. 77-81.
69. Dhalla, A.K., M.F. Hill, and P.K. Singal, *Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(2): p. 506-14.
70. Cesselli, D., et al., *Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 279-86.
71. Suematsu, N., et al., *Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1418-23.
72. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 241-8.
73. Heymes, C., et al., *Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(12): p. 2164-71.
74. Sam, F., et al., *Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium*. J Card Fail, 2005. **11**(6): p. 473-80.
75. Patten, D.A., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(18): p. 3247-57.
76. Shiomi, T., et al., *Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice*. Circulation, 2004. **109**(4): p. 544-9.
77. Tsujimoto, I., et al., *The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy*. Hypertension, 2005. **45**(5): p. 921-6.
78. Minhas, K.M., et al., *Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 2006. **98**(2): p. 271-9.
79. Biswas, S., et al., *Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H758-66.
80. Sanjuan-Pla, A., et al., *A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 α* . FEBS Lett, 2005. **579**(12): p. 2669-74.

81. Mansfield, K.D., et al., *Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation*. Cell Metab, 2005. **1**(6): p. 393-9.
82. Schmelter, M., et al., *Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1182-4.
83. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1263-8.
84. Guzy, R.D. and P.T. Schumacker, *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia*. Exp Physiol, 2006. **91**(5): p. 807-19.
85. Klimova, T. and N.S. Chandel, *Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 660-6.
86. Tormos, K.V. and N.S. Chandel, *Inter-connection between mitochondria and HIFs*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 795-804.
87. Yuan, G., et al., *Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 674-85.
88. Boveris, A. and A. Navarro, *Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(2): p. 224-9.
89. Marin, D.P., et al., *Cytokines and oxidative stress status following a handball game in elite male players*. Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 804873.
90. Rosa, E.F., et al., *Vitamin C and E supplementation prevents mitochondrial damage of ileum myocytes caused by intense and exhaustive exercise training*. J Appl Physiol, 2009. **107**(5): p. 1532-8.
91. Powers, S.K. and M.J. Jackson, *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1243-76.
92. Wagner, K.H., S. Reichhold, and O. Neubauer, *Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1229**: p. 115-23.
93. Ristow, M., et al., *Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8665-70.
94. Garelnabi, M., et al., *Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011.
95. Hennekens, C.H., et al., *Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(18): p. 1145-9.

96. Lonn, E., et al., *Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2005. **293**(11): p. 1338-47.
97. Cook, N.R., et al., *A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study*. Arch Intern Med, 2007. **167**(15): p. 1610-8.
98. Yusuf, S., et al., *Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 154-60.
99. Bjelakovic, G., et al., *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2007. **297**(8): p. 842-57.
100. Sesso, H.D., et al., *Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial*. JAMA, 2008. **300**(18): p. 2123-33.
101. Halliwell, B., *Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?* Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 410-8.

5. ARTIGO EM INGLÊS

**REACTIVE SPECIES BLOCKADE IN PHYSIOLOGICAL CARDIAC
HYPERTROPHY IN MICE: VITAMIN E SUPPLEMENTATION DOES NOT
PREVENT HYPERTROPHY BUT DECREASES ANGIOGENIC SIGNALING**

Carolina R. Cohen, Nidiane C. Martinelli, Kátia G. dos Santos, Michael E.
Andrades, Nadine Clausell, Luis E. Rohde and Andréia Biolo.

From the Cardiovascular Research Laboratory, Experimental Research Center,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence

Prof.^a Andréia Biolo
2350 Ramiro Barcelos St.
Porto Alegre, RS, Brazil
Zip code: 90035-903
Phone 55 51 33598844
Email: biolo.andreia@gmail.com

Abstract

Introduction: While oxidative stress has known effects on pathological cardiac hypertrophy and failure, the role of reactive oxygen species (ROS) in physiological cardiac hypertrophy and angiogenesis is not established. We aimed to investigate the effects of ROS blockade with vitamin E on physiological cardiac hypertrophy induced by exercise.

Methods: Balb/c mice were subjected to a voluntary wheel exercise protocol (EXE, n=64) and compared to a sedentary group (SED, n=48). EXE and SED animals received either 200mg/kg/day of vitamin E (vit E) or placebo. After 7 and 35 days of training, maximal exercise capacity was accessed, and analysis of cardiac hypertrophy (left ventricle weight/body weight), ROS, and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression by RT-qPCR was performed.

Results: Our model was indeed effective to induce cardiac hypertrophy, LVW/BW increased 9% after 7 days and 12% after 35 days in placebo group, and 6% after 7 days and 9% after 35 days in vit E group ($p<0.01$ for all compared to sedentary; no difference between placebo and vit E). HIF-1 α expression was increased with exercise at 7 days (2.4 ± 0.4 versus 1.06 ± 0.1 , $p=0.02$) and 35 days (1.65 ± 0.2 versus 1.09 ± 0.1 , $p=0.054$), but in vitamin E group there was in fact accentuated decreased on expression after 35 days (0.34 ± 0.1 , $p<0.001$ compared to EXE placebo). Similarly, VEGF gene expression was reduced by combination of vitamin E and exercise after 35 days (vit E: 0.2 ± 0.1 versus placebo: 1.0 ± 0.2 , $p=0.005$).

Conclusion: Blockade of ROS does not appear to affect the magnitude of cardiac hypertrophy developed in response to voluntary exercise. However, this blockade was associated with an accentuated decrease of angiogenic responses involving HIF-1 α and VEGF gene expression.

Introduction

Physiological cardiac hypertrophy, such as that induced by exercise, is characterized by uniform growth of the ventricle, with normal or increased cardiac function and absent fibrosis [1, 2]. Coordinated angiogenesis seems to be crucial to maintain cardiac function and the adaptative response to exercise [2, 3]. Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) is a regulator of oxygen homeostasis that controls several target genes, including those encoding erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor (VEGF) and proteins associated with glucose and energy metabolism [4-7]. HIF-1 α seems to play a critical role in cardiac adaptation to hypertrophic stimuli and angiogenesis [8-10]. Training on treadmill induced increased HIF-1 α and VEGF gene expressions in rat, which were associated to increases in cardiac capillarity and vascularization [9]. Moreover, cardio-specific deletion of HIF-1 α resulted in reduction in cardiac contractility and vascularization [11].

Reactive oxygen species (ROS) have a concentration-dependent participation in several cell signaling processes, both physiological (at low concentrations) and pathological (at high concentrations), the latter inducing irreversible cellular damage and death [12-14]. The potential role of ROS in pathological hypertrophy and heart failure progression has been extensively studied [15, 16]. However, intervention trials with antioxidants such as vitamins E, C, β -

carotene and selenium alone or combined failed in demonstrating benefits to reduce cardiovascular outcomes [17-19]. Since low levels of ROS have an important role in several biological processes, its inhibition could be deleterious under physiological conditions [20-22].

Studies in cell culture demonstrated the involvement of ROS on HIF-1 α stabilization under hypoxia and normoxia conditions [23-30]. Mechanical strain to embryonic stem cells increased generation of ROS inducing cardiogenesis, angiogenesis and increased HIF-1 α and VEGF gene expression. This response, as well as the increase in HIF-1 α and VEGF, was abolished when cells were incubated with the free radical scavenger vitamin E [31]. If ROS participate in physiological activation of angiogenic signaling during physiological hypertrophy, its blockade might indeed be detrimental to this cardiac adaptation.

In the present study, we aimed to investigate the effects of reactive oxygen species blockade with vitamin E on physiological cardiac hypertrophy induced by voluntary exercise. We evaluated the effects of this blockade on the degree of hypertrophy, ROS measures, exercise performance, and angiogenic signaling (HIF-1 α and VEGF activation).

Materials and Methods

Animals – We used a total of 112 male Balb/c mice, aged 8-10 weeks. The mice were divided into sedentary (SED, n=48) and exercise groups (EXE, n=64). EXE and SED animals were randomly allocated in two groups that received either 60 μ L of vitamin E (200mg/kg of α -tocopherol acetate, to

blockade reactive oxygen species) or 60µL of placebo (soybean oil vehicle) by gavage [32, 33]. The treatments were given once a day, for 35 days or until sacrifice (experimental design is presented in Supplementary Figure 1).

Mice were followed throughout the protocol by a veterinarian. Consumption of food and water were checked daily and body weight was measured weekly. All animals were supplied with food and water *ad libitum* and were kept on a 12-h light and 12-h dark regime and maintained at 23°C. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, according to the International Guidelines for Animal Care and Experimentation.

Voluntary wheel exercise – Trained animals were placed in cages with metal training wheels with a diameter of 12cm. Total exercise time and distance, and maximum and average speed were monitored daily. EXE mice were allowed free access to the wheel 24 h/day. Control sedentary mice were housed in cages without training wheels [34].

Maximal exercise capacity on treadmill – Maximal exercise capacity was performed using a rodent treadmill without inclination. These evaluations were made at baseline (day -1), 6 days and 34 days after the start of running protocol. Animals were familiarized with the treadmill in a low speed running for 2 minutes. For tests, the treadmill was set at initial speed of 15 m/min which was increased by 3 m/min every 2 minutes to the time elapsed until the exhaustion was recorded and then converted to distance. Exhaustion is defined as the point at which the animal cannot keep pace with the treadmill. The

maximal exercise capacity was calculated as the total distance run by the animal during the exercise protocol [35].

Euthanasia protocol – For acute and chronic evaluations, the animals were euthanized in equal number at two moments: 7 and 35 days after the start of protocol. The mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine and xylazine (100mg/kg e 10mg/kg respectively). The animals were weighted and had the heart quickly removed and left ventricle (LV) was separated in *RNA later* (Qiagen, USA) or frozen in liquid nitrogen for further morphological, biochemical and gene expression analyses. Cardiac hypertrophy was determined as the ratio between LV weight and body weight.

Biochemical analyses

Protein determination – All biochemical analyses were normalized by protein content, determined using the Bradford method [36].

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) – Thiobarbituric acid (TBA) reacts with aldehydes present in heart samples and it is used as an index of lipid peroxidation. Briefly, samples were deproteinized with 10% TCA. The supernatant was reacted with 0.67% TBA and heated for 15 min. After cooling, the non-polar phase was extracted with butanol and TBARS were determined in spectrophotometer (535 nm) using 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) as an external standard. Results were expressed as nmol TBARS/mg of protein [37].

Protein carbonyls – The oxidative damage to protein was measured by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH). Briefly, protein was isolated with 10% TCA and reacted with 20mM DNPH dissolved in 2M HCl, for 30 min. After, samples were centrifuged (10000xg/10min) and pellets were washed three times in ethanol:ethyl acetate (1:1). Protein pellets were dissolved in 6M guanidine hydrochloride and carbonyl contents were determined spectrophotometrically (370 nm). A second set of samples were reacted with 2M HCl and run in parallel, as a blank. Results expressed as nmol carbonyl/mg of protein [38, 39].

Catalase (CAT) activity – Catalase activity was determined by following the decrease in 240 nm absorption of a reaction medium containing hydrogen peroxide (H₂O₂) and compared with CAT standard (0.1U/μL, Sigma-Aldrich St. Louis, USA). Results expressed as unit of CAT/mg of protein [40].

Superoxide dismutase (SOD) activity – Superoxide dismutase (SOD) activity was measured based on the sample mediated inhibition of adrenaline auto-oxidation in basic buffer (480 nm) which was compared with a SOD standard (20U/mL, Sigma-Aldrich St. Louis, USA). Results expressed as unit of SOD/mg of protein [41].

Molecular analyses

RNA extraction, reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) – Total RNA was isolated from 30 mg of LV using MiRNeasy Mini kit

(Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. Concentration of RNA samples was assessed using the NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). First-strand cDNA samples were synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR were performed in StepOne™ Real-time PCR System, using *Taqman gene expression assays* (both for Applied Biosystems Inc, USA), following the manufacturer's instructions. Gene expression were normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH; assay number 4352339E). Gene expression was measured for genes that are responsible for angiogenesis, HIF-1 α and VEGF (assays number Mm01283760_m1* and Mm01281449_m1*). The primers of these genes were tested for their efficiency in qRT-PCR reaction. The efficiencies were close to 100%, then the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula was considered for calculating the relative gene expression of HIF-1 α and VEGF [42].

Statistical analysis – Data are expressed as means and standard errors of mean or standard deviation as appropriated (mean \pm SEM or mean \pm SD). Comparisons between SED and EXE groups and between vitamin E and placebo were done by using Student's *t* test. The level of significance was set at 95% ($p < 0.05$). The softwares used for analysis of the data were Excel 2007 and GraphPad Prism 5.

Results

Voluntary exercise – The protocol employed in this study was indeed effective in stimulating mice to spontaneously exercise, as showed in Table 1. Mice receiving placebo ran an average of 5.2 h and a distance of 6.2 km daily with a peak performance at the third week (Table 1). EXE vit E group ran a daily average of 5.7 h and 7 km of distance during the training protocol. Distance was significantly higher during the third and fourth weeks of exercise compared with the first week, and average speed was significantly higher at 2nd, 3rd, 4th and 5th week of exercise compared with 1st week. Time and distance were different between EXE placebo and vit E groups at 3rd and 4th weeks, as well as overall distance. Vit E mice ran longer and a higher distance along the training protocol (Table 1). Average and maximum speed were similar between groups.

Table 1 – Mice performance during the 35 days of training

Weeks	Time, hours		Distance, km		Average speed, m/min		Maximum speed, m/min	
	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E
1	5.1 ± 2.8	4.5 ± 2	5.2 ± 3	4.4 ± 2.3	16 ± 2	16 ± 2.6	54 ± 17	61 ± 19
2	5.2 ± 2.5	5.5 ± 2.4	6 ± 3	6.6 ± 3.3 ^a	19 ± 3 ^b	20 ± 2.5 ^a	54 ± 16	58 ± 18
3	5.7 ± 2.4	7.4 ± 1.8 ^{a,*}	7.6 ± 3.4 ^b	10 ± 3.5 ^{a,*}	22 ± 3.4 ^b	22 ± 4 ^a	61 ± 17	63 ± 21
4	5.4 ± 1.5	6.8 ± 2.5 [*]	7 ± 2.7	9 ± 3.7 ^{a,*}	22 ± 3 ^b	22 ± 4 ^a	54 ± 12	61 ± 19
5	5 ± 2.4	5.4 ± 2.4	6.2 ± 2.8	6.6 ± 3 ^a	21 ± 2.5 ^b	21 ± 5 ^a	54 ± 11	60 ± 24
Overall	5.2 ± 2.4	5.7 ± 2.4	6.2 ± 3.1	7 ± 3.7 [*]	19 ± 3.7 ^b	19 ± 4.3 ^a	55 ± 15	57 ± 19

Values are means ± SD; n= 9 cages for each intervention for first week, n=5 cages for each intervention for others weeks; * $p < 0.05$ comparing placebo and vitamin E groups on each week; ^a $p < 0.05$ compared with first week in each evaluation in vitamin E group; ^b $p < 0.05$ compared with first week in each evaluation in placebo group.

Maximal exercise capacity on treadmill – All mice had similar performances at baseline (day -1). EXE placebo mice had an improvement on their exercise capacity compared with SED placebo at 7 days (1550 ± 1108m *versus*

522±124m, $p=0.01$) and after 35 days (1858±789m versus 557±141m, $p=0.003$). In the same way, vit E trained mice increased their exercise capacity after 7 days (1681±885m versus 643±350m, $p=0.008$) and 35 days (2250±410m versus 473±181m, $p<0.001$). Improvement on maximal exercise capacity on treadmill was similar between placebo and vit E groups ($p>0.05$).

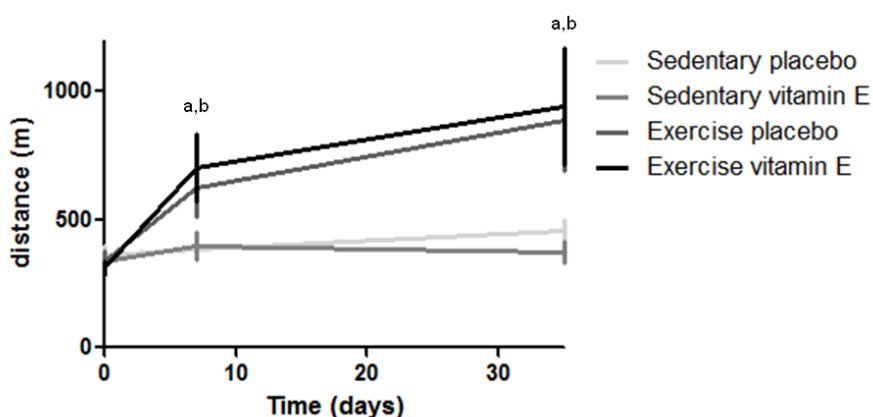


Figure 1 – Maximal exercise capacity on treadmill in sedentary and exercised groups at baseline (-1), 6 and 34 days. Values are means \pm SD; $n=10$ animals on each time; ^a $p<0.05$ comparing SED and EXE groups in placebo; ^b $p<0.05$ comparing SED and EXE groups in vitamin E intervention.

Cardiac hypertrophy – The voluntary wheel exercise was effective to induce cardiac hypertrophy. LV weight/body weight (LVW/BW) increased by 9% at 7 days (3.61±0.2 mg/g versus 3.32±0.1mg/g, $p<0.001$) and by 12% after 35 days (3.69±0.2 mg/g versus 3.30±0.1 mg/g, $p<0.001$) in EXE placebo group (Figure 2). In vit E group, LVW/BW increased by 6% after 7 days (3.56±0.2 mg/g versus 3.35±0.2 mg/g, $p=0.01$) and by 9% after 35 days (3.62±0.1 mg/g versus 3.31±0.1 mg/g, $p<0.001$). Despite the lower nominal increases in vit E group, there was no difference between placebo and vit E groups regarding cardiac

hypertrophy ($p>0.05$ for all). Also, the ratio of heart weight/BW had a similar result to LVW/BW (Supplementary Table 1, $p<0.05$).

Other variables, including BW, LV and right ventricle (RV) weight and RVW/BW were not different between groups or interventions (Supplementary Table 1, $p>0.05$ for all comparisons).

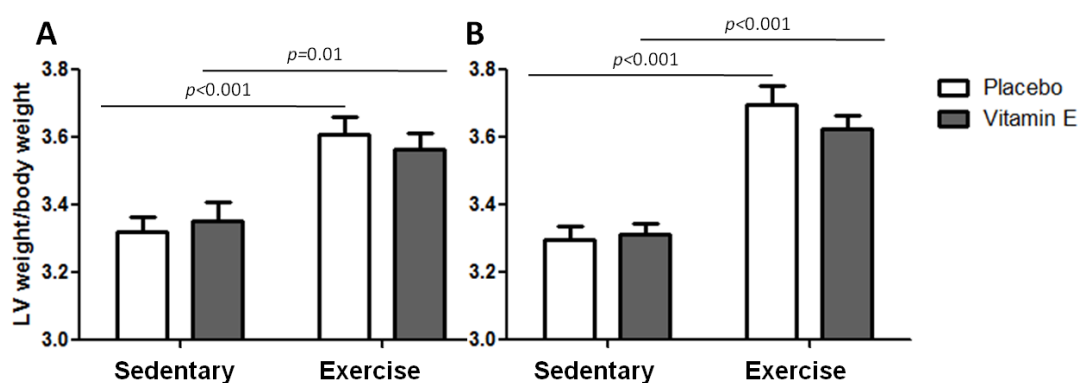


Figure 2 – Left ventricle mass / body weight after 7 (in **A**) and 35 days (in **B**) for exercise and sedentary mice in vitamin E and placebo groups; values are means \pm SEM; $n=12$ SED animals and $n=16$ EXE mice for each time.

Biochemical analyses – Changes in catalase activity occurred with exercise and were vitamin E and time-dependent: after 7 days, there was a decrease in CAT with exercise compared to SED group, only in the group receiving vitamin E (32 ± 4 U/mg protein *versus* 54 ± 8 U/mg, $p=0.025$; Figure 3E). In contrast, after 35 days, exercise resulted in increased CAT activity in both placebo (50 ± 6 U/mg *versus* 33 ± 6 U/mg, $p=0.049$; Figure 3F) and vitamin E (73 ± 7 U/mg *versus* 47 ± 9 U/mg, $p=0.033$) groups. Furthermore, CAT levels tended to be higher in vit E animals compared to placebo ($p=0.053$ Figure 3F). As expected, levels of lipid damage, assessed by TBARS, were similar between EXE and SED animals in both placebo and vit E groups ($p>0.05$ for all, Figure 3A, B). Likewise, levels of carbonyl were not different for exercised or vit E

supplemented groups ($p>0.05$ for all, Figure 3C, D). The SOD activity also was not altered by exercise, vitamin E or both ($p>0.05$ for all, Figure 3G, H).

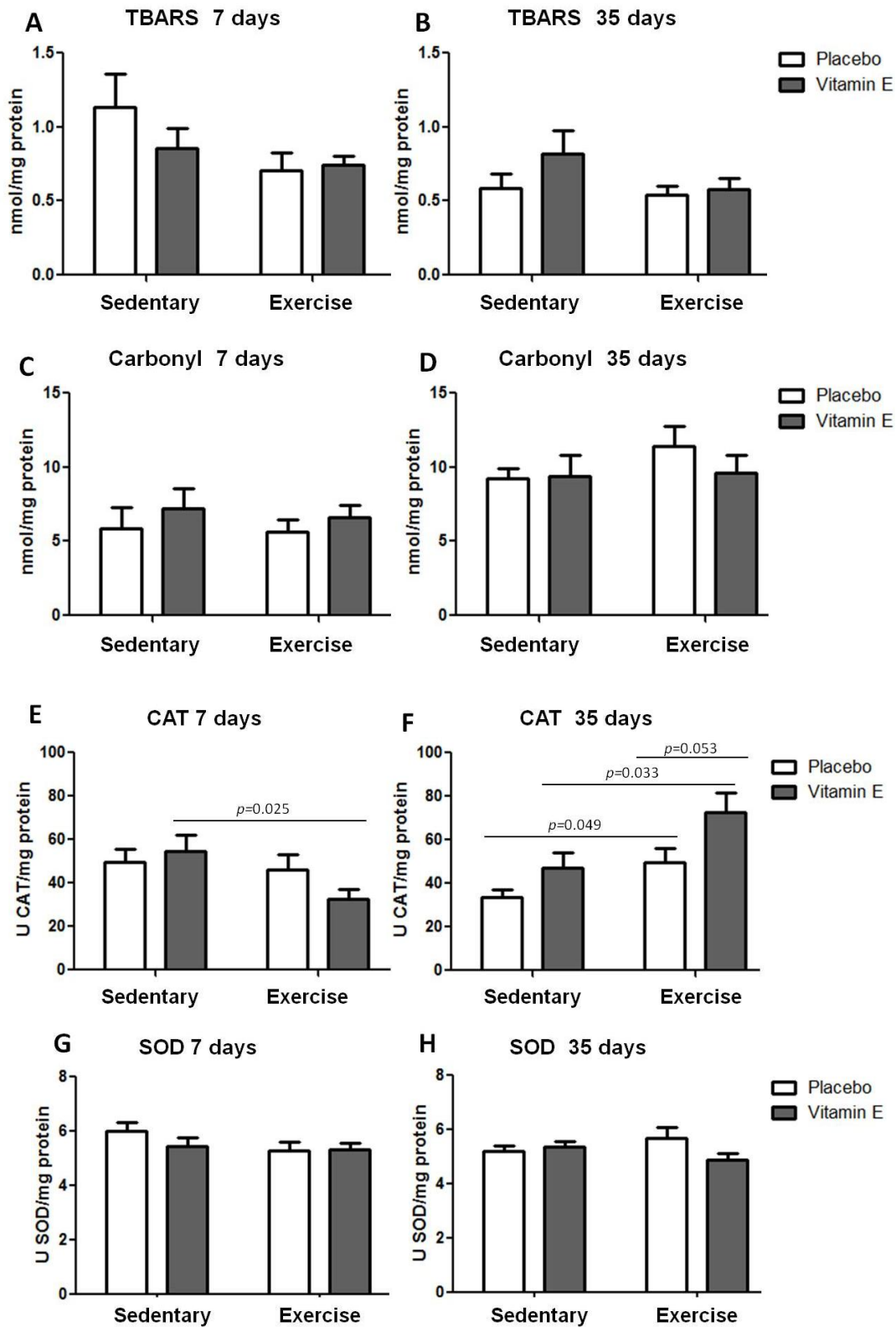


Figure 3 – Biochemical analyses in EXE and SED mice; **A, B** TBARS at 7 and 35 days, respectively; **C, D** carbonyl at 7 and 35 days respectively; **E, F** CAT activity at 7 and 35 days respectively; **G, H** SOD activity at 7 and 35 days respectively; N per group: 10-12 mice.

Molecular analyses – Gene expressions of VEGF evaluated by real-time RT-qPCR were not significantly increased in trained mice receiving both interventions after 7 days ($p>0.05$ for all, Figure 4A). However, on chronic evaluation EXE vit E mice demonstrated accentuated decrease on VEGF expression compared with EXE placebo and SED vit E (0.2 ± 0.1 versus 1.0 ± 0.2 , $p=0.005$; versus 1.5 ± 0.2 , $p<0.001$, respectively) (Figure 4B). Results of HIF-1 α real-time PCR at 7 days demonstrated increased gene expression in trained mice compared with sedentary in placebo group (1.06 ± 0.1 versus 2.4 ± 0.4 , $p=0.02$) (Figure 4C). In vit E treated group, exercise could not cause an increase in HIF-1a after 7 days of training ($p>0.05$; Figure 4C). After 35 days, HIF1-1a was also increased by exercise (1.65 ± 0.2 versus 1.09 ± 0.1 , $p=0.054$). Interestingly, vit E not only prevented HIF-1a increase in EXE animals, but it resulted in a marked decrease in its expression as compared to both SED vit E (0.34 ± 0.1 versus 1.13 ± 0.2 , $p=0.003$) and EXE placebo groups (0.34 ± 0.1 versus 1.65 ± 0.2 , $p<0.001$) (Figure 4D).

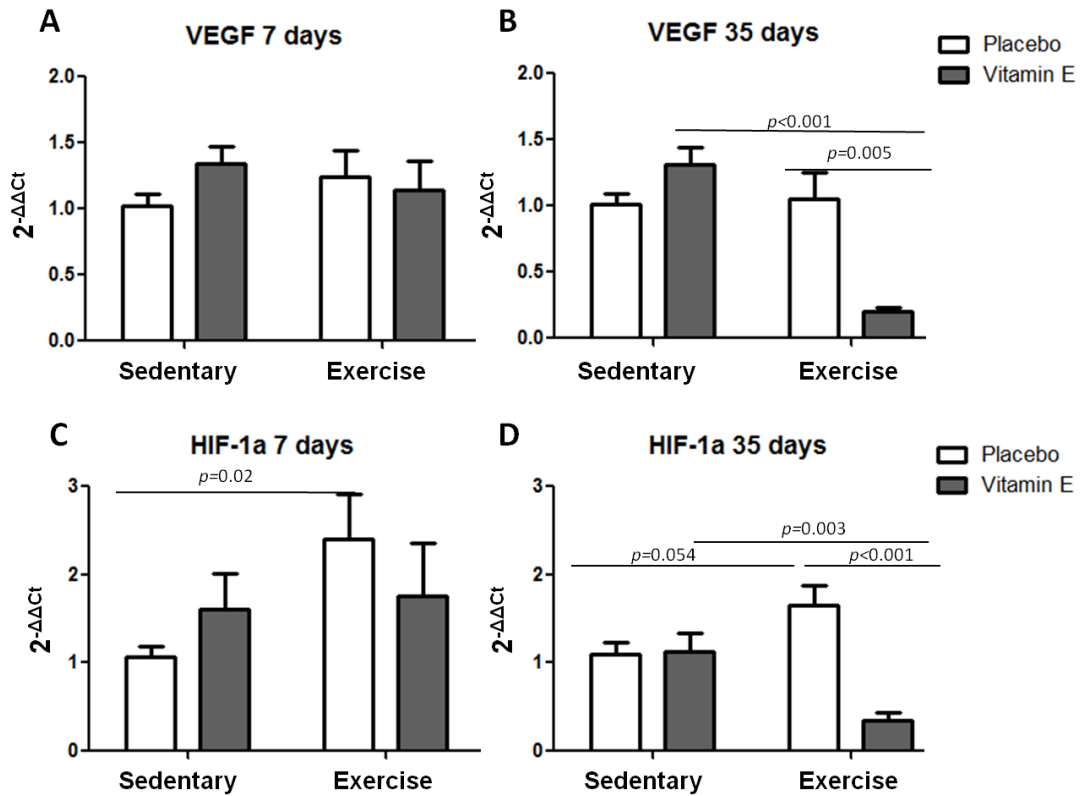


Figure 4 – Real-time RT-qPCR of angiogenesis-related genes. Data were normalized to GAPDH gene and are expressed as mean \pm SEM; **A, B** VEGF gene expression at 7 and 35 days, respectively; **B, C** HIF-1 α gene expression at 7 and 35 days, respectively; n=8 on each analysis.

Discussion

Our study is the first to explore ROS participation on HIF-1 α and VEGF activation in physiological cardiac hypertrophy induced by voluntary exercise in mice. This model of physical training was indeed effective to induce cardiac hypertrophy as early as 7 days, and slightly higher after 35 days of training. The hypertrophic response was not affected by treatment with vitamin E to blockade ROS. However, the observed changes in HIF-1 α and VEGF gene expressions that occurred with exercise were vitamin E dependent. HIF-1 α expression was increased with exercise at 7 and 35 days, but in vitamin E group there was no

increase in HIF-1 α expression at 7 days, and at 35 days its expression was in fact markedly decreased. Similarly, VEGF gene expression was reduced by combination of vitamin E and exercise after 35 days.

Voluntary wheel exercise was effective to induce cardiac hypertrophy by 9% after only 7 days, and by 12% after 35 days. The animals that received vitamin E showed hypertrophy of 6% after 7 days and 9% after 35 days. Although hypertrophy was numerically lower in vitamin E group, there was no statistical difference between groups. The hypertrophy we observed is consistent with previous studies of training in mice [34, 43]. We monitored the effectiveness of training by daily assessment of time and distance run, as well as by testing maximal exercise capacity. The protocol was indeed effective in stimulating mice to spontaneously exercise. The animals ran an average of 5 hours and 6 km of distance per day. Time, distance and average speed was higher mainly in third week of training; previous studies have demonstrated increased distance and average speed in second and third weeks of training [34, 44]. Of note, this increase was most evident in vitamin E mice. However, analysis of maximal exercise capacity showed that all trained mice improved similarly their exercise capacity both at 7 and 35 days. Thus, it seems that ROS blockade by vitamin E does not change the ability to exercise, nor it reduces the magnitude of cardiac hypertrophy.

Exercise can potentially result in ROS generation, and some studies in humans and animals indeed demonstrate oxidative damage secondary to strenuous exercise [21, 45-47]. We selected a voluntary exercise protocol to obtain a stimulus that was not too vigorous and more similar to a physiological stimulus [43]. According to that, oxidative damage markers as TBARS and carbonyl were

unchanged with our training protocol. Besides, exercise increased catalase activity after 35 days. Previous studies have described this increase on catalase levels associate to exercise [21, 45, 48-50]. Furthermore, catalase activity tended to be higher in vitamin E treated animals. Indirect evidence supports this effect by showing that vitamin E modulates the nuclear transcription factor NRF2, and that NRF2 have an effect on catalase activity [51-54]. However, to date no studies directly confirm this relationship.

In order to block possible damage caused by ROS, several interventions have been used, including selenium, β -carotene, vitamins E and C, either in single or combined use [22, 46, 47, 55]. We decided to use vitamin E because it appears to be more suitable for cellular oxidative damage prevention and it seems to have no direct effect on proteins or adaptations of interest in the present study. Furthermore, we used a vitamin E concentration that was sufficient to block part of ROS but not able to influence other critical measures [32, 33].

Coordinated angiogenesis seems to be crucial to maintain cardiac function and the adaptative response during cardiac hypertrophy. Angiogenesis associated to cardiac hypertrophy development in response to exercise seems to be accompanied by HIF-1 α and VEGF activation [8, 9]. In the present study, we did not find changes in VEGF gene expression associated with training. On the other hand, we found increased HIF-1 α gene expression in trained animals in 7 days and it was slightly lower at 35 days. In fact, studies have failed to detect increased expression of VEGF in heart on trained mice [56, 57]. It seems, however, that single bout exercise in human and rodents are associated to increase in VEGF expression in skeletal muscle [58-61]. If that really happens, the maximal exercise capacity test realized in both sedentary and exercise

groups one day before sacrifice might have masked the increased VEGF expression with training.

The angiogenesis triggered by exercise is stimulated by growth factors, shear stress and local hypoxia [2, 3, 10]. In all these situations, ROS appear to be involved. In fact, we observed a marked decrease of VEGF gene expression at 35 days of training in animals that received vitamin E. That finding may underscore ROS involvement on VEGF regulation by hypertrophic stimuli. Likewise, the combination of training and vitamin E at 35 days showed a marked reduction in HIF-1 α expression. Thus, we demonstrated that ROS are required for HIF-1 α pathway activation and vitamin E supplementation abolished this adaptation. In fact, cell culture studies have already highlighted the possible HIF-1 α activation by ROS. The mechanisms for this modulation remain uncertain [28]. It is believed inhibition of prolyl-4-hydroxylase domain proteins (PHDs) might be responsible for this activation. These enzymes are dependent upon O₂ as a co-substrate together with iron (Fe⁺²), ascorbate and α -ketoglutarate as obligate cofactor. [6, 30, 62-64]. Prolyl hydroxylation is required for binding of the von Hippel–Lindau protein, which recruits a ubiquitin–protein ligase that target HIF-1 α for proteasomal degradation. ROS can inhibit PHDs using iron on Fenton reaction. Also, ROS participate as second messengers of IGF and PDGF growth factors, which may in turn directly stimulate HIF-1 α . In the same way, ROS modulate the activity of NF- κ B and AP-1 transcription factors, so that they can bind HIF-1 α gene promoter region [14, 63]. Thus, there are many connection points between ROS signalling activities and HIF-1 α activation.

Some limitations of the present study deserve consideration. First, one could question the antioxidant effect of vitamin E administration in exercised animals. However, even though we know that vitamin E does not inhibit ROS completely, we believe that the blockade was sufficient to observe the effects of ROS decrease in this physiological context. Second, despite the voluntary exercise was effective for the induction of cardiac hypertrophy, vitamin E group ran significantly more and presented little lower hypertrophy (not significant). If we had a controlled exercise protocol it might be possible to detect a difference in cardiac hypertrophy magnitude for the same amount of exercise. However, we decided to work with a truly voluntary and physiological model. Another important limitation is the lack of histological evaluation of angiogenesis. This evaluation could confirm whether HIF-1 α and VEGF gene expression data would result in decreased capillary density and interfere with coordinated angiogenesis.

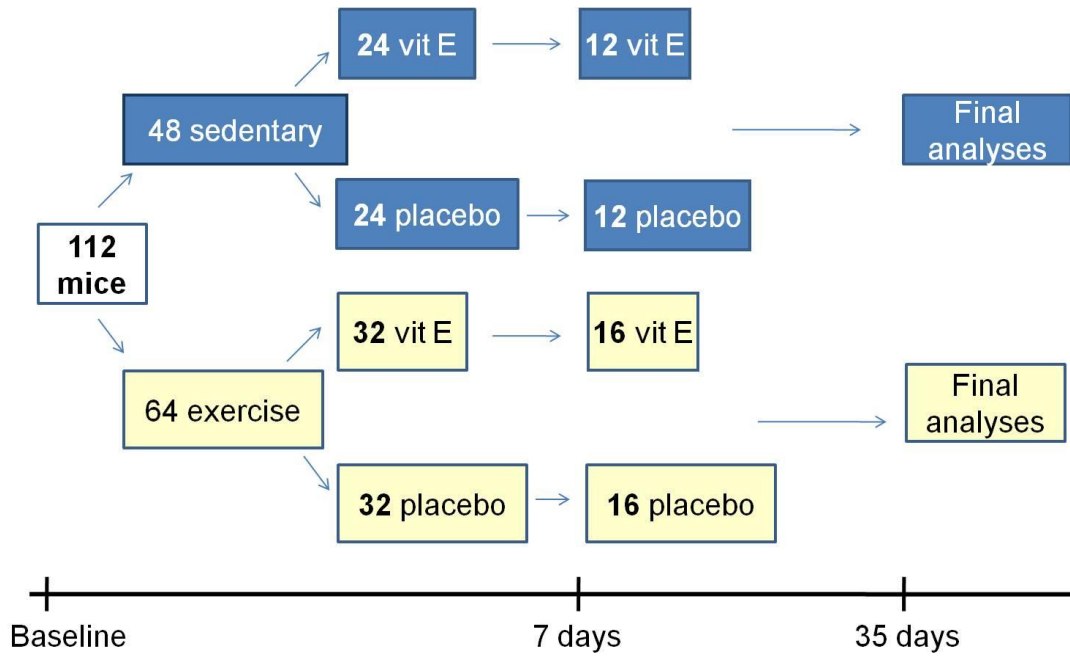
Finally, since we are studying a physiological stimulus, ROS levels are not expected to be increased to levels that could cause tissue damage. In fact, our study was designed to evaluate the possible necessary role of ROS in this physiological model. While high concentrations of ROS are involved in cellular damage and death and participate in pathological hypertrophy and heart failure [15, 16], several clinical studies failed to prove any benefits with antioxidant interventions [17-19]. In fact, low concentrations of ROS can participate on several cell signaling processes, and its blockade could result in a deficient physiological response to a variety of stimulus. In this scenario, our study points toward a significant role of ROS in physiological cardiac hypertrophy and

underscores potential harm associated to its blockade in this situation. Further studies are necessary in order to confirm these speculations.

Conclusion

Blockade of ROS with vitamin E does not appear to affect the magnitude of cardiac hypertrophy developed in response to voluntary exercise. However, this blockade is associated with an accentuated decrease of angiogenic responses involving HIF-1 α and VEGF gene expression.

Supplementary data



Supplementary Figure 1 – Experimental design.

Supplementary Table 1 – Mice data for heart and body weights.

	7 days				35 days			
	Sedentary		Exercise		Sedentary		Exercise	
	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E	placebo	vitamin E
BW (g)	27 ± 0.8	27 ± 1.0	27 ± 0.7	27 ± 0.5	29 ± 0.7	29 ± 0.9	28 ± 0.5	29 ± 0.8
HW (mg)	124 ± 4.0	124 ± 4.5	130 ± 3.0	130 ± 2.9	130 ± 2.9	132 ± 3.0	142 ± 3.1	143 ± 5.4
LV (mg)	92 ± 2.6	90 ± 3.8	96 ± 2.1	97 ± 2.3	95 ± 2.1	99 ± 3.0	105 ± 2.4	105 ± 3.4
RV (mg)	21 ± 0.9	22 ± 1.3	23 ± 1.2	22 ± 3.1	24 ± 0.7	22 ± 0.9	24 ± 0.8	24 ± 0.9
HW/BW(mg/g)	4.47 ± 0.05	4.60 ± 0.06	4.84 ± 0.05 ^b	4.78 ± 0.05 ^a	4.55 ± 0.05	4.50 ± 0.05	5.00 ± 0.07 ^b	4.93 ± 0.06 ^a
LVW/BW(mg/g)	3.32 ± 0.04	3.35 ± 0.06	3.61 ± 0.05 ^b	3.56 ± 0.05 ^a	3.30 ± 0.04	3.31 ± 0.03	3.70 ± 0.06 ^b	3.62 ± 0.04 ^a
RVW/BW(mg/g)	0.76 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.74 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.81 ± 0.02

BW – body weight; HW – heart weight; LV – left ventricle; RV – right ventricle. Values are means ± SEM; n=12 SED animals and n=16 EXE mice on each time; ^bp<0.05 comparing sedentary and exercise mice in placebo groups; ^ap<0.05 comparing sedentary and exercise mice in vitamin E group.

References

1. 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.
2. Ellison, G.M., et al., *Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms*. Heart, 2011.
3. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.
4. Semenza, G.L., *Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling*. J Cell Biochem, 2007. 102(4): p. 840-7.
5. Semenza, G.L., *Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1177: p. 2-8.
6. Smith, T.G., P.A. Robbins, and P.J. Ratcliffe, *The human side of hypoxia-inducible factor*. Br J Haematol, 2008. 141(3): p. 325-34.
7. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. 70(5): p. 1469-80.
8. Lundby, C., J.A. Calbet, and P. Robach, *The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(22): p. 3615-23.
9. Marini, M., et al., *Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat*. Histochem Cell Biol, 2008. 129(4): p. 479-87.
10. Gielen, S., G. Schuler, and V. Adams, *Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms*. Circulation, 2010. 122(12): p. 1221-38.
11. Huang, Y., et al., *Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart*. FASEB J, 2004. 18(10): p. 1138-40.
12. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 47-95.
13. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. 408(6809): p. 239-47.
14. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. 115(3): p. 500-8.
15. Qin, F., et al., *Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in G(α)q-overexpressing transgenic mice*. Circ Heart Fail, 2010. 3(2): p. 306-13.
16. Singh, N., et al., *Oxidative stress and heart failure*. Mol Cell Biochem, 1995. 147(1-2): p. 77-81.
17. Bjelakovic, G., et al., *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2007. 297(8): p. 842-57.
18. Sesso, H.D., et al., *Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial*. JAMA, 2008. 300(18): p. 2123-33.
19. Halliwell, B., *Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?* Cardiovasc Res, 2000. 47(3): p. 410-8.

20. Powers, S.K., E.E. Talbert, and P.J. Adhihetty, *Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle*. J Physiol, 2011. 589(Pt 9): p. 2129-38.
21. Powers, S.K. and M.J. Jackson, *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production*. Physiol Rev, 2008. 88(4): p. 1243-76.
22. Ristow, M., et al., *Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(21): p. 8665-70.
23. Brunelle, J.K., et al., *Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation*. Cell Metab, 2005. 1(6): p. 409-14.
24. Cai, Z., et al., *Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha*. Cardiovasc Res, 2008. 77(3): p. 463-70.
25. Cerretelli, P. and C. Gelfi, *Energy metabolism in hypoxia: reinterpreting some features of muscle physiology on molecular grounds*. Eur J Appl Physiol, 2011. 111(3): p. 421-32.
26. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing*. J Biol Chem, 2000. 275(33): p. 25130-8.
27. Feldser, D., et al., *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. Cancer Res, 1999. 59(16): p. 3915-8.
28. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1813(7): p. 1263-8.
29. Yuan, G., et al., *Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR*. J Cell Physiol, 2008. 217(3): p. 674-85.
30. Tormos, K.V. and N.S. Chandel, *Inter-connection between mitochondria and HIFs*. J Cell Mol Med, 2010. 14(4): p. 795-804.
31. Schmelter, M., et al., *Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation*. FASEB J, 2006. 20(8): p. 1182-4.
32. McDonald, S.R., R.S. Sohal, and M.J. Forster, *Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice*. Free Radic Biol Med, 2005. 38(6): p. 729-36.
33. Uzun, F.G., et al., *Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E*. Food Chem Toxicol, 2009. 47(8): p. 1903-8.
34. Allen, D.L., et al., *Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse*. J Appl Physiol, 2001. 90(5): p. 1900-8.
35. Biolo, A., et al., *Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with an allosteric effector of hemoglobin, myo-inositol trispyrophosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(6): p. 1926-9.
36. 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.
37. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 407-21.

38. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 464-78.
39. Levine, R.L., et al., *Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1994. 233: p. 346-57.
40. Li, Y. and H.E. Schellhorn, *Rapid kinetic microassay for catalase activity*. J Biomol Tech, 2007. 18(4): p. 185-7.
41. Marklund, S., *Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1976. 251(23): p. 7504-7.
42. 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.
43. 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.
44. De Bono, J.P., et al., *Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. 290(4): p. R926-34.
45. Boveris, A. and A. Navarro, *Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents*. Free Radic Biol Med, 2008. 44(2): p. 224-9.
46. Marin, D.P., et al., *Cytokines and oxidative stress status following a handball game in elite male players*. Oxid Med Cell Longev, 2011. 2011: p. 804873.
47. Rosa, E.F., et al., *Vitamin C and E supplementation prevents mitochondrial damage of ileum myocytes caused by intense and exhaustive exercise training*. J Appl Physiol, 2009. 107(5): p. 1532-8.
48. Silva, L.A., et al., *Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle*. Eur J Appl Physiol, 2009. 105(6): p. 861-7.
49. Silva, L.A., et al., *Interval training does not decrease oxidative stress in the heart of mice*. Int J Cardiol, 2011. 147(2): p. 308-9.
50. Souza-Rabbo, M.P., et al., *Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats*. Exp Clin Cardiol, 2003. 8(4): p. 201-5.
51. Feng, Z., et al., *alpha-Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer: protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells*. J Nutr Biochem, 2010. 21(12): p. 1222-31.
52. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. 298(3): p. F662-71.
53. Lin, X., et al., *Nrf2-dependent induction of NQO1 in mouse aortic endothelial cells overexpressing catalase*. Free Radic Biol Med, 2011. 51(1): p. 97-106.
54. Li, L., et al., *Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid beta-protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line: the role of Nrf2 and antioxidant enzymes*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. 75(3): p. 434-42.

55. Garelnabi, M., et al., *Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011.
56. Tang, K., et al., *Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle*. Respir Physiol Neurobiol, 2010. 170(1): p. 16-22.
57. Suzuki, J., *Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles*. Exp Physiol, 2005. 90(5): p. 763-71.
58. Kivela, R., et al., *Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice*. Cardiovasc Diabetol, 2008. 7: p. 13.
59. Gustafsson, T., et al., *Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle*. Am J Physiol, 1999. 276(2 Pt 2): p. H679-85.
60. Birot, O.J., et al., *Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type*. J Physiol, 2003. 552(Pt 1): p. 213-21.
61. Ameln, H., et al., *Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle*. FASEB J, 2005. 19(8): p. 1009-11.
62. Kietzmann, T. and A. Gorchach, *Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression*. Semin Cell Dev Biol, 2005. 16(4-5): p. 474-86.
63. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(3): p. 535-40.
64. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. 24: p. 97-106.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O modelo de exercício voluntário foi efetivo em induzir hipertrofia cardíaca já em 7 dias de treinamento, aumentando um pouco após 35 dias;
- ✓ Os animais treinados aumentaram sua capacidade máxima para o exercício após 7 dias de treinamento, sendo ainda maior após 35 dias;
- ✓ Observamos aumento pronunciado da expressão gênica do HIF-1 α nos animais treinados em 7 dias, sendo atenuado em resposta ao exercício crônico. Não observamos a alteração da expressão do VEGF associada apenas ao exercício;
- ✓ O bloqueio das espécies reativas do oxigênio com a vitamina E não parece afetar a magnitude da hipertrofia cardíaca ou a capacidade para o exercício. Do mesmo modo, a intervenção antioxidante não afetou marcadores de dano oxidativo. No entanto, observamos uma tendência de aumento da catalase associada à suplementação da vitamina E. Além disso, o bloqueio das espécies reativas do oxigênio associado ao exercício diminuiu acentuadamente a expressão dos genes de resposta angiogênica HIF-1 α e VEGF.