



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina**

Mariana Janini Gomes

Influência do exercício físico, aeróbio ou resistido, sobre a musculatura esquelética de ratos com infarto do miocárdio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Adj. Marina Politi Okoshi

**Botucatu
2019**

Mariana Janini Gomes

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO,
AERÓBIO OU RESISTIDO, SOBRE A
MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS
COM INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gomes, Mariana Janini.

Influência do exercício físico, aeróbio ou resistido, sobre a musculatura esquelética de ratos com infarto do miocárdio / Mariana Janini Gomes. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi
Capes: 40101002

1. Infarto do miocárdio. 2. Exercícios físicos. 3. Estresse oxidativo. 4. Músculo esquelético.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exercício físico; Infarto do miocárdio; Músculo esquelético.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco. Necessitamos mais de humildade que de máquinas. Mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá”.

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, MÁRCIA e MIGUEL, aos meus irmãos, MARCELO e MARINA, e ao meu namorado RAFAEL por sempre me apoiarem em todas as conquistas da minha vida.

Agradecimento especial

Agradeço à Prof^a Adj. MARINA POLITI OKOSHI, pela oportunidade de tê-la como orientadora, pela dedicação e atenção dispensada durante todos estes anos. A senhora contribuiu muito para que eu alcançasse os meus sonhos. Obrigada por participar de mais uma etapa na minha formação e por ter sido fundamental para a realização deste trabalho!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por abençoar minha vida com pessoas maravilhosas e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, MÁRCIA e MIGUEL, por sempre me apoiarem em todas as decisões, mesmo que elas pudessem nos distanciar, por aguentarem a saudade de tantos anos longe e por sempre me darem força em todos os momentos. Pai e mãe, muito obrigada pela educação, carinho, paciência, amor, ensinamentos e dedicação em toda minha trajetória.

Aos meus irmãos, MARCELO e MARINA, por serem acima de tudo meus melhores amigos, conselheiros e exemplos na minha vida. Eu amo vocês!

A todos os meus familiares. Em especial meus avós, ANALIA e PEDRO (*in memorian*), EVA (*in memorian*) e MIGUEL (*in memorian*) por todo carinho e afeto. E ao meu tio MOACIR (*in memorian*), pela alegria e sorriso que abria sempre ao me ver.

Ao meu namorado RAFAEL, por ser inspiração na minha vida, por me incentivar e encorajar a dar grandes passos, a me desafiar e evoluir. Muito obrigada por todo amor e por me tornar uma pessoa melhor!

Aos meus futuros sogros, MÁRCIA e FRANCISCO, pelo carinho, conselhos e ensinamentos. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos meus cunhados MAÍSA, VINÍCIUS e MARINEZ, pela amizade e bons momentos compartilhados.

As minhas amigas de Botucatu, em especial TARSILA, ANA CAROLINA, LUCIANA, DÉBORA, JÉSSICA C., JÉSSICA L., DANIELLE por compartilharmos nossas dificuldades, alegrias e tristezas, e por todos os momentos felizes que me propiciaram nesta cidade.

As minhas amigas ALINE e LUANA, maiores presentes que a pós-graduação me deu, pela amizade, ensinamentos, dedicação e carinho que sempre tiveram por mim. Obrigada por toda ajuda e pelo apoio nas minhas decisões!

Aos amigos PAULA, SÍLVIO, MARCELO, RICARDO, PRISCILA, CAMILA B., FELIPE, pela ajuda em toda minha trajetória no laboratório, pelas risadas, pelo companheirismo, e por fazerem dos meus dias em Botucatu mais felizes.

Aos amigos pós-graduandos e alunos de iniciação científica, em especial DAVID, THIERRES, EDER, LIDIANE, LEILIANE, CAMILA R., pela amizade e colaboração neste trabalho.

Ao professor KATASHI OKOSHI, pela realização do ecocardiograma, por todos os ensinamentos, colaboração neste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao professor LEONARDO ZORNOFF, pela realização da cirurgia de infarto, pela paciência e dedicação, e por estar sempre pronto a me ajudar.

Ao pesquisador GILSON MURATA e a sua equipe, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, pela realização dos ensaios enzimáticos e por todos os ensinamentos, paciência e prontidão.

À Profa. ANA ANGÉLICA, pela análise das enzimas antioxidantes.

Às professoras BERTHA FURLAN POLEGATO e SILMÉIA ZANATI BAZAN pelas valiosas sugestões proferidas no exame de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. JOHN LAWLER, meus colegas DYLAN HOLLY e PATRICK RYAN e todos do laboratório REDOX BIOLOGY AND CELL SIGNALING. Vocês fizeram do meu ano no Texas a melhor experiência internacional que eu poderia ter. Agradeço pelos ensinamentos, paciência infinita, e também por garantirem que eu tivesse uma verdadeira experiência da vida americana durante esse período!

Aos FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, da SECÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO e da UNIDADE DE PESQUISA EXPERIMENTAL, meu muito obrigada por toda ajuda e gentileza.

À UNOESTE e meus PROFESSORES DA GRADUAÇÃO, peças fundamentais na minha formação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo nº 2014/23592-3)

A TODOS que fizeram e fazem parte da minha vida, muito
obrigada!

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract	4
Introdução	6
Objetivos.....	13
Objetivo Geral	14
Objetivo Específicos	14
Material e Métodos.....	15
Resultados.....	29
Discussão	49
Conclusão.....	58
Referências.....	60

RESUMO

Alterações da musculatura esquelética estão envolvidas na diminuição da capacidade física que ocorre após infarto do miocárdio (IM). Diversos mecanismos podem participar das anormalidades musculares como aumento do estresse oxidativo, alterações da expressão de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear (NF)- κ B, desequilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos, e alterações metabólicas. Embora exercícios têm sido preconizados para pacientes estáveis, os efeitos do exercício resistido após IM e os mecanismos envolvidos em seus efeitos ainda não estão completamente esclarecidos. O exercício resistido modula o trofismo por meio de ativação de células satélites. Neste estudo, comparamos os efeitos de dois tipos de exercício, aeróbico e resistido, iniciados durante a fase de remodelação cardíaca compensada, sobre alterações fenotípicas e moleculares do músculo gastrocnêmio de ratos com IM. **Métodos:** Três meses após indução de IM, ratos Wistar foram divididos nos grupos Sham (n=20); IM sedentário (IM-S, n=9); IM submetido a exercício aeróbico (IM-A, n=9); e IM submetido a exercício resistido (IM-R, n=13). Os ratos foram treinados três vezes por semana, durante três meses, em esteira ou escada. Avaliação cardíaca foi realizada por ecocardiograma, antes e após o treinamento. A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada por imunofluorescência e a expressão de proteínas oxidadas por Western blot. Marcadores do estresse oxidativo e do metabolismo energético foram analisados por espectrofotometria. A ativação de células satélites foi quantificada por imunofluorescência de MyoD, NCAM e isoforma neonatal das cadeias pesadas de miosina e pela expressão proteica de Pax-7. Análise estatística: ANOVA ou Mann Whitney. **Resultados:** O exercício aeróbico melhorou a capacidade funcional e o resistido aumentou a capacidade de carga máxima. Os treinamentos não alteraram as estruturas cardíacas ou a função do ventrículo esquerdo. O tamanho do IM e a área seccional transversa das fibras do gastrocnêmio não diferiram entre os grupos. A produção de espécies reativas de oxigênio foi maior no grupo IM-S que no Sham e a concentração de hidroperóxido de lipídeo foi menor no IM-A que nos demais grupos. A atividade da catalase foi maior e a da glutathiona peroxidase menor nos ratos infartados que no Sham. A atividade da superóxido dismutase foi maior nos grupos Sham e IM-R que no IM-S. A atividade de enzimas chave do metabolismo esquelético muscular não diferiu

entre os grupos, exceto por aumento da piruvato quinase no grupo IM-S em relação aos demais grupos e da β -hidroxi acil CoA desidrogenase no IM-S em relação ao Sham. A ativação de células satélites e a expressão das proteínas avaliadas por Western blot não diferiram entre os grupos. **Conclusão:** Exercício aeróbio e resistido melhora a capacidade física e a capacidade de carga máxima, respectivamente, sem alterar parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo de ratos infartados. No gastrocnêmio, o infarto aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, altera a atividade de enzimas antioxidantes e de enzimas do metabolismo da glicose e de ácidos graxos. O exercício aeróbio reduz a concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo e atenua a redução da atividade da glutathione peroxidase, mostrando-se, portanto, mais eficaz que o exercício resistido contra aumento do estresse oxidativo.

ABSTRACT

Skeletal muscle changes contribute to reduced physical performance after myocardial infarction (MI). Exercise has been recommended to stable patients. However, the effects of resistance exercise after MI are not clear. We compared the effects of two types of exercise, aerobic and resistance, initiated during compensated cardiac remodeling, in gastrocnemius muscle of infarcted rats. **Methods:** Three months after MI induction, Wistar rats were divided into four groups: Sham (n=20); sedentary MI (MI-S; n=9); aerobic exercised MI (MI-A; n=9); and resistance exercised MI (MI-R; n=13). Exercised rats trained three times a week for 12 weeks on treadmill or vertical ladder. Energy metabolism, oxidative stress markers, and antioxidant enzyme activities were assessed by spectrophotometry. Markers of satellite cells activation (MyoD, NCAM, and myosin heavy chain neonatal isoform) were assessed by immunofluorescence or Western blot (Pax-7). Statistical analyzes: ANOVA or Mann Whitney. **Results:** Aerobic physical capacity was greater in MI-A group and maximum carrying load higher in MI-R. Cardiac structures and left ventricular function evaluated by echocardiogram did not differ between the infarcted groups. Histological analyzes showed that MI size and gastrocnemius cross sectional area did not differ between infarcted groups. Oxygen reactive species production was higher in MI-S than Sham and lipid hydroperoxide concentration was lower in MI-A than the other groups. Catalase activity was higher and glutathione peroxidase activity lower in infarcted groups than Sham. Superoxide dismutase activity was higher in Sham and MI-R than MI-S. Activity of enzymes of skeletal muscle metabolism did not differ between groups, except by an increase in piruvate kinase in MI-S than the other groups, and β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase in MI-S than Sham. Satellite cell activation and protein expression of MAPK and NF- κ B did not differ between groups. **Conclusion:** Aerobic and resistance exercise improves physical capacity and maximum load, respectively, without changing echocardiographic parameters of infarcted rats. Myocardial infarction increases oxygen reactive species production and changes activity of antioxidant enzymes of glucose and fatty acid enzymes metabolism. Aerobic exercise reduces muscle lipid hydroperoxide concentration and attenuates glutathione peroxidase activity change, being superior to resistance exercise against oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCV) são, atualmente, a maior causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo ¹. Em 2016, aproximadamente 17,6 milhões de mortes foram atribuídas às DCV globalmente, o que representa um aumento de 14,5% em relação a 2006 ². No Brasil, as DCV são as principais causas de morte, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos ³.

Dentre as condições causadoras das DCV, destaca-se o infarto agudo do miocárdio (IM), que é definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas resultantes da morte celular cardíaca ⁴. Em 2016, foram registradas aproximadamente 95 mil mortes por IM no Brasil ⁵.

A disfunção cardíaca induzida pelo IM apresenta repercussão sistêmica, afetando diversos tecidos do organismo, incluindo a musculatura esquelética ^{6,7}. Estudos clínicos e experimentais indicam que IM, e especialmente a insuficiência cardíaca (IC), acompanham diversas anormalidades da musculatura esquelética como atrofia, fibrose, perda de mitocôndrias, mudança no padrão molecular das fibras musculares, alteração da expressão gênica de metaloproteinases e fatores de regulação miogênica, anormalidades metabólicas de enzimas oxidativas e lipolíticas, e redução da capacidade de desenvolver força por unidade de área muscular ⁶⁻¹⁷. O conjunto das alterações musculares que ocorrem em doentes com falência cardíaca crônica foi denominado de miopatia associada à insuficiência cardíaca e, atualmente, tem se destacado como importante causa de intolerância aos exercícios físicos ¹⁸.

A IC caracteriza-se, clinicamente, por redução da capacidade para exercícios físicos e atividades cotidianas, devido à ocorrência precoce de fadiga e dispneia aos esforços. Essa síndrome é a via final comum da maioria das doenças cardíacas e também um dos mais importantes desafios clínicos da atualidade na área da saúde, pois representa importante problema de saúde pública por ser condição de alta prevalência e elevada morbimortalidade e custos financeiros, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento ^{19,20}.

Entre as alterações frequentemente observadas na IC, destacam-se a atrofia muscular e a modificação da composição das cadeias pesadas das moléculas de miosinas nas fibras musculares esqueléticas ^{12,17,21}. Interessantemente, em nosso

laboratório foi verificado que alterações do fenótipo muscular estão também presentes na fase de hipertrofia cardíaca compensada e, portanto, antes do desenvolvimento da IC ¹⁷. Esse resultado sugere que as alterações da musculatura esquelética são mediadas por fatores bioquímicos e/ou neurohormonais associados ao quadro de injúria do coração e não estão diretamente relacionadas à presença da insuficiência cardíaca.

Anormalidades no metabolismo energético participam de muitos processos fisiopatológicos, entre eles a disfunção cardíaca, afetando ambos os músculos cardíaco e esquelético. As alterações sugerem a existência de miopatia metabólica generalizada que envolve, principalmente, redução na capacidade oxidativa, mudança na utilização de substratos, e alteração na transferência de energia por fosfotransferase quinases ²². Em modelos animais, diminuição da capacidade oxidativa em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca está relacionada a redução de sinalização pela cascata de transcrição da biogênese mitocondrial ²³. Estudos sugeriram que a capacidade oxidativa muscular, a produção mitocondrial de ATP, e os fatores respiratórios nucleares da cascata transcricional PGC-1 são semelhantes em pacientes com insuficiência cardíaca e sujeitos sedentários ^{24, 25}.

Os fatores responsáveis pela miopatia esquelética ainda não estão completamente esclarecidos. Aumento do estresse oxidativo tem sido considerado importante fator no desenvolvimento de alterações musculares ^{26, 27}. Estresse oxidativo pode ser definido como estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio e mecanismos endógenos antioxidantes ²⁸. Há substancial evidência que o estresse oxidativo está aumentado tanto no miocárdio como em nível sistêmico, inclusive na musculatura esquelética, durante a insuficiência cardíaca ^{29, 30}.

No músculo esquelético, o sistema de enzimas antioxidantes, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Cat), protege as células das ações de EROs ³¹. Desequilíbrio entre atividades pró e antioxidantes resulta no aumento do estresse oxidativo. Em estudos clínicos e experimentais, foi observado que a expressão e atividade de

enzimas antioxidantes encontram-se reduzidas no músculo esquelético durante a insuficiência cardíaca ^{26, 29}.

Músculos com características predominantemente glicolíticas são mais propensos à injúria do que aqueles preferencialmente oxidativos, devido à capacidade reduzida de neutralizar produção anormal de EROs. Recentemente, foi observado que aumento na produção de EROs em músculos glicolíticos de animais com IC, induzida por IM, está relacionado à atrofia muscular ²⁷.

Embora diversas fontes de EROs possam estar envolvidas, a família da NADPH oxidase parece ser especialmente importante para a sinalização redox ³². A classe de proteínas NADPH oxidase constitui um grupo de enzimas cuja função é produzir EROs. Estudos recentes identificaram aumento na atividade da NADPH oxidase em modelos experimentais de insuficiência cardíaca ^{33, 34}. Entretanto, em nosso laboratório não encontramos alteração da atividade deste complexo enzimático durante a insuficiência cardíaca. A produção de superóxido pela NADPH oxidase, avaliada pela quantificação de 2-hidroxi-etídio e por redução da lucigenina, e a produção de peróxido de hidrogênio em fração de membrana estimulada com NADPH em ensaio com Amplex Red, não foram alteradas no músculo sóleo de ratos infartados ²⁶ e com estenose aórtica ³⁵.

As vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva a alterações da musculatura esquelética ainda não estão completamente esclarecidas. Há evidências que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear- κ B (NF- κ B) possam estar envolvidas na resposta muscular ao estresse oxidativo ^{36, 37}.

As MAPKs são constituídas por quatro membros: extracelular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) e ERK5. JNK e p38 MAPK estão associadas com perda muscular induzida por citocinas. Em contraste, ERK1/2 está relacionada à preservação da síntese proteica ³⁸. Estudos *in vitro* mostraram que a inibição da cascata de sinalização das MAPKs aumenta a expressão de proteínas específicas de fibra muscular lenta e reduz características de fibras rápidas, induzindo fenótipo muscular mais lento ³⁹. As MAPKs podem ser moduladas por diversos fatores, entre os quais se destacam as citocinas

inflamatórias, em especial o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)³⁸ e o estresse oxidativo⁴⁰, ambos aumentados durante a insuficiência cardíaca⁴¹.

Além de modular a expressão de proteínas da família das MAPKs, o TNF- α é capaz de ativar o NF- κ B, uma família de cinco fatores transcricionais, que estão presentes no músculo esquelético e participam da regulação de vários processos celulares como apoptose, imunidade e inflamação, e desenvolvimento e diferenciação⁴². Por meio de associação com a proteína I κ B, o NF- κ B encontra-se normalmente inativo no citoplasma⁴³. A exposição do TNF- α ao seu receptor de membrana plasmática leva à fosforilação do I κ B, que é então ubiquitinizado para posterior degradação proteossomal⁴⁴. A degradação do I κ B permite a ativação e translocação de heterodímeros do NF- κ B para o núcleo celular, onde ativa genes alvos específicos^{37, 45}.

Em nosso laboratório, avaliamos a participação das MAPK e do NF- κ B na resposta do tecido muscular esquelético ao estresse oxidativo de ratos infartados com insuficiência cardíaca crônica. O aumento do estresse oxidativo foi acompanhado por alteração na expressão de proteínas das vias MAPK e NF- κ B²⁶. Em estudo recente, foi observado aumento na ativação de NF- κ B e fosforilação da p38 MAPK, sem alteração do nível proteico total de p38 MAPK no músculo plantar de ratos infartados. Além disso, o tratamento com o antioxidante apocinina preveniu aumento da atividade do NF- κ B e da expressão proteica de fosfo-p38 MAPK, sugerindo que o estresse oxidativo está envolvido na ativação exacerbada de NF- κ B e fosforilação de p38 MAPK³⁴.

O desequilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos também estão envolvidos nas alterações musculares e são responsáveis, pelo menos parcialmente, por redução da massa muscular causada pela injúria cardíaca. No músculo, como em outros tecidos, grande parte da proteólise intracelular ocorre por meio do sistema ubiquitina proteassoma^{46, 47}. Aumento da proteólise dependente do sistema ubiquitina proteassoma é um dos principais determinantes de perda de massa muscular em vários estados catabólicos, incluindo caquexia⁴⁸. Foi descrito na literatura ativação do sistema ubiquitina proteassoma em músculo esquelético de camundongos e humanos com IC⁴⁹, e observado que a hiperativação do sistema

ubiquitina proteassoma está relacionada a aumento na produção muscular de EROs³⁴.

Apesar dos progressos notáveis na abordagem terapêutica de pacientes com IC, o tratamento da síndrome permanece um grande desafio devido às taxas de mortalidade, que ainda são elevadas. Adicionalmente, não há terapia específica para prevenção ou recuperação de alterações da musculatura esquelética associadas à IC. Mais recentemente, diretrizes internacionais^{50,51} e brasileira⁵² para tratamento da IC passaram a preconizar a prática regular de exercícios físicos para pacientes com IC em classes funcionais I a III de acordo com a classificação da New York Heart Association.

Desde o trabalho clássico realizado por Sullivan e cols.⁵³, no final de 1980, diversos estudos têm mostrado efeitos benéficos do exercício físico aeróbio, que afeta positivamente a função cardiovascular, marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e sistema músculo esquelético de pacientes com IC. Em relação ao músculo esquelético, o exercício físico propicia aumento da atividade de enzimas antioxidantes, da densidade capilar, de fibras musculares do tipo I, da área seccional transversa de fibras musculares, e da força e resistência muscular⁵⁴. Adicionalmente, a prática regular de exercícios melhora a capacidade funcional e qualidade de vida, e reduz taxa de reinternações hospitalares e de mortalidade por doença cardiovascular⁵⁵⁻⁵⁷.

O treinamento aeróbio melhora a resistência muscular a fadiga e é capaz de combater os efeitos deletérios da insuficiência cardíaca no metabolismo energético do músculo esquelético. Adaptação ao treinamento aeróbio envolve aumento de glicólise e do metabolismo oxidativo, promovendo aumento no volume e densidade de mitocôndria e proteínas mitocondriais, além de aumento da eficácia de transferência de energia^{22,58}.

A compreensão dos benefícios do exercício físico em pacientes com IC crônica resultou, primariamente, de investigações com exercício físico aeróbio, uma vez que treinamento muscular resistido não era considerado seguro na insuficiência cardíaca. Somente mais recentemente, foi observado que a prática de exercícios resistidos é não apenas segura, mas também associada a benefícios complementares àqueles fornecidos pelo exercício aeróbio⁵⁴. Portanto, os

exercícios resistido e aeróbio contínuo de intensidade moderada devem ser as duas primeiras escolhas para reabilitação precoce após infarto do miocárdio ⁵⁹.

Em indivíduos saudáveis, a prática de exercícios resistidos resulta em diversos benefícios como manutenção de boa capacidade funcional, melhora da endurance muscular, densidade óssea, força muscular, metabolismo basal e resistência à insulina, além de reduzir risco de osteoporose e diabetes e auxiliar no controle da hipertensão arterial ^{60, 61}. Na insuficiência cardíaca, também foram descritos efeitos benéficos resultantes do treinamento resistido como melhora da capacidade física com aumento do consumo máximo de oxigênio, melhora da força e endurance muscular, e aumento de enzimas oxidativas no músculo esquelético ^{62, 63}. A somatória desses fatores resulta em melhora da performance para atividades de vida diária e da qualidade de vida dos pacientes ⁵⁴.

Apesar de estudos sobre efeitos do exercício resistido após IM serem escassos, há evidências de seus efeitos benéficos tanto no miocárdio ⁶³ como no músculo esquelético ⁵⁹ de ratos infartados. Os mecanismos envolvidos nos efeitos positivos do exercício físico resistido ainda não estão completamente esclarecidos. Esse tipo de exercício físico é capaz de preservar ou aumentar o trofismo muscular por meio de modulação de células satélites ^{64, 65}. As células satélites são células mononucleadas e indiferenciadas, que localizam-se entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular ⁶⁶. Em condições basais, encontram-se em estado quiescente; sua ativação ocorre após estímulos lesivos ao músculo, sendo denominadas células precursoras miogênicas ou mioblastos ⁶⁷.

Não está esclarecido se a prática de exercícios físicos, realizada durante o processo de remodelação e disfunção ventricular, porém antes da insuficiência cardíaca estar estabelecida, pode prevenir ou atenuar alterações na musculatura esquelética que ocorrem durante a insuficiência cardíaca. Neste estudo, testamos a hipótese que o exercício físico, aeróbico ou resistido, durante o processo de remodelação cardíaca, previne ou atenua alterações fenotípicas e moleculares da musculatura esquelética associadas à insuficiência cardíaca.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar os efeitos de dois tipos de exercício iniciados durante a fase de remodelação cardíaca compensada sobre alterações fenotípicas e moleculares que ocorrem no músculo gastrocnêmio de ratos com infarto do miocárdio.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, o metabolismo energético e a geração de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos com infarto do miocárdio;
2. Identificar ativação de células satélites por análise da expressão proteica do Pax-7 e por imunofluorescência de MyoD, NCAM e isoforma neonatal das cadeias pesadas de miosina;
3. Analisar a expressão de proteínas das vias das MAPK e do NF- κ B;
4. Avaliar a expressão de proteínas da via ubiquitina proteassoma;
5. Mensurar a área seccional transversa das fibras por morfometria;
6. Verificar, comparativamente, se treinamento físico aeróbio de intensidade moderada em esteira e exercício resistido, realizados previamente ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, atenuam ou previnem alterações musculares e se este potencial efeito benéfico é mediado pelas vias estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram alimentados com ração comercial Purina® e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas, com três ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos invertidos de luminosidade de 12h. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo nº 2014/1109).

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório ⁶. Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria descendente anterior esquerda ligada com fio mono-nylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com fio de algodão. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem a ligação da artéria coronária responsável pela produção do infarto.

Foram constituídos, inicialmente, dois grupos de ratos: controle (Sham) e infarto do miocárdio (IM). Três meses após a cirurgia, os animais foram submetidos a ecocardiograma transtorácico e subdivididos em quatro grupos experimentais: 1) Sham (n=20); 2) IM sedentário (IM, n=26); 3) IM submetido a protocolo de exercício físico resistido (IM-R, n=21); e 4) IM submetido a exercício físico aeróbico de intensidade moderada (IM-A, n=23).

Estudos prévios de nosso laboratório em ratos com insuficiência cardíaca mostraram que a inclusão de 10 a 15 animais por grupo é suficiente para mostrar diferenças nas estruturas cardíacas, na função do ventrículo esquerdo (VE) e em variáveis relacionadas à miopatia associada à insuficiência cardíaca ^{6, 26, 36, 68}. Como a mortalidade no período pós-operatório é de aproximadamente 40%, optamos por iniciar cada grupo experimental com aproximadamente 20 animais.

Em estudos prévios ^{7, 69}, verificamos que, a partir do sexto mês pós-cirurgia, os ratos frequentemente apresentam insuficiência cardíaca; portanto, o protocolo de treinamento físico foi iniciado três meses após a indução do infarto e mantido por período de três meses. Antes do início dos exercícios, as estruturas cardíacas e a função do VE foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico.

Ao final do período experimental, foi realizado novamente ecocardiograma transtorácico. No dia subsequente, os animais foram avaliados por dois examinadores para verificação do sinal clínico de insuficiência cardíaca taquipnéia/respiração laboriosa e, a seguir, eutanasiados para coleta de sangue e obtenção de tecidos. No exame *post mortem*, foram pesquisados sinais patológicos sugestivos do diagnóstico de insuficiência cardíaca como ascite, derrame pleural e pericárdico, trombo em átrios, hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito em mg/peso corporal em g > 0,8) e congestão pulmonar (relação peso dos pulmões/peso corporal > 2 desvios padrão acima da média do grupo controle) ^{7, 69}.

Avaliação da capacidade física aeróbia

A capacidade física aeróbia foi avaliada pelo teste de tolerância ao esforço, realizado antes, após 45 dias e ao término do período de treinamento. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, sendo iniciado na velocidade de 5 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos, até a exaustão do animal. A velocidade máxima de corrida foi registrada e a distância total percorrida calculada ^{35, 70}. Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações, por 5 min/dia. Os resultados do teste de capacidade física realizado após 45 dias de treinamento foram utilizados para ajuste da intensidade do exercício.

Protocolo de exercício físico aeróbio

O exercício físico aeróbico foi realizado em esteira, três vezes por semana, em dias alternados. Inicialmente, houve período de adaptação, com

aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1). A partir da sexta semana de treinamento, os animais do grupo IM-A foram submetidos a sessões de corrida a 60% da capacidade máxima (considerada a velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo), com duração de 40 minutos, até o final do período experimental, de três meses. O protocolo foi adaptado daquele utilizado por Moreira et al. ⁷¹.

Tabela 1. Adaptação ao protocolo de exercício físico aeróbio

Semanas	Velocidade (metros/minutos)	Duração (minutos)
1 ^a	5	10
2 ^a	7,5	15
3 ^a	10	25
4 ^a	12	30
5 ^a	15	40

Determinação da carga máxima para exercício resistido

O exercício resistido foi realizado em escada especialmente construída para (1 metro de altura, 0,2 metros de largura, 0,5 centímetro entre os degraus e 80° de inclinação). Antes do teste para determinação da carga máxima, familiarização com o aparato foi realizada por três dias e consistiu de três subidas na escada. Antes da primeira tentativa, o animal foi mantido na câmara, no topo da escada (20x20x20 cm), durante 60 segundos, para que percebesse que o ambiente não representava ameaça. Na primeira tentativa, o animal foi colocado na porção mais alta da escada, próximo à porta da câmara. Na segunda tentativa, o animal foi posicionado no meio da escada e, na terceira tentativa, colocado na base da escada. Entre cada tentativa houve 60 segundos de recuperação com o rato posicionado dentro da câmara no topo da escada ⁷². Após três dias de adaptação, foi avaliada a carga máxima por meio de subidas em escada com aumento progressivo da carga. Inicialmente, foi colocado peso correspondente a 75% do peso corporal do animal que, progressivamente, foi acrescido de 15% até que o rato não conseguisse subir todos os degraus. Foram realizadas, no máximo, nove tentativas.

A maior carga com a qual o rato foi capaz de subir o comprimento total da escada foi considerada sua capacidade máxima. O teste foi repetido após 45 dias, para ajuste da intensidade do exercício, e ao final do período experimental, de 12 semanas.

Protocolo de exercício físico resistido

O exercício físico resistido foi realizado três vezes por semana, em dias alternados, com aumento gradativo de carga. Inicialmente, houve período de adaptação, no qual os ratos foram estimulados a subir a escada sem carga; posteriormente, foi adicionada carga correspondente a 15% do peso corporal, que foi aumentada gradativamente, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 2). A partir da segunda semana, as sessões de treinamento consistiram de quatro subidas na escada com cargas correspondentes a 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade total máxima, previamente estabelecida para cada rato. O período de recuperação entre cada subida foi de 2 minutos. O treinamento foi mantido até o final do período experimental, de três meses. O protocolo foi adaptado daquele utilizado por Leite et al. ⁷³.

Tabela 2. Adaptação ao protocolo de exercício físico resistido

Dias	Carga (% peso corporal)	Quantidade de subidas
1º	0	3
2º	15	3
3º	30	3

Avaliação estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

As estruturas cardíacas e a função ventricular esquerda foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico. Após anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg), por via intramuscular, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do

ecocardiograma. Foi utilizado equipamento da marca General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis estruturais e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório ⁷⁴. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography ⁷⁵. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessuras diastólicas da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); espessuras sistólicas da parede posterior do VE (ESPP) e do septo interventricular (ESSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE); áreas sistólica e diastólica do VE; e perímetros do VE e da área infartada do VE. A espessura relativa do VE foi calculada como $2 \times EDPP/DDVE$. A massa do VE foi calculada pela fórmula $[(DDVE+EDPP+EDSIV)^3-DDVE^3] \times 1,04$, na qual 1,04 representa a densidade específica do miocárdio, e o índice de massa do VE pela divisão da massa do VE pelo peso corporal. O tamanho do infarto foi calculado pela divisão da medida endocárdica do segmento infartado pelo perímetro endocárdico total. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. endoc.): $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$; porcentagem de encurtamento mesocárdico (% enc. mesoc.): $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)$; velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior do VE; fração de ejeção (FE): $(DDVE^3 - DSVE^3)/DDVE^3$; velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular; e porcentagem de variação da área do VE. Adicionalmente, foi calculado o índice de performance miocárdica do VE (índice de Tei). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; tempo de desaceleração da onda E (TDE); tempo de relaxamento isovolumétrico

(TRIV) em valor absoluto e normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn): $TRIV/(R-R)^{0,5}$, onde R-R é a distância entre dois complexos R ao eletrocardiograma, em segundos; e picos de velocidade de deslocamentos diastólicos inicial do anel mitral (E') e tardio do anel mitral (A') obtidos por Doppler tissular.

Coleta da musculatura esquelética e de outros tecidos para análise

A coleta de tecidos foi realizada na Unidade de Pesquisa Experimental, UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Foi realizado ecocardiograma final 48 horas após as avaliações finais de esforço e de carga máxima e, um dia após a realização do ecocardiograma final, os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios, os ventrículos direito e esquerdo, incluindo o septo, foram dissecados e pesados separadamente. O sangue foi centrifugado a 20° C, 4000 rpm durante 15 minutos; amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C. A seguir, foram dissecados os músculos gastrocnêmios dos membros pélvicos direito e esquerdo. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. Neste trabalho, somente os músculos gastrocnêmios foram estudados. O peso dos pulmões foi utilizado para avaliação do grau de congestão pulmonar. Fragmentos do pulmão, ventrículos direito e esquerdo foram pesados antes e após desidratação em estufa a 65°C por 72 h para avaliar o grau de edema.

Análise histológica do coração

Amostras anelares do VE foram fixadas em solução de formal a 10% por 24 horas e, a seguir, lavadas em água corrente e transferidas para solução com etanol 70%, de acordo com método previamente descrito ⁶⁹. Para o cálculo do tamanho do infarto, foi realizado corte do VE na distância de 5 a 6 mm do ápice. Os valores obtidos nessa região correspondem à média dos valores obtidos em cortes de todo o coração. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com

Picosirius Red e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais. O valor foi expresso em porcentagem do VE.

Análise histológica da musculatura esquelética

O trofismo no músculo gastrocnêmio foi avaliado por análise morfométrica. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do cristato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina. A área seccional das fibras musculares foi avaliada com o auxílio de microscópio, como previamente descrito. Em cada lâmina, foi efetuada a mensuração de 150 a 200 fibras do músculo gastrocnêmio. Todas as análises histológicas foram realizadas no software Image J, por um mesmo examinador cego ao tratamento.

Avaliação do metabolismo energético

Foram analisadas a atividade máxima de enzimas chave que participam do metabolismo de glicose: hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1), fosfofrutoquinase (PFK, E.C.2.7.1.11) e piruvato quinase (PK, EC 2.7.1.40); da via anaeróbica: lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27); do ciclo de Krebs e via aeróbica: citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) e da oxidação de ácidos graxos: β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (BHADH, E.C.1.1.1.35) e carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1, EC 2.3.1.21). Amostras do músculo gastrocnêmio (30mg de tecido) foram homogeneizadas em 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, e coquetel de inibidor de protease, pH 7,4,

utilizando esferas de zircônio (0,5 mm) durante 5 minutos a 4 °C em homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance, Inc., NY, USA). O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25 °C utilizando espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Avaliação da enzima hexoquinase foi realizada conforme descrito por Crabtree & Newsholme (1972) utilizando 20 µL de amostra e tampão de ensaio contendo 75 mM Tris-HCl, 7,5mM MgCl₂, 0,8 mM EDTA, 1,5 mM KCl, 4 mM 2 mercaptoetanol, 0,4 mM NADP⁺, 2,5 mM ATP, 1 mM glicose, 1,4 unidades glicose-6-fosfato desidrogenase, 0,05% Triton X-100. A reação foi iniciada adicionando glicose e monitorada no comprimento de onda de 340nm ⁷⁶. Para avaliação da atividade da fosfofrutoquinase foram utilizados 10 µL de amostra e tampão de ensaio contendo 50mM Tris HCl, 2mM MgSO₄, 5mM KCl, 0,2mM NADH, 1mM ATP, 3mM de Frutose 6 fosfato (F6P), 2mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 2U de lactato desidrogenase (LDH) e 4U de piruvato quinase (PK), 0,05% triton x-100. A reação foi iniciada pela adição da F6P e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorbância em 340 nm ⁷⁷. Para a mensuração da atividade da piruvato quinase (PK), utilizamos 2 µL de amostra e tampão contendo mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0,05% Triton x 100, 9 U LDH, 0,17 mM NADH, 5 mM ADP, e como iniciador da reação, 2 mM de PEP. A leitura da absorbância foi efetuada a 340nm em placas ultravioleta (UV) ⁷⁸. Para as análises enzimáticas de LDH, utilizamos kits comerciais da LABTEST, seguindo o protocolo do fabricante (LDH liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, ref. 86). A atividade da citrato sintase foi medida numa mistura de reação contendo 100 mM de Tris-HCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 0,2 mM ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico), 0,3 mM de acetil-CoA, e 0,5 mM de oxaloacetato (omitido no controle), pH 8,1 e 10 µL da amostra. A taxa de alteração da absorbância foi monitorada a 412 nm ⁷⁹. A atividade máxima da enzima β-hidroxiacil-CoA desidrogenase foi realizada adicionando 5 µL de amostra em um tampão de reação contendo 100mM KH₂PO₄, 0,4 mM NADH. A reação foi iniciada com 5,4mM de acetoacetil-CoA e as absorbâncias lidas a 340 nm em placa UV de 96 poços ⁸⁰. A atividade máxima da enzima carnitina palmitoiltransferase 1 foi avaliada utilizando 10 µL de amostra

em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 60mM de Tris-HCl, 1,5mM EDTA, 0,25mM de DTNB, Triton X-100 0,05% (v/v), 0,035mM palmitoil-CoA. A reação foi iniciada com a adição de 1,25mM L-carnitina e as absorvâncias lidas a 412 nm ⁸¹.

Os ensaios enzimáticos descritos nesta seção foram realizados no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, sob orientação do pesquisador Dr. Gilson Murata.

Atividade enzimática da creatina quinase

A atividade da creatina quinase foi avaliada adicionando 10 µL da amostra em tampão de ensaio contendo 50mM Tris HCl, 2mM MgSO₄, 5mM KCl, 0,2mM NADH, 1mM ATP, 3mM de 10mM de Creatina, 2mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 2U de lactato desidrogenase (LDH) e 4U de piruvato quinase (PK), 0,05% triton x-100. A reação foi iniciada pela adição da creatina e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorvância em 340 nm em um leitor de placas de 96 poços, considerado como branco a ausência do homogenato. O ensaio enzimático para determinação da atividade de creatina quinase foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, sob orientação do pesquisador Dr. Gilson Murata.

Determinação da concentração muscular de lactato e glicogênio

Amostras do músculo gastrocnêmio foram desproteinizadas e homogeneizadas em 3,67% de ácido perclórico utilizando esferas de zircônio (0,5 mm) durante 5 minutos a 4°C em homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance, Inc., NY, USA), posteriormente neutralizado com solução de 3 M de KOH. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Para a determinação da concentração de lactato muscular, com ácido perclórico, utilizamos kit de lactato (LABTEST), considerado como branco o ácido perclórico neutralizado (Lactato enzimático, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, ref.138). As absorvâncias foram lidas utilizando placa de 96 poços em espectrofotômetro *SpectraMax Plus* a 340 nm.

Para determinação da concentração de glicogênio, as amostras foram homogeneizadas como descrito acima. Uma alíquota do sobrenadante foi recolhida e neutralizada com KHCO_3 a 1M para determinação da concentração de glicogênio utilizando-se o método da amiloglicosidase. Resumidamente, o método é baseado na conversão do glicogênio em glicose por ação da amiloglicosidase (*Sigma*, Saint Louis, MO, EUA). A concentração de glicose foi determinada utilizando kit comercial específico, por método enzimático-colorimétrico (Glicose Liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, ref.133). A concentração de glicogênio foi obtida pela avaliação da glicose na amostra após digestão enzimática.

A determinação da concentração muscular de glicogênio e lactato foi realizada no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, sob orientação do pesquisador Dr. Gilson Murata.

Análise da atividade de enzimas antioxidantes e dosagem de hidroperóxido de lipídeo

Amostras de músculo esquelético (100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min, em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase e dosagem de hidroperóxido de lipídeo⁸⁷. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada por meio da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido. A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada pela alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico. A atividade

enzimática da catalase (Cat, E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 12,5 μ L de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240 nm.

A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada pela oxidação do Fe²⁺ (sulfato ferroso amoniacal). O Fe³⁺ formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas a 560 nm.

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, sob orientação da Prof. Dra. Ana Angélica Fernandes

Determinação de espécies reativas de oxigênio

Para avaliação da produção *in situ* de espécies reativas de oxigênio do músculo gastrocnêmio foi utilizado dihidroetídio (DHE; Sigma). Resumidamente, amostras de músculo gastrocnêmio foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do cristato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras. Os cortes foram incubados em 10 μ M de DHE (diluído em 0,01% de metanol) por 30 min a 37 °C ao abrigo da luz, e então lavados três vezes em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. Em seguida, para corar os núcleos celulares, os cortes foram incubados com DAPI. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e as lamínulas alocadas utilizando-se Prolong Gold Antifade Reagent (Life Technologies). As lâminas foram analisadas em microscópio específico para detecção de imunofluorescência (Olympus BX51, equipado com emissor de fluorescência Olympus U-RFL-T e câmera Olympus DP72, Panasonic).

Quantificação de proteínas oxidadas

As proteínas oxidadas foram avaliadas pela quantificação de grupos carbonila por kit OxyBlot (Millipore item #S7150), seguindo as instruções do fabricante.

Expressão proteica por Western blot

A expressão das proteínas ERK 1/2 da família MAPK, da subunidade p65 da via NF- κ B, em suas formas total e fosforilada, do complexo Proteossoma 20S da via ubiquitina proteassoma, e Pax-7 foi avaliada por Western blot, de acordo com método previamente descrito^{82, 83}. Fragmentos do músculo gastrocnêmio (50 mg de tecido) foram homogeneizados em 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, e inibidores de protease, pH 7,4, utilizando esferas de zircônio (0,5 mm) durante 5 min a 4 °C em homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance, Inc., NY, USA). As amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Sigma, ref. S3401) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCl 240 mM, pH 6,8, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mM, pH 8,8, poliacrilamida 40%, APS e Temed), na concentração de 6 a 12%, dependendo do peso molecular da proteína analisada. A corrida eletroforética foi efetuada a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por aproximadamente 2 h, com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Regiões inespecíficas de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1%) por 60 min à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1,0 M, pH 7,4, NaCl 5,0 M e Tween 20) e incubada overnight, a 4°C, com o anticorpo primário diluído na solução de bloqueio, sob agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 90 min. A seguir, a membrana foi lavada com TBST e os sinais foram visualizados com auxílio de kit para quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e analisador de imagens Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). As bandas obtidas

nas imagens foram quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology).

Análise de ativação de células satélites

Seções transversais obtidas em criostato do músculo gastrocnêmio foram lavadas quatro vezes em PBS para remover o Tissue-Tek, fixadas em metanol por 10 min a 4 °C, lavadas três vezes e bloqueadas em BSA 5% diluído em PBS por 30 min. As lâminas foram incubadas com solução de bloqueio contendo o anticorpo primário (anti-NCAM, anti-MyoD e anti-MHC neonatal), durante a noite, a 4 °C. Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário diluído em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com DAPI por 5 min. As lamínulas foram alocadas utilizando-se Prolong Gold Antifade Reagent (Life Technologies). As lâminas foram analisadas em microscópio específico para detecção de imunofluorescência (Olympus BX51, equipado com emissor de fluorescência Olympus U-RFL-T e câmera Olympus DP72, Panasonic).

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão ou mediana e quartis, de acordo com a distribuição. Para variáveis paramétricas, as comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância complementada pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para variáveis não paramétricas, as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste de Goodman foi utilizado para comparar a frequência de sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca entre os grupos infartados. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

1. Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

Após a indução do infarto, o desenvolvimento de insuficiência cardíaca ocorre, habitualmente, em ratos com infartos moderados a grandes, que acometem porcentagem equivalente ou superior a 30% da massa do ventrículo esquerdo. Portanto, ratos com infartos pequenos, menor que 30%, foram excluídos do presente estudo após análise histológica, totalizando 13 animais do grupo IM-S, 7 do grupo IM-R e 12 do grupo IM-A. Além disso, durante o experimento morreram 4 ratos do grupo IM-S, 1 do grupo IM-R e 2 do grupo IM-A. Sendo assim, terminamos o estudo com 20 animais no grupo Sham, 9 no grupo IM-S, 13 no grupo IM-R e 9 no grupo IM-A.

A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca está apresentada na Tabela 3. O grupo IM-S (n=9) teve a seguinte frequência de alterações compatíveis com insuficiência cardíaca: trombo em átrios 1, efusão pleural 1, congestão pulmonar 4, hipertrofia do ventrículo direito 3 e ascite 2. No grupo IM-A (n=9), trombo em átrios e efusão pleural foram observados em 2 animais, congestão pulmonar em 1 e ascite em 4. No grupo IM-R (n=13), trombos em átrios e congestão pulmonar foram observados em 3 ratos, efusão pleural e hipertrofia do VD em 4 e ascite em 2 ratos. A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca não diferiu significativamente entre os grupos infartados.

O peso corporal inicial e final não diferiu entre os grupos. As variáveis anatômicas estão apresentadas na Tabela 4. O peso absoluto e normalizado pelo peso corporal dos átrios e pulmões foram maiores nos grupos IM-S e IM-R comparados ao Sham. O peso absoluto do VD foi maior nos grupos IM-S e IM-R que no grupo Sham; no grupo IM-A, essa variável foi menor que nos grupos IM-S e IM-R. O peso do músculo gastrocnêmio, em valor absoluto, foi menor no grupo IM-A que no Sham; quando normalizado pelo peso corporal, não diferiu entre os grupos.

O tamanho do infarto, avaliado por análise histológica do ventrículo esquerdo, não diferiu entre os grupos (IM-Sed $39,6 \pm 5,9\%$; IM-A $42,8 \pm 8,9\%$; IM-R $38,2 \pm 6,4\%$, $p > 0,05$).

2. Teste de esforço

No teste de esforço realizado antes do protocolo de exercícios, a distância percorrida e o tempo de permanência na esteira não diferiram entre os grupos infartados, que apresentaram pior capacidade funcional que o grupo Sham. Ao final do período experimental, o desempenho físico foi melhor no grupo IM-A que nos demais grupos, caracterizado por maior distância percorrida e tempo de permanência na esteira (Tabela 5).

3. Teste de carga máxima

O teste de carga máxima foi realizado antes e após os protocolos de exercícios. Na avaliação inicial, apenas o grupo IM-S obteve menor valor de carga máxima comparado ao Sham. Ao final do período de exercício, o grupo IM-R obteve valor estatisticamente maior no teste de carga máxima que os demais grupos (Figura 1).

4. Avaliação ecocardiográfica

Na Tabela 6, estão apresentadas as variáveis cardíacas estruturais e nas Tabelas 7 e 8, as variáveis de função do VE antes do protocolo de exercícios físicos. Os grupos com IM apresentaram hipertrofia ventricular caracterizada por aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do VE, da espessura diastólica da parede posterior do VE, da massa do VE e das áreas diastólica e sistólica do VE. Funcionalmente, os grupos infartados apresentaram disfunção sistólica, caracterizada pela redução das porcentagens de encurtamento endocárdico e mesocárdico, da velocidade de encurtamento da parede posterior, da fração de ejeção, da porcentagem de variação da área do VE, e de aumento do índice de Tei. Apenas o grupo IM-R apresentou redução das ondas S comparado ao grupo Sham. Em relação à função diastólica, o grupo IM-S apresentou aumento da onda E mitral em relação aos grupos Sham e IM-A. O grupo IM-A apresentou aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos ou normalizados pela

frequência cardíaca em relação ao Sham. A relação E/E' média foi maior nos grupos IM-Sed e IM-R que no Sham.

Os dados referentes à avaliação ecocardiográfica ao final do experimento estão apresentados nas Tabelas 9 a 11. Os grupos com infarto do miocárdio mantiveram o padrão de hipertrofia ventricular observado na avaliação inicial. O grupo IM-R teve menor espessura relativa da parede do VE que o grupo IM-A.

Funcionalmente, os ratos infartados persistiram com disfunção sistólica, caracterizada pela redução das porcentagens de encurtamento endocárdico e mesocárdico, da fração de ejeção, da porcentagem de variação de área. Entretanto, a redução da onda S média, observada inicialmente apenas no grupo IM-R, foi reduzida em todos os grupos infartados comparados ao Sham. A função diastólica não diferiu entre os grupos.

5. Análise histológica da musculatura esquelética

As áreas seccionais das fibras do músculo gastrocnêmio, mensuradas em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina, não diferiram estatisticamente entre os grupos (Sham 3.660 ± 701 , IM-S 3.594 ± 500 , IM-A 4.200 ± 521 , IM-R 3.885 ± 462 , $p > 0,05$).

6. Atividade de enzimas do metabolismo energético

A atividade de enzimas que participam do metabolismo de glicose e ácido graxos no músculo gastrocnêmio não diferiu significativamente entre os grupos, exceto pelo aumento da atividade da piruvato quinase no grupo IM-S comparado aos demais grupos e da atividade da BHADH no grupo IM-S em relação ao Sham (Tabela 12).

7. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase foi menor no grupo IM-S que nos grupos Sham e IM-R. A atividade da catalase foi maior e a da glutationala peroxidase menor nos grupos infartados em relação ao Sham. O protocolo de exercício aeróbio foi capaz de atenuar a queda na atividade dessa enzima, quando comparado ao grupo de animais sedentários e de animais que realizaram exercício resistido (Tabela 13).

8. Produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio, avaliada pela oxidação de DHE detectada por imunofluorescência, foi maior no grupo IM-S que no grupo Sham (Sham $1,00 \pm 0,78$; IM-S $1,97 \pm 0,39$; IM-A $1,35 \pm 0,63$; IM-R $1,50 \pm 0,47$ unidades arbitrárias; $p < 0,05$ IM-S vs Sham; Figura 3).

9. Concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo

A concentração de hidroperóxido de lipídeo no gastrocnêmio foi menor no grupo IM-A comparado aos demais grupos [Sham 99,5 (83,4-117); IM-S 105 (94,5-135); IM-A 65,6 (59,8-81,7); IM-R 108 (89,4-116) nmol/g de tecido; Figura 4].

10. Carbonilação proteica

Foi quantificada a expressão de proteínas carboniladas de peso molecular entre 25 e 100 KDa no músculo gastrocnêmio, que não diferiu entre os grupos (Sham $1,00 \pm 0,41$; IM-S $0,69 \pm 0,33$; IM-A $0,46 \pm 0,14$; IM-R $0,55 \pm 0,36$ unidades arbitrárias; $P > 0,05$; Figura 5).

11. Expressão proteica por Western blot

A expressão das proteínas phospho-ERK, ERK total, phospho-p65 NF-kB, p65NF-kB total, proteassoma 20S e Pax-7, normalizadas pela expressão da proteína GAPDH, não diferiu entre os grupos (Tabela 14; Figura 6).

12. Ativação de células satélites

A ativação de células satélites, avaliada por marcação imunofluorescente das proteínas miosina neonatal, MyoD e NCAM não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Figuras 7 a 9).

Tabela 3. Frequência (porcentagem e número absoluto) de sinais clínico e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca

	IM-S (n=9)	IM-A (n=9)	IM-R (n=13)
Trombo em átrios	11% (1)	22% (2)	23% (3)
Efusão pleural	11% (1)	22% (2)	30% (4)
Congestão pulmonar	44% (4)	11% (1)	23% (3)
Hipertrofia do VD	33% (3)	—	30% (4)
Ascite	22% (2)	44% (4)	15% (2)

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais; VD: ventrículo direito. Teste de Goodman; P>0,05.

Tabela 4. Variáveis anatômicas

	Sham (n=20)	IM-S (n=09)	IM-A (n=09)	IM-R (n=13)
PC (g)	532 ± 47	544 ± 63	511 ± 53	528 ± 78
VE (U/S)	4,05 (3,78-4,26)	4,38 (3,94-5,10)	4,00 (3,77-4,42)	4,20 (4,08-4,28)
VD (g)	0,23 (0,21-0,26)	0,36 (0,29-0,47)*	0,22 (0,20-0,27)#	0,34 (0,30-0,52)*†
VD/PC (mg/g)	0,44 (0,40-0,47)	0,71 (0,52-0,90)*	0,46 (0,36-0,56)	0,65 (0,55-1,01)*†
VD (U/S)	4,05 (3,80-4,26)	4,38 (3,94-5,10)	4,00 (3,77-4,42)	4,20 (4,08-4,28)
Átrios	0,10 (0,08-0,11)	0,15 (0,11-0,31)*	0,15 (0,10-0,21)	0,17 (0,14-0,23)*
Átrios/PC (mg/g)	0,20 (0,15-0,24)	0,32 (0,21-0,54)*	0,27 (0,20-0,35)	0,31 (0,23-0,46)*
Átrios (U/S)	4,18 ± 0,85	4,50 ± 1,25	4,48 ± 0,95	4,23 ± 0,70
Pulmão (g)	1,93 ± 0,62	2,98 ± 0,89*	2,39 ± 0,53	2,64 ± 0,70*
Pulmão/PC (mg/g)	3,61 ± 1,05	5,62 ± 1,92*	4,67 ± 1,00	5,20 ± 1,97*
Pulmão (U/S)	4,49 (4,38-4,54)	4,28 (3,89-4,87)	4,87 (4,30-5,32)	4,50 (4,17-4,90)
Gastro (g)	2,85 (2,57-3,03)	2,50 (2,38-2,85)	2,40 (2,13-2,60)*	2,67 (2,29-2,91)
Gastro/PC (mg/g)	5,45 (4,70-5,86)	4,86 (4,45-5,09)	4,50 (4,42-5,40)	4,84 (4,54-5,19)

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido. PC: peso do corpo; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; U/S: relação entre peso úmido e peso seco; Gastro: peso do músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney. P<0,05: * vs Sham; # vs IM-Sed; † vs IM-A.

Tabela 5. Distância e tempo percorridos no teste de esforço em esteira antes e após treinamento físico.

		Sham (n=14)	IM-S (n=8)	IM-A (n=8)	IM-R (n=10)
Tempo (minutos)	Inicial	29,5 ± 3,09	23,4 ± 3,31*	24,0 ± 3,93*	24,1 ± 3,49*
	Final	24,9 (20,8-27,4)	22,4 (19,3-25,1)	34,8 (31,0-37,8)*#	24,8 (22,3-25,6)†
Distância (metros)	Inicial	482 ± 90,7	315 ± 81,1*	335 ± 103*	334 ± 92,0*
	Final	328 ± 93,6	282 ± 72,4	563 ± 150*#	336 ± 52,7†

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham; # vs IM-Sed; † vs IM-A.

Tabela 6. Avaliação ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=20)	IM-S (n=09)	IM-A (n=09)	IM-R (n=13)
PC (g)	463 ± 41,9	458 ± 42,7	443 ± 42,4	447 ± 46,9
DDVE (mm)	8,02 (7,74-8,37)	10,4 (10,0-10,9)*	9,64 (9,05-10,2)*	9,79 (9,63-10,4)*
DDVE/PC (mm/Kg)	17,7 (16,9-18,5)	23,2 (21,1-25,2)*	23,5 (19,2-24,7)*	21,9 (20,9-26,2)*
DSVE (mm)	4,10 (3,85-4,32)	8,16 (7,97-8,69)*	7,16 (6,50-8,55)*	7,89 (7,15-8,62)*
EDPP (mm)	1,32 (1,27-1,37)	1,65 (1,52-1,96)*	1,57 (1,48-1,73)*	1,65 (1,49-1,76)*
EDSIV (mm)	1,33 (1,27-1,37)	1,53 (1,30-1,98)	1,35 (1,19-1,44)	1,40 (1,27-1,63)
Esp.rel.VE	0,33 (0,32-0,34)	0,31 (0,30-0,35)	0,34 (0,29-0,38)	0,32 (0,30-0,37)
AO (mm)	4,01 (3,83-4,01)	3,94 (3,74-4,01)	3,83 (3,81,97)	3,83 (3,57-4,01)
AE (mm)	5,38 (5,15-5,66)	7,66 (6,66-8,50)*	6,57 (6,09-6,86)*	6,75 (6,18-7,56)*
AE/AO	1,36 (1,30-1,41)	1,94 (1,66-2,33)*	1,67 (1,53-1,78)*	1,80 (1,53-2,04)*
AE/PC (mm/Kg)	11,8 (10,5-12,7)	17,4 (13,9-19,6)*	14,1 (13,2-16,4)*	15,0 (12,9-17,2)*
Massa VE (g)	0,73 (0,66-0,80)	1,53 (1,21-1,75)*	1,15 (1,07-1,24)*	1,13 (1,08-1,73)*
Índ. MVE (g/Kg)	1,56 (1,51-1,68)	3,58 (2,63-3,97)*	2,64 (2,43-2,96)*	2,74 (2,42-3,73)*
Área diast. (mm²)	45,5 (37,1-49,4)	86,1 (77,8-101,8)*	71,5 (67,5-86,0)*	77,60 (71,85-90,60)*
Área sist. (mm²)	15,8 (12,5-17,7)	61,6 (55,2-74,5)*	50,4 (37,6-65,5)*	52,2 (42,8-60,4)*
Perímetro (mm)	Sham	36,32 ± 2,88	33,62 ± 2,21	34,38 ± 3,03
IM perímetro (mm)	Sham	13,8 (12,2-17,1)	11,8 (9,4-16,6)	13,0 (10,0-16,6)
% infarto	Sham	41,17 ± 7,61	37,85 ± 10,76	37,56 ± 6,72

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. PC: peso corporal; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP e EDSIV: espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular, respectivamente; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Índ. MVE: índice de massa do VE; Área diast. e Área sist.: áreas diastólica e sistólica do VE, respectivamente; IM: infarto do miocárdio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis; análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica inicial da função sistólica do VE

	Sham (n=20)	IM-S (n=09)	IM-A (n=09)	IM-R (n=13)
FC (bpm)	284 ± 25,6	295 ± 26,1	290 ± 54,0	275 ± 23,9
% enc. endoc.	48,8 ± 3,77	20,7 ± 6,20*	23,2 ± 5,81*	21,9 ± 6,24*
% enc. mesoc.	56,0 ± 3,32	31,4 ± 5,78*	33,3 ± 5,32*	32,4 ± 5,99*
VEPP (mm/s)	39,8 ± 5,44	24,5 ± 7,67*	31,2 ± 8,53*	28,6 ± 8,37*
Tei	0,45 (0,43-0,53)	0,74 (0,61-0,89)*	0,70 (0,54-0,80)*	0,76 (0,62-0,82)*
FE (%)	86 (84-88)	51 (42-57)*	59 (46-62)*	50 (41-59)*
FVA (%)	66,2 (62,7-69,2)	26,1 (20,3-37,4)*	28,2 (26,5-43,6)*	33,1 (29,1-40,1)*
S lateral (cm/s)	3,64 ± 0,45	3,26 ± 0,49	3,26 ± 0,66	3,03 ± 0,43*
S septal (cm/s)	3,31 ± 0,31	3,01 ± 0,28	3,11 ± 0,48	2,76 ± 0,59*
S média (cm/s)	3,47 ± 0,33	3,13 ± 0,36	3,18 ± 0,55	2,90 ± 0,46*

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. VE: ventrículo esquerdo; FC: frequência cardíaca (batimentos por minuto); % enc. endoc. e mesoc.: porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, respectivamente; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; FE: fração de ejeção; FVA: fração de variação de área do VE; S: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral das paredes lateral e septal e sua média. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham.

Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica inicial da função diastólica do VE

	Sham (n=20)	IM-S (n=09)	IM-A (n=09)	IM-R (n=13)
E mitral (cm/s)	78,5 (75,0-84,8)	99,0 (89,0-108,5)*	77,5 (68,8-90,5)#	83,0 (77,0-100,5)
A mitral (cm/s)	47,0 (44,0-53,0)	44,0 (21,0-65,0)	54,5 (41,0-81,8)	42,0 (22,5-58,0)
E/A	1,70 (1,49-1,87)	2,02 (1,38-5,55)	1,34 (1,15-1,76)	1,58 (1,39-3,86)
TRIV (ms)	26,0 (22,0-26,0)	30,0 (25,0-33,0)	33,0 (30,0-37,0)*	30,0 (24,0-32,5)
TDE (ms)	48,5 (45,0-56,0)	39,0 (35,5-46,3)	41,0 (6,00-55,0)	43,0 (37,0-58,3)
TRIVn	54,6 ± 6,72	63,0 ± 10,68*	70,7 ± 11,05*	62,0 ± 13,26
E' lateral (cm/s)	4,09 ± 0,81	4,33 ± 0,86	3,53 ± 0,66	3,75 ± 0,58
E' septal (cm/s)	4,21 ± 0,74	3,87 ± 0,61	3,80 ± 1,04	3,77 ± 0,76
E' media (cm/s)	4,15 ± 0,72	4,10 ± 0,52	3,66 ± 0,47	3,76 ± 0,50
A' lateral (cm/s)	3,43 ± 1,05	3,32 ± 1,18	3,98 ± 1,33	2,89 ± 0,71
A' septal (cm/s)	2,94 ± 0,86	3,33 ± 1,09	3,49 ± 1,20	3,15 ± 0,79
A' media (cm/s)	3,18 ± 0,85	3,33 ± 1,03	3,73 ± 1,23	3,02 ± 0,71
E/E' media	19,8 ± 3,69	24,5 ± 5,38*	21,3 ± 3,22	24,5 ± 6,44*

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. VE: ventrículo esquerdo; E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; E': velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância e pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham; # vs IM-Sed.

Tabela 9. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=20)	IM-S (n=9)	IM-A (n=9)	IM-R (n=13)
PC Final (g)	548 (519 – 574)	531 (506 – 574)	507 (464 – 556)	526 (476 – 573)
DDVE (mm)	8,31 ± 0,41	11,1 ± 0,88*	10,3 ± 0,89*	10,9 ± 0,82*
DDVE/PC (mm/Kg)	15,0 (14,4-16,3)	21,5 (18,5-22,2)*	20,4 (19,3-20,8)*	20,8 (19,8-22,4)*
DSVE (mm)	4,14 (3,96 – 4,30)	8,92 (8,33 - 9,65)*	7,56 (6,71 - 8,93)*	8,71 (7,83 - 9,36)*
EDPP (mm)	1,40 (1,38-1,45)	1,80 (1,63-2,03)*	1,86 (1,69-2,00)*	1,69 (1,59-1,73)*
EDSIV (mm)	1,42 (1,40-1,45)	1,69 (1,35-1,89)	1,84 (1,33-1,99)	1,57 (1,31-1,78)
Esp. rel. VE	0,35 (0,33-0,36)	0,32 (0,30-0,36)	0,36 (0,34-0,38)	0,31 (0,28-0,32)*†
AO (mm)	4,20 ± 0,16	4,01 ± 0,23	4,02 ± 0,13	4,06 ± 0,27
AE (mm)	5,66 (5,29-6,13)	8,76 (6,82-9,23)*	7,23 (7,04-7,61)*	8,10 (6,85-8,74)*
AE/AO	1,37 (1,25-1,43)	2,22 (1,60-2,36)*	1,81 (1,74-1,84)*	1,86 (1,78-2,24)*
AE/PC (mm/Kg)	10,5 (9,22-11,1)	15,9 (11,8-17,6)*	14,1 (12,8-15,7)*	14,6 (12,6-17,2)*
Massa VE (g)	0,85 (0,76-0,92)	1,66 (1,44-2,07)*	1,39 (1,30-1,98)*	1,61 (1,37-1,79)*
Índ. MVE (g/Kg)	1,53 (1,46-1,70)	3,32 (2,63-4,11)*	3,03 (2,72-3,99)*	3,07 (2,49-3,49)*
Área diast. (mm²)	49,2 (47,2-51,2)	89,9 (83,7-98,7)*	79,3 (67,1-105)*	93,5 (78,6-107)*
Área sist. (mm²)	14,7 (14,1-17,6)	64,5 (54,0-67,5)*	49,5 (44,2-71,3)*	59,5 (46,3-77,1)*
Perímetro (mm)	Sem infarto	37,2 ± 2,86	35,2 ± 3,59	36,9 ± 3,00
IM perímetro (mm)	Sem infarto	15,5 ± 3,73	13,0 ± 3,31	13,5 ± 4,17
% infarto	Sem infarto	41,2 ± 7,75	36,5 ± 5,64	36,1 ± 9,44

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. PC: peso corporal; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP e EDSIV: espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular, respectivamente; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Índ. MVE: índice de massa do VE; Áreas diast. e sist.: áreas diastólica e sistólica do VE, respectivamente; IM: infarto do miocárdio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham; † vs IM-A.

Tabela 10. Avaliação ecocardiográfica final da função sistólica do VE

	Sham (n=20)	IM-S (n=9)	IM-A (n=9)	IM-R (n=13)
FC (bpm)	276 ± 38,8	301 ± 32,3	292 ± 37,2	292 ± 20,5
% enc. endoc.	50,1 ± 3,58	19,8 ± 6,28*	26,3 ± 10,9*	21,1 ± 6,45*
% enc. mesoc.	57,2 (55,1-59,1)	29,2 (26,4-33,7)*	37,2 (31,2-39,9)*	31,3 (27,6-36,0)*
VEPP (mm/s)	41,1 ± 5,68	25,4 ± 9,35*	29,9 ± 6,56*	28,0 ± 6,20*
Tei	0,46 ± 0,06	0,62 ± 0,14*	0,61 ± 0,09*	0,66 ± 0,12*
FE (%)	88 (85-90)	46 (40-55)*	60 (46-64)*	53 (42-60)*
FVA (%)	68,5 ± 4,73	29,7 ± 8,92*	33,6 ± 9,35*	34,5 ± 12,2*
S lateral (cm/s)	3,62 ± 0,47	3,07 ± 0,62	3,14 ± 0,74	3,00 ± 0,54*
S septal (cm/s)	3,49 ± 0,37	2,53 ± 0,44*	3,08 ± 0,72	2,85 ± 0,51*
S média (cm/s)	3,55 ± 0,36	2,80 ± 0,49*	3,11 ± 0,70*	2,93 ± 0,45*

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. FC: frequência cardíaca (batimentos por minuto); % enc. endoc. e mesoc.: porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, respectivamente; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; FE: fração de ejeção; S: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral das paredes lateral e septal e sua média. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham.

Tabela 11. Avaliação ecocardiográfica final da função diastólica do VE

	Sham (n=20)	IM-S (n=9)	IM-A (n=9)	IM-R (n=13)
E mitral (cm/s)	77,0 (73,0-85,0)	102 (75,8-123)	80,0 (66,0-85,0)	77,5 (71,0-122)
A mitral (cm/s)	50,1 ± 15,8	38,6 ± 27,7	59,4,1 ± 23,2	47,3 ± 20,8
E/A	1,71 (1,36-1,82)	4,27 (1,27-6,12)	1,16 (0,91-1,54)	1,41 (1,23-5,77)
TRIV (ms)	25,8 ± 3,19	26,6 ± 5,20	29,0 ± 6,91	27,5 ± 4,27
TDE (ms)	51,0 (48,0-55,8)	33,0 (33,0-51,0)	47,0 (30,8-62,5)	39,5 (37,0-53,0)
TRIVn	52,6 (49,7-61,1)	57,0 (49,0-69,0)	63,7 (54,7-74,2)	59,3 (53,2-68,5)
E' lateral (cm/s)	4,24 ± 0,86	4,39 ± 1,06	3,69 ± 1,68	4,23 ± 1,11
E' septal (cm/s)	4,09 ± 0,67	3,97 ± 1,22	3,79 ± 0,80	3,62 ± 0,94
E' media (cm/s)	4,16 ± 0,68	4,18 ± 0,76	3,74 ± 1,11	3,92 ± 0,56
A' lateral (cm/s)	3,58 ± 1,31	3,44 ± 1,31	3,96 ± 1,58	3,75 ± 0,90
A' septal (cm/s)	3,25 ± 1,12	3,40 ± 1,23	3,82 ± 0,87	3,05 ± 0,78
A' media (cm/s)	3,67 ± 1,26	3,31 ± 1,35	4,01 ± 1,59	3,83 ± 0,79
E/E' media	18,4 (16,4-21,7)	22,5 (20,4-24,9)	21,6 (16,1-23,9)	21,8 (18,8-27,8)
E'/A'	1,29 ± 0,54	1,38 ± 0,42	1,05 ± 0,49	1,07 ± 0,30

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; E': velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P>0,05.

Tabela 12. Atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético e concentração muscular de lactato e glicogênio.

	Sham n=8	IM-S n=8	IM-A n=8	IM-R n=8
Lactato	6.23 (4.88-7.65)	6.87 (5.86-7.51)	6.15 (5.30-7.15)	5.97 (5.23-7.63)
Glicogênio	20.1 (18.9-23.7)	18.3 (14.0-22.4)	18.9 (18.1-19.9)	24.2 (17.5-33.4)
CK	40.0 ± 18.3	38.6 ± 14.4	51.9 ± 19.6	54.2 ± 18.8
HK	1.82 ± 1.09	1.23 ± 0.61	1.47 ± 0.67	1.28 ± 0.48
PFK	18.2 (10.2-21.6)	17.7 (9.12-25.1)	20.5 (13.4-23.4)	20.6 (7.02-25.2)
PK	1.53 ± 0.49	2.07 ± 0.35 *	1.69 ± 0.38 #	1.64 ± 0.27 #
LDH	1.58 ± 0.31	1.92 ± 0.43	1.51 ± 0.32	1.53 ± 0.29
CS	4.91 ± 1.08	5.52 ± 1.10	5.81 ± 1.58	5.05 ± 1.39
CPT1	0.74 ± 0.18	0.90 ± 0.18	0.87 ± 0.15	0.80 ± 0.18
BHADH	14.2 (10.0-16.0)	23.6 (18.7-32.6)*	15.9 (13.8-18.0)	15.2 (11.9-18.8)

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Unidades: Lactato, mg/g tecido; Glicogênio, mg/g tecido; Creatina quinase (CK), nmol/min*mg prot; Hexoquinase (HK), nmol/min*mg prot; Fosfofrutoquinase (PFK), nmol/min*mg prot; Piruvato quinase (PK), μmol/min*mg prot; Lactato desidrogenase (LDH), μmol/min*mg prot; Citrato sintase (CS), nmol/min*mg prot; Carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), nmol/min*mg prot; β-hidroxiacil CoA desidrogenase (BHADH), nmol/min*mg prot. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham; # vs IM-Sed.

Tabela 13. Atividade de enzimas antioxidantes

	Sham (n=8)	IM-S (n=8)	IM-A (n=8)	IM-R (n=8)
SOD	14.8 ± 3.18	10.7 ± 1.85*	12.0 ± 2.76	14.9 ± 2.89#
CAT	30.0 ± 7.11	42.2 ± 6.66*	39.6 ± 7.87*	38.7 ± 7.83*
GPX	84.6 (81.0-95.2)	65.3 (54.7-69.1)*	70.6 (64.5-79.6)*#	54.7 (51.9-67.6)* †

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Unidades: Superóxido dismutase (SOD), nmol/mg prot; Catalase (CAT), μmol/g tecido; Glutathione peroxidase (GPX), nmol/mg tecido. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P<0,05: * vs Sham; # vs IM-S; † vs IM-A.

Tabela 14. Expressão proteica no músculo gastrocnêmio

	Sham	IM-S	IM-A	IM-R
p-p65	0,56 (0,51-1,75)	0,88 (0,44-0,91)	0,66 (0,39-0,86)	0,79 (0,61-0,84)
p65	1,02 (0,68-1,13)	1,20 (0,63-1,50)	1,64 (1,24-2,24)	1,18 (0,75-1,57)
p-ERK	1,00 (0,70-1,30)	0,89 (0,54-5,76)	0,82 (0,28-2,02)	0,43 (0,22-1,81)
ERK	0,96 (0,71-1,21)	1,51 (0,93-5,77)	1,61 (0,70-2,63)	1,13 (0,97-2,35)
P20S	1,00 ± 0,40	1,32 ± 0,31	1,05 ± 0,52	1,28 ± 0,59
Pax-7	1,00 ± 0,95	0,79 ± 0,36	1,31 ± 0,69	0,64 ± 0,48

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; n = 7 por grupo. Expressão proteica normalizada pela expressão da GADPH. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney; P>0,05.

Tabela 15. Análise de imunofluorescência

	Sham (n=6)	IM-S (n=8)	IM-A (n=5)	IM-R (n=6)
Miosina Neonatal	0,75 (0,75-1,50)	0,75 (0,19-1,50)	0,75 (0,38-1,50)	0,75 (0,75-1,50)
MyOD	0,67 (0,67-1,50)	0,33 (0,00-0,67)	0,67 (0,00-1,00)	0,67 (0,00-1,00)
NCAM	0,86 (0,86-1,07)	0,43 (0,00-0,86)	0,86 (0,43-2,14)	1,29 (0,86-1,93)

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a protocolo de exercício resistido; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico; n: número de animais. Teste estatístico de Mann Whitney; P>0,05.

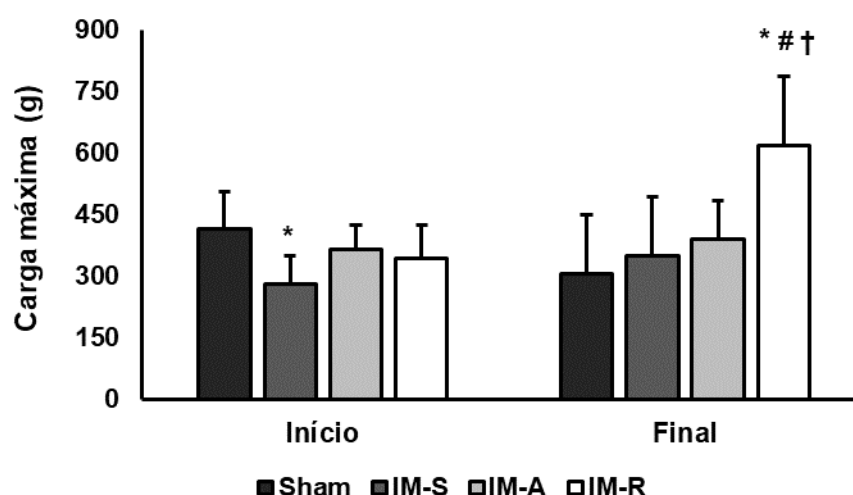


Figura 1. Capacidade máxima de carga obtida em teste de esforço realizado antes (Início) e após (Final) período de treinamento resistido. IM-S: infarto do miocárdio sedentário (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico (n=7); IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido (n=11); Sham (n=4); Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância com pós teste de Student-Newman-Keuls. P<0,05: * vs Sham; # vs IM-Sed; † vs IM-R.

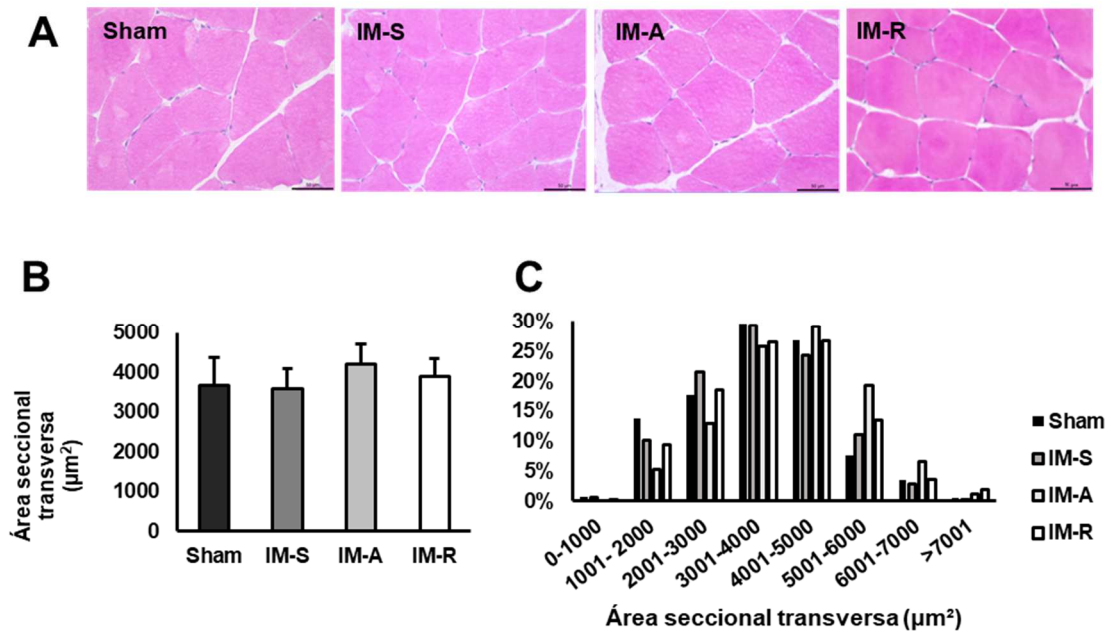


Figura 2. A) Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio corados com hematoxilina-eosina, objetiva: 40X. B) Área seccional transversa do músculo gastrocnêmio. C) Distribuição da área seccional transversa das fibras musculares. IM-S: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio (n=5), Sham (n=6).

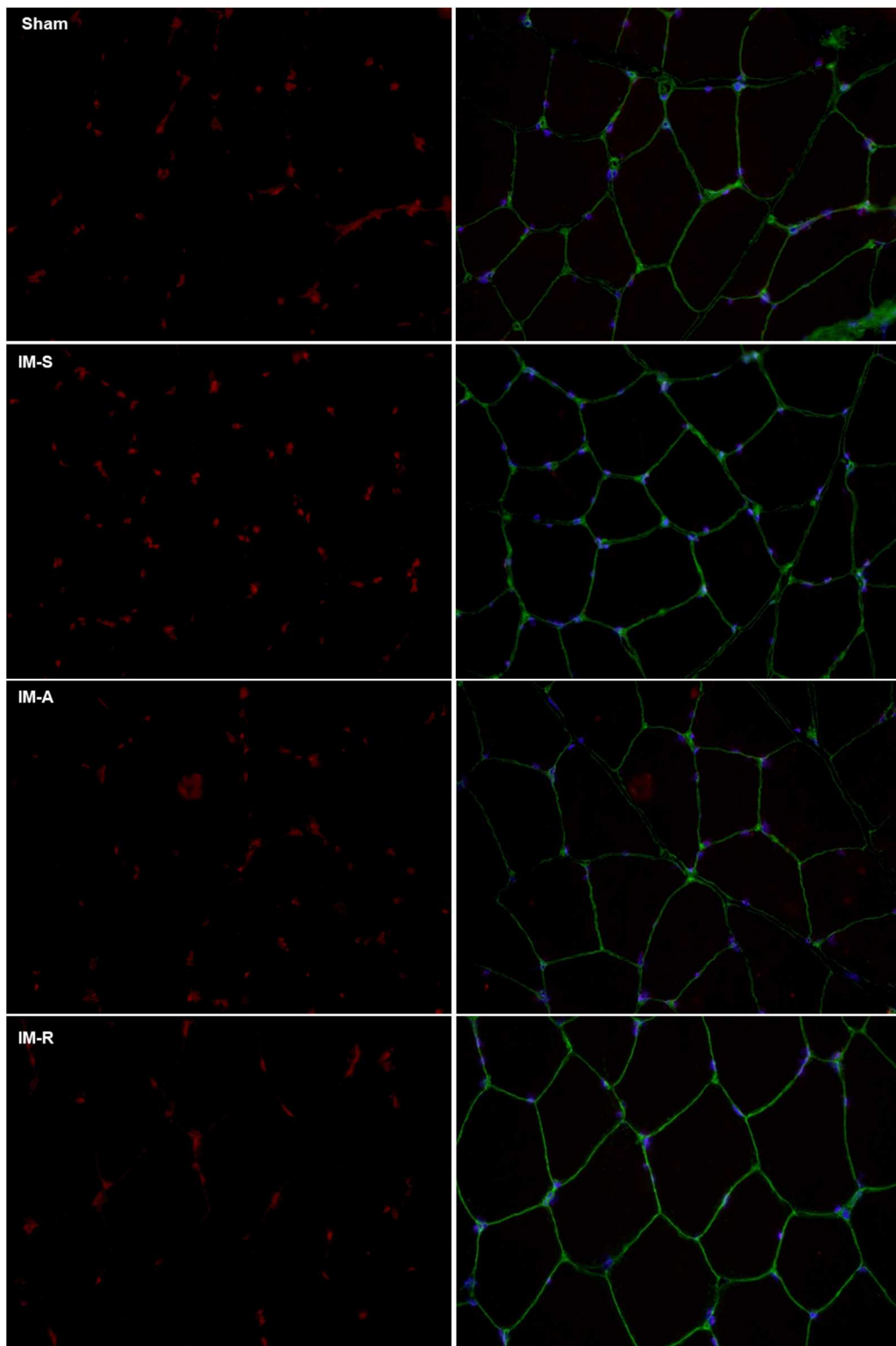


Figura 3. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio marcados por imunofluorescência para produto resultante da oxidação de DHE pelo superóxido, etídio (vermelho), DAPI para marcação dos núcleos (azul) e WGA para marcação da membrana celular (verde). Objetiva 40x. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-R: infarto do miocárdio submetido a protocolo de exercício resistido (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico (n=5), Sham (n=6). ANOVA; $p < 0,05$.

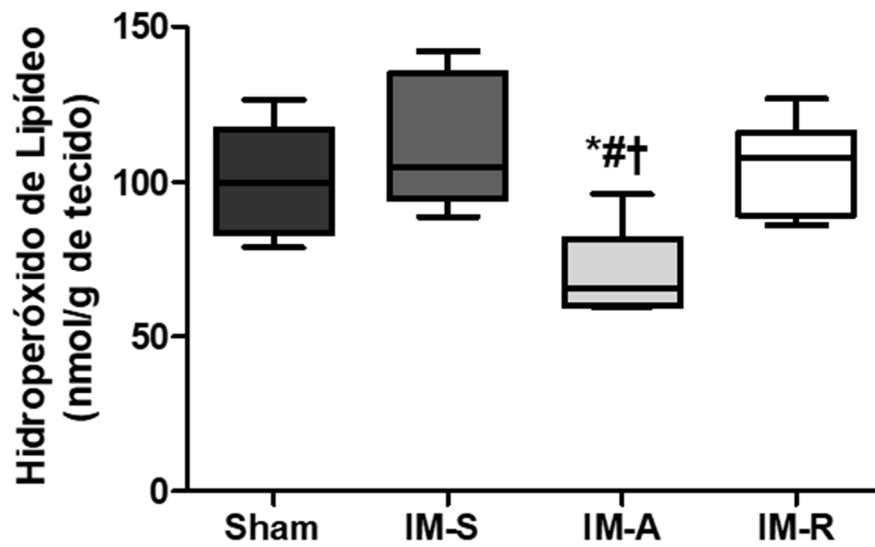


Figura 4. Concentração de hidroperóxido de lipídeo no músculo gastrocnêmio. IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio; n = 8 por grupo. Dados expressos em mediana e percentis. Teste estatístico de Mann Whitney; $P < 0,05$: * vs Sham; # vs IM-Sed; † vs IM-R.

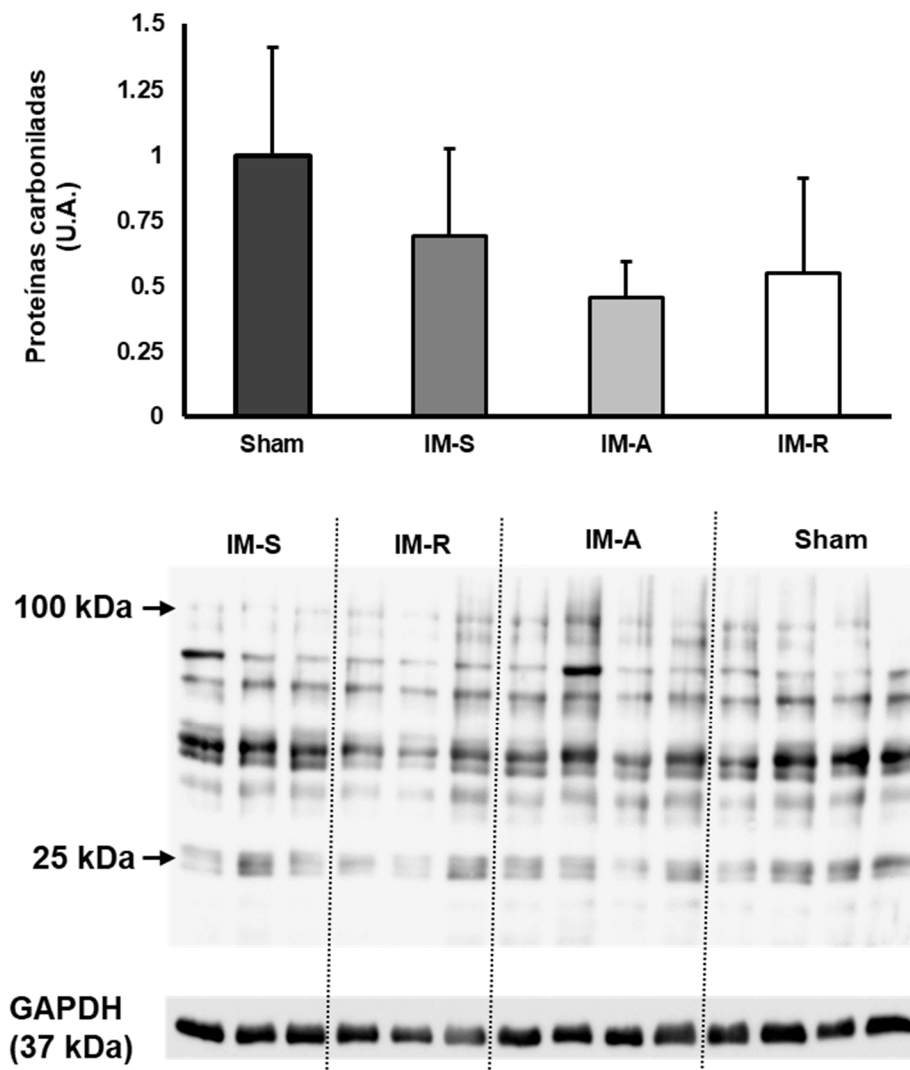


Figura 5. Expressão de proteínas carboniladas no músculo gastrocnêmio normalizada pelo GAPDH. IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico; n = 7 por grupo; UA: unidades arbitrárias. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância; $P > 0,05$.

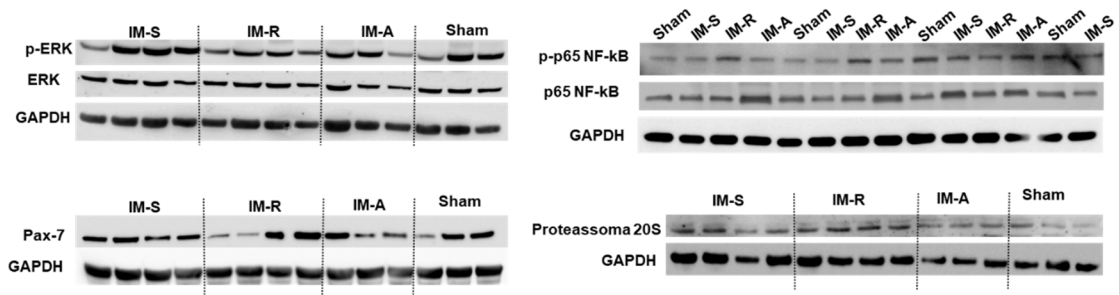


Figura 6. Bandas representativas do Western blot das proteínas fosfo-ERK, ERK, fosfo-p65 NF-kB, p65 NF-kB, Pax-7 e Proteassoma 20S, normalizadas pelo GAPDH. IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio.

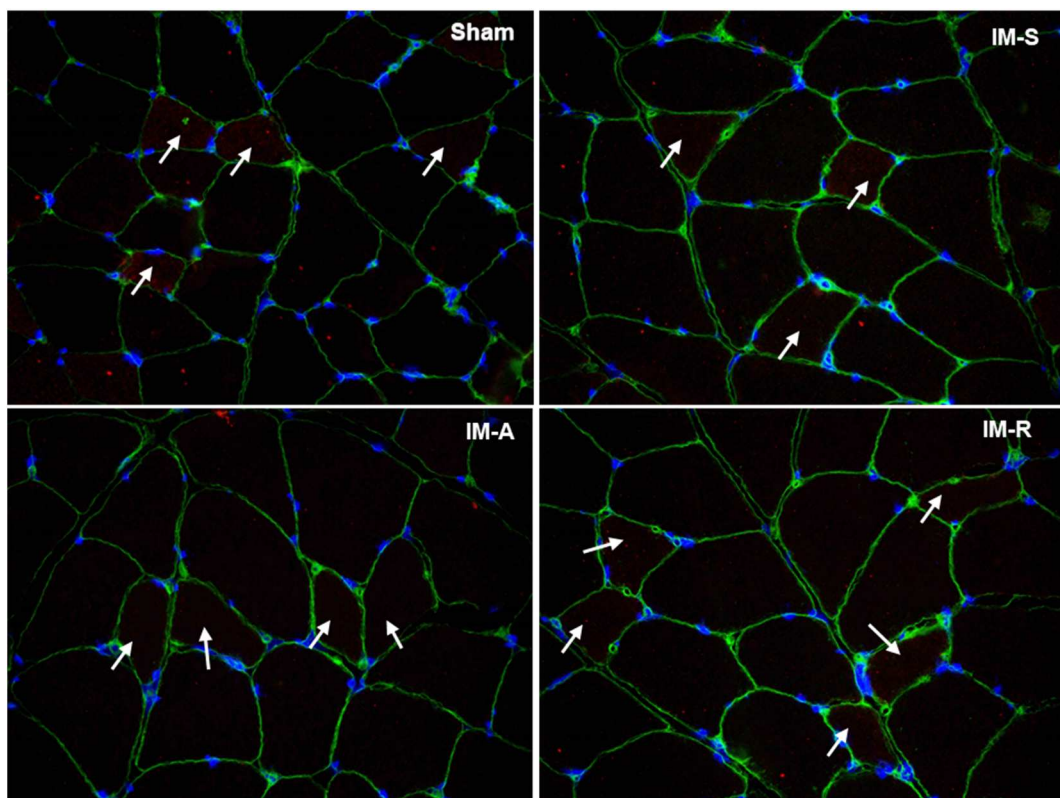


Figura 7. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio marcados por imunofluorescência para a proteína miosina neonatal (vermelho), WGA para marcação da membrana (verde) e DAPI para marcação dos núcleos (azul). As setas indicam a presença de marcação de miosina neonatal. Objetiva 40x. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-R: infarto do miocárdio submetido a protocolo de exercício resistido (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio (n=5), Sham (n=6). ANOVA; $p > 0,05$.

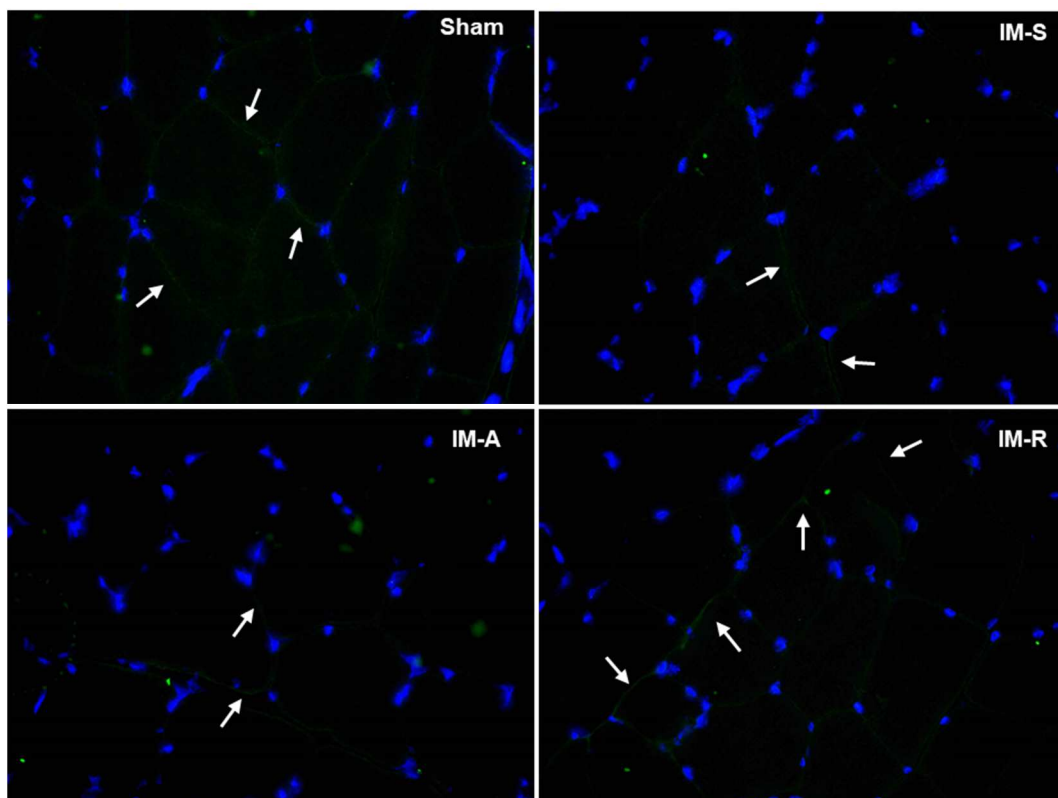


Figura 8. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio marcados por imunofluorescência para a proteína NCAM (verde) e DAPI para marcação dos núcleos (azul). As setas indicam a presença de marcação de NCAM. Objetiva 40x. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-R: infarto do miocárdio submetido a protocolo de exercício resistido (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico (n=5), Sham (n=6). ANOVA; $p>0,05$.

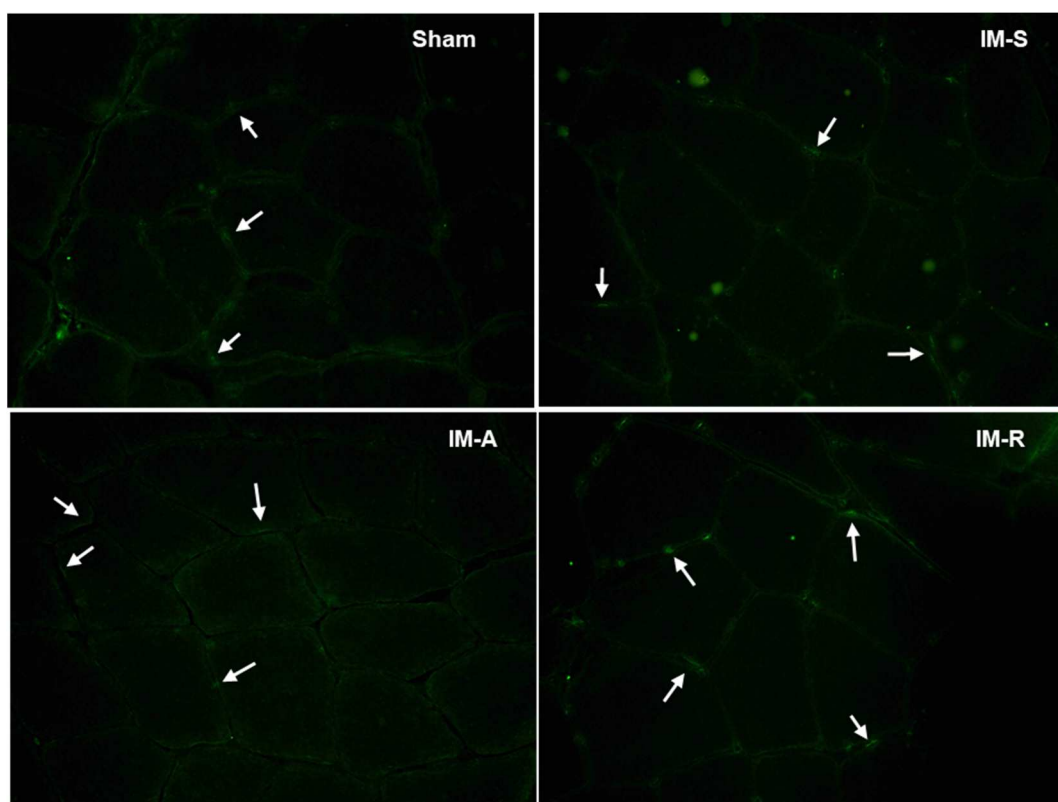


Figura 9. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio marcados por imunofluorescência para a proteína MyOD (verde). As setas indicam a presença de marcação de MyOD. Objetiva 40x. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-R: infarto do miocárdio submetido a protocolo de exercício resistido (n=7); IM-A: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico (n=5), Sham (n=6). ANOVA; $p>0,05$.

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos do exercício físico, aeróbio ou resistido sobre a capacidade física, o coração e o músculo esquelético gastrocnêmio de ratos com infarto agudo do miocárdio.

O modelo experimental de infarto é muito utilizado porque é prático, de custo relativamente baixo, mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subsequentes ⁶⁹. Além disso, cursa com desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, de modo semelhante ao que comumente se observa em casos de insuficiência cardíaca em humanos.

Apesar das vantagens do método, a ligação da artéria coronária descendente anterior em ratos leva a diferentes tamanhos de infarto do miocárdio e, conseqüentemente, a diferentes graus de remodelação cardíaca e disfunção ventricular ⁶⁹. Neste estudo, analisamos apenas os ratos que apresentaram infartos com tamanho superior a 30% da área total do ventrículo esquerdo. Apesar desta área infartada ser considerada grande para ratos, e do tempo de evolução ser longo, pequena porcentagem dos animais infartados apresentou sinais compatíveis com insuficiência cardíaca.

O protocolo de exercício aeróbio utilizado, adaptado de Moreira et al. ⁷¹, é considerado de moderada intensidade. Para avaliar a capacidade física, foi realizado teste de tolerância ao exercício físico, com aumento gradativo da velocidade até a exaustão dos animais. Os ratos do grupo submetido ao exercício físico aeróbio apresentaram maior capacidade física que os demais animais após o período de treinamento. Evidências crescentes confirmam que o exercício aeróbio melhora a capacidade funcional tanto em animais experimentais como em pacientes com insuficiência cardíaca ⁸⁴.

Com relação ao exercício resistido, o protocolo utilizado foi adaptado de Leite et al. ⁷³ e consistiu de quatro subidas na escada com cargas correspondentes a 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade total máxima, previamente estabelecida para cada rato, com períodos de recuperação de 2 minutos entre cada subida. Ao final de 12 semanas de exercício, o grupo IM-R apresentou maior capacidade de carga máxima que os animais saudáveis (Sham) e

os demais animais infartados (IM-S e IM-A).

O ecocardiograma permite analisar, evolutivamente, variáveis estruturais cardíacas e funcionais do ventrículo esquerdo e, portanto, determinar o grau de injúria causado pelo infarto do miocárdio e pelo decorrente processo de remodelação. Com a realização do ecocardiograma três meses após o infarto, foi possível obter três grupos de animais infartados (IM-S, IM-A e IM-R) que apresentaram tamanho de infarto e grau de comprometimento cardíaco semelhantes antes do período de exercícios.

Ao final do período experimental, portanto, após seis meses da indução do infarto e três meses de treinamento físico, foi realizada nova avaliação ecocardiográfica. Observamos aumento das variáveis estruturais do coração nos animais infartados, que apresentaram hipertrofia do ventrículo esquerdo de padrão excêntrico. Os protocolos de exercícios aeróbio ou resistido não foram capazes de atenuar as alterações na geometria do ventrículo esquerdo dos ratos infartados.

Na avaliação funcional após o período de exercício, foi detectada disfunção sistólica nos ratos infartados, caracterizada por menor porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo e fração de variação da área, e por aumento do índice de Tei. Similarmente, os protocolos de exercícios aeróbio ou resistido não modificaram essas variáveis. A função diastólica não diferiu entre os grupos.

Estudos recentes têm mostrado que o exercício físico aeróbio, além de aumentar a capacidade física, também melhora e/ou reverte a hipertrofia e disfunção do ventrículo esquerdo causadas por diferentes modelos de injúria cardíaca^{59, 71, 85, 86}. Entretanto, neste estudo, o exercício aeróbio não foi capaz de modificar parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo. O exercício resistido, apesar do incremento na capacidade total máxima, também não teve efeito nas variáveis ecocardiográficas. Estes resultados estão de acordo com os dados de Grans et al.⁶³, que não detectaram mudanças expressivas na função ventricular após três meses de exercício resistido em ratos com infarto do miocárdio. Entretanto, os autores observaram que o exercício resistido reduziu o estresse cardíaco global e melhorou significativamente a modulação autonômica

cardíaca e vascular. Por outro lado, Cai et al.⁵⁹ demonstraram que diferentes tipos de exercício físico, incluindo o exercício resistido, tiveram efeitos benéficos na função cardíaca. Exercícios resistidos associados à terapia medicamentosa também têm sido alvo de investigação. Feriani et al.⁸⁷ detectaram benefícios na capacidade de carga máxima e estado anti-inflamatório do músculo esquelético, além de melhora da função cardíaca após período de treinamento resistido combinado com piridostigmina. É possível que a divergência entre os estudos sobre os efeitos dos exercícios físicos na disfunção ventricular esteja relacionada a diferenças nos modelos de agressão cardíaca e de treinamento físico.

Uma vez que a função cardíaca não diferiu entre os grupos infartados, é provável que o aumento da capacidade funcional dos ratos do grupo IM-A e da capacidade de carga máxima nos ratos do grupo IM-R tenha sido decorrente de melhora funcional da musculatura esquelética.

A produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético induzem modificações irreversíveis de proteínas contráteis e formação de produtos de peroxidação lipídica, que culminam em injúria da fibra muscular⁵⁹. Os músculos esqueléticos são formados por tecido capaz de alterar suas características metabólicas, morfológicas e funcionais em situações de treinamento ou injúria⁸⁸. A insuficiência cardíaca crônica induz adaptações estruturais e funcionais da musculatura esquelética⁸⁹. Neste estudo, a avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo gastrocnêmio. As defesas antioxidantes e a habilidade de combater a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio em músculos glicolíticos são menores que em músculos oxidativos. Portanto, músculos glicolíticos são mais susceptíveis aos danos causados por espécies reativas de oxigênio⁴⁹.

Estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os sistemas antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio são moléculas altamente reativas contendo oxigênio com elétrons desemparelhados. Essas moléculas causam danos ao DNA e levam à oxidação de proteínas e peroxidação lipídica⁹⁰. Neste trabalho, o grau de estresse oxidativo foi avaliado pelas seguintes técnicas: concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo, produção *in situ* de espécies reativas de oxigênio, expressão de proteínas oxidadas

e atividade de enzimas antioxidantes no músculo gastrocnêmio.

Como o balanço redox é determinado pelo equilíbrio entre vias pró e antioxidantes, os mecanismos intracelulares de defesa antioxidantes merecem destaque. No músculo esquelético, o sistema de enzimas antioxidantes, composto por superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (Cat) protege as células das ações das espécies reativas de oxigênio. Neste estudo, verificamos que o infarto do miocárdio altera a atividade de enzimas antioxidantes e o exercício aeróbio parece ser mais eficiente que o exercício resistido para preservar sua atividade.

A superóxido dismutase representa a primeira defesa contra ânion radical superóxido catalisando a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em presença do íon H^+ . A catalase, por sua vez, catalisa a formação de água e oxigênio a partir do H_2O_2 formado pela reação da superóxido dismutase. Já a atividade da glutathione peroxidase é dependente de sua capacidade de reagir com H_2O_2 e peróxidos orgânicos pela oxidação da glutathione reduzida a glutathione oxidada ⁹¹. Neste estudo, a atividade da superóxido dismutase foi menor no grupo IM-S que nos grupos Sham e IM-R. A catalase teve sua atividade aumentada em todos os animais infartados. Já a atividade da glutathione peroxidase foi menor em todos os grupos infartados quando comparados ao Sham; porém, teve sua atividade preservada no grupo IM-A quando comparado aos demais animais infartados.

O hidroperóxido de lipídeo, marcador de lipoperoxidação, foi menor no grupo IM-A que nos outros grupos. A peroxidação lipídica é causada pela agressão de uma espécie reativa, geralmente radical hidroxil, que abstrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado e deixa um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação. A seguir, ocorre a fase de propagação, na qual há formação do radical peroxil ($LOO\cdot$), que é capaz de retirar um átomo de H^+ do ácido graxo adjacente gerando, assim, o hidroperóxido de lipídeo. Nas células, a lipoperoxidação pode levar a degeneração e perda da função de proteínas da membrana, prejudicando funções essenciais como a atividade de enzimas e transportadores de ATP ⁹². A menor concentração

de hidroperóxido de lipídeo no grupo IM-A sugere ação protetora do exercício aeróbio contra o estresse oxidativo.

O dihidroetídio (DHE) tem se destacado como marcador da produção de superóxido. O DHE é uma molécula apolar que permeia as membranas celulares. O etídio, produto da oxidação do DHE pelo superóxido, é um composto polar que não atravessa as membranas celulares e, portanto, reflete a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular⁹³. No presente estudo, a oxidação de DHE foi utilizada para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio no músculo gastrocnêmio. A quantidade de núcleos positivos para marcação de etídio sobrepostos ao DAPI foi significativamente maior no grupo IM-S que no Sham, refletindo aumento de estresse oxidativo nos ratos infartados sedentários. Os grupos de animais infartados submetidos a exercício físico, aeróbio ou resistido, não diferiram do Sham.

A reação celular ao estresse oxidativo depende da intensidade de formação das espécies reativas de oxigênio. Em baixas concentrações, as espécies reativas de oxigênio têm efeito estimulante sobre receptores e enzimas antioxidantes; em elevadas concentrações, entretanto, induzem dano celular^{94, 95}. Quando a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta além da capacidade de neutralização pelo sistema antioxidante muscular, instala-se quadro de estresse oxidativo que leva à disfunção contrátil do músculo esquelético. Sabe-se que os níveis de modificações de proteínas pós traducionais derivadas de oxidantes, incluindo a carbonilação de proteínas, são elevados dentro das fibras musculares esqueléticas quando o estresse oxidativo se desenvolve, sugerindo que essas modificações desempenham papéis importantes na regulação da função muscular⁹⁶.

Nesse sentido, avaliamos a carbonilação/oxidação proteica no músculo esquelético, que não diferiu entre os grupos. Sistemas intracelulares de degradação proteica identificam e eliminam proteínas oxidadas, como o sistema ubiquitina-proteassoma. A degradação de proteínas oxidadas independente de poli ubiquitinação é coordenada pelo complexo proteassoma 20S⁹⁷. A expressão proteica desse complexo, avaliada por Western blot, não diferiu entre os grupos. Este resultado foi esperado, uma vez que também não identificamos alteração na expressão das proteínas oxidadas.

Aumento do estresse oxidativo ativa vias de sinalização intracelulares, como por exemplo a via das MAPK e do NF- κ B, que contribuem para o desenvolvimento de atrofia muscular. Neste estudo, avaliamos a expressão proteica da extracelular signal-regulated kinase (ERK) $\frac{1}{2}$, membro da família das MAPK, cuja ativação está relacionada com processos anabólicos como divisão celular, crescimento e diferenciação. Avaliamos também a subunidade p65 do NF- κ B. Quando não estimulado, o NF- κ B, em associação com sua proteína inibitória I κ B, encontra-se inativo no citoplasma. A fosforilação do I κ B libera o NF- κ B e permite a ativação e translocação de heterodímeros do NF- κ B para o núcleo celular ³⁷. Neste estudo, a expressão proteica da ERK e da subunidade p65 do NF- κ B não diferiram entre os grupos.

Além das alterações acima descritas, a insuficiência cardíaca pode causar prejuízo no metabolismo energético do músculo esquelético. Com objetivo de avaliar o comprometimento energético causado pelo infarto e os efeitos dos exercícios aeróbio e resistido, avaliamos as principais enzimas do metabolismo da glicose (hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase), da via anaeróbia (lactato desidrogenase), do ciclo de Krebs (citrato sintase) e do metabolismo da oxidação de ácidos graxos (β -hidroxiacil-CoA desidrogenase e carnitina palmitoiltransferase). No intuito de investigar os efeitos da intervenção por exercícios, analisamos também o conteúdo muscular de glicogênio e lactato, além da atividade da enzima creatina quinase.

O comportamento de enzimas musculares durante a disfunção ventricular não está totalmente esclarecido na literatura. Por exemplo, há descrição de diminuição na atividade da citrato sintase em alguns estudos ⁹⁸ e preservação de sua atividade em outros ^{99, 100}. No presente estudo, a atividade da citrato sintase não diferiu entre os grupos. Há também relato de queda na atividade da β -hidroxiacil CoA desidrogenase durante a insuficiência cardíaca ^{99, 100}. Entretanto, em nosso estudo, a atividade dessa enzima foi maior no grupo IM-S que no Sham.

De acordo com a literatura, enzimas glicolíticas, como a fosfofrutoquinase e piruvato quinase, parecem não sofrer alteração em sua atividade durante IC ¹⁰⁰, diferentemente do que observamos em nosso trabalho, no

qual a atividade da piruvato quinase foi maior no grupo IM-S que nos demais grupos infartados, IM-A e IM-R, e no Sham.

A piruvato quinase é a enzima final da via glicolítica, que catalisa o terceiro passo irreversível da glicólise e controla o fluxo de saída dessa via. Esse passo final produz ATP e piruvato a partir de fosfoenolpiruvato ¹⁰¹. Sendo assim, a regulação da piruvato quinase é importante no controle da produção de intermediários glicolíticos e ATP. Quando a célula dispõe de alta concentração de ATP, a glicólise é inibida pela fosfofrutoquinase ou piruvato quinase. No caso da piruvato quinase, sua afinidade pelo fosfoenolpiruvato é reduzida. Por outro lado, em situações em que a concentração de ATP está reduzida, a afinidade da piruvato quinase pelo fosfoenolpiruvato aumenta ¹⁰².

A partir de nossos resultados, pode-se sugerir que a produção de energia no músculo gastrocnêmio dos animais infartados sedentários encontra-se menor que nos ratos do grupo Sham e nos infartados exercitados, visto que esse grupo apresentou aumento na atividade da piruvato quinase comparado aos demais grupos. É possível que esse resultado seja um efeito compensatório à baixa produção de energia. Entretanto, estudos adicionais avaliando os complexos respiratórios e atividade da ATP sintase são necessários para melhor esclarecer o papel da fosforilação oxidativa durante a disfunção ventricular.

Finalmente, considerando o potencial adaptativo do músculo esquelético, sua alta plasticidade e capacidade regenerativa, finalizamos a avaliação da musculatura esquelética com a análise da ativação de células satélites no músculo gastrocnêmio.

As células satélites localizam-se próximo às fibras musculares e são mediadores da regeneração muscular. Em condições basais, encontram-se em estado quiescente, mas podem rapidamente voltar a entrar no ciclo celular após lesões ou estímulos para crescimento muscular ⁶⁷. Ativação de células satélites é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos.

Diversas proteínas foram descobertas como marcadores de ativação de células satélites. Alguns marcadores estão localizados no núcleo, como o Pax-7, que é altamente expresso em células satélites. Outros fatores de transcrição como myogenic differentiation 1 (MyoD) é especificamente expresso por células

miogênicas, mas não por células satélites quiescentes. Existem também muitas proteínas de membrana identificadas como marcadores de células satélites, entre as quais se destaca a neural cell adhesion molecule-1 (NCAM1). Entretanto, Pax7 é o marcador intracelular mais reconhecido porque é expresso de forma onipresente em todas as células satélites em ampla variedade de espécies ¹⁰³.

Em nosso trabalho, avaliamos a expressão proteica de Pax-7 e o sinal imunofluorescente das proteínas NCAM, MyoD e miosina neonatal para investigar ativação de células satélites no músculo gastrocnêmio após período de exercício aeróbio ou resistido. Nossos dados demonstraram que os marcadores de células satélites foram similares entre os grupos.

CONCLUSÃO

Exercício aeróbio e resistido melhora a capacidade física e a capacidade de carga máxima, respectivamente, sem alterar parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo de ratos infartados. No músculo gastrocnêmio, o infarto aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, altera a atividade de enzimas antioxidantes e de enzimas do metabolismo da glicose e de ácidos graxos. O exercício aeróbio reduz a concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo e atenua a redução da atividade da glutathione peroxidase, mostrando-se, portanto, mais eficaz que o exercício resistido contra aumento do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mente A, Yusuf S. Reducing the global burden of cardiovascular disease, Part 1: The epidemiology and risk factors. *Circ Res.* 2017;121:677-694
2. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. Heart disease and stroke statistics - 2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;in press
3. Mansur AP, Favarato D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arq Bras Cardiol* 2012;99:755-761
4. Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:434-440
5. DATASUS (2016). Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>> Acesso em: 11 fev. 2019.
6. Lima AR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MD, Guizoni DM, Bonomo C et al. Heart failure-induced diaphragm myopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34:333-345
7. Lima AR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LA, Campos DH et al. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path.* 2010;91:54-62
8. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85:1364-1373
9. Coats AJ. Origin of symptoms in patients with cachexia with special reference to weakness and shortness of breath. *Int J Cardiol.* 2002;85:133-139
10. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR et al. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path.* 2006;87:219-225
11. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin LAJ, Sugisaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:437-443

12. Damatto RL, Martinez PF, Lima AR, Cezar MD, Campos DH, Oliveira SAJ et al. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2013;167:698-703
13. Santos DP, Okoshi K, Moreira VO, Seiva FRF, Almeida FLA, Padovani CR et al. Growth hormone attenuates skeletal muscle changes in experimental chronic heart failure. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20:149-155
14. Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Yamada Y, Hanada A, Ohtsubo M et al. Comparisons of the skeletal muscle metabolic abnormalities in the arm and leg muscles of patients with chronic heart failure. *Circ J.* 2004;68:573-579
15. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest.* 1999;115:836-847
16. Filippatos GS, Kanatselos C, Manolatos DD, Vougas B, Sideris A, Kardara D et al. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: A comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2003;90:107-113
17. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path.* 2003;84:201-206
18. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1938-1947
19. Albuquerque DC, Neto JD, Bacal F, Rohde LE, Bernardez-Pereira S, Berwanger O et al. I Brazilian registry of heart failure - clinical aspects, care quality and hospitalization outcomes. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104:433-442
20. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues D. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica - 2012. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98:1-33
21. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G et al. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor

- blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation*. 2001;103:2195-2200
22. Ventura-Clapier R. Exercise training, energy metabolism, and heart failure. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34:336-339
 23. Garnier A, Fortin D, Deloménie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*. 2003;551:491-501
 24. Williams AD, Selig S, Hare DL, Hayes A, Krum H, Patterson J et al. Reduced exercise tolerance in CHF may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. *J Card Fail*. 2004;10:141-148
 25. Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauerm B, Lampert E et al. Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J*. 2005;19:43-52
 26. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD et al. Influence of N-acetylcysteine on oxidative stress in slow-twitch soleus muscle of heart failure rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:148-159
 27. Brum PC, Bacurau AV, Cunha TF, Bechara LR, Moreira JB. Skeletal myopathy in heart failure: Effects of aerobic exercise training. *Exp Physiol*. 2014;99:616-620
 28. Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2009;5:561-577
 29. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: Increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005;111:1763-1770
 30. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2181-H2190
 31. Bertaglia RS, Reissler J, Lopes FS, Cavalcante WL, Carani FR, Padovani CR et al. Differential morphofunctional characteristics and gene expression in fast and

- slow muscle of rats with monocrotaline-induced heart failure. *J Mol Histol.* 2011;42:205-215
32. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:691-728
33. Ohta Y, Kinugawa T, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N et al. Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1637-H1644
34. Bechara LR, Moreira JB, Jannig PR, Voltarelli VA, Dourado PM, Vasconcelos AR et al. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. *Int J Cardiol.* 2014;175:499-507
35. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima AR et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:8695716
36. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD et al. Modulation of MAPK and NF-kappaB signaling pathways by antioxidant therapy in skeletal muscle of heart failure rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39:371-384
37. Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 2010;95:1-9
38. Shi H, Scheffler JM, Zeng C, Pleitner JM, Hannon KM, Grant AL. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296:C1040-C1048
39. Shi H, Scheffler JM, Pleitner JM, Zeng L, Park S, Hannon KM et al. Modulation of skeletal muscle fiber type by mitogen activated protein kinase signaling. *FASEB J.* 2008;22:2990-3000
40. Sigala I, Zacharatos P, Toumpanakis D, Michailidou T, Noussia O, Theocharis S et al. MAPKs and NF-kB differentially regulate cytokine expression in the

diaphragm in response to resistive breathing: The role of oxidative stress *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300:R1152-R1162

41. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-241
42. Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 2002;16:529-538
43. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: A specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 1988;242:540-546
44. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM et al. Identification of the receptor component of the I kappa Balpha-ubiquitin ligase. *Nature.* 1998;396:590-594
45. Israel A. The Ikk complex: An integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* 2000;10:129-133
46. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1807-1819
47. Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2088-2097
48. Attaix D, Combaret L, Bechet D, Taillandier D. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2008;2:262-266
49. Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JB, Paixão NA, Campos JC, Ferreira JC et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS ONE.* 2012;7:e41701
50. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DEJ, Colvin MM et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American College of

Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines and the Heart Failure Society of America. *J Card Fail.* 2017;23:628-651

51. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:891-975
52. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO, Albuquerque DC, Rassi S, et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. *Arq Bras Cardiol.* 2018;111:436-539
53. Sullivan MJ, Higginbotham MB, Cobb FR. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation.* 1988;78:506-515
54. Mandic S, Myers J, Selig SE, Levinger I. Resistance versus aerobic exercise training in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9:57-64
55. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: Effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation.* 1999;99:1173-1182
56. Flynn KE, Pina IL, Whellan DJ, Lin L, Blumenthal JA, Ellis SJ et al. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure. *J Am Med Assoc.* 2009;301:1451-1459
57. Palau P, Nunez E, Dominguez E, Sanchis J, Nunez J. Physical therapy in heart failure with preserved ejection fraction: A systematic review. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23:4-13
58. Poole DC, Hirai DM, Copp SW, Musch TI. Muscle oxygen transport and utilization in heart failure: Implications for exercise (in)tolerance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H1050-H1063

59. Cai M, Wang Q, Liu Z, Jia D, Feng R, Tian Z. Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction. *Life Sci.* 2018;213:40-49
60. Williams AD, Carey MF, Selig S, Hayes A, Krum H, Patterson J et al. Circuit resistance training in chronic heart failure improves skeletal muscle mitochondrial atp production rate- A randomized controlled trial. *J Card Fail.* 2007;13:79-85
61. Gonçalves ACCR, Pastre CM, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM. Exercício resistido no cardiopata: Revisão sistemática. *Fisioter Mov.* 2012;25:195-205
62. Levinger I, Bronks R, Cody DV, Linton I, Davie A. Resistance training for chronic heart failure patients on beta blocker medications. *Int J Cardiol.* 2005;102:493-499
63. Grans CF, Feriani DJ, Abssamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C et al. Resistance training after myocardial infarction in rats: Its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103:60-68
64. Brooks NE, Myburgh KH. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: The response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol.* 2014;5:99
65. Snijders T, Verdijk LB, van Loon LJ. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev.* 2009;8:328-338
66. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965;99:435-444
67. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001;91:534-551
68. Damatto RL, Lima AR, Martinez PF, Cezar MD, Okoshi K, Okoshi MP. Myocardial myostatin in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Int J Cardiol.* 2016;215:384-387
69. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SAJ, Campos DH, Lima AR et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551

70. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Zanati SG, Damatto RL et al. Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats. *J Cell Mol Med.* 2019;23:1235-1245
71. Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol.* 2013;114:1029-1041
72. Cassilhas RC, Venancio D, Fernandes J, Tufik S, Mello MT. Animal model for progressive resistance exercise: A detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz Rev Educ Fis.* 2013;19:178-184
73. Leite RD, Durigan RC, Souza LAD, Souza CMV, Souza MD, Selistre-de-Araujo HS et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism.* 2013;62:1477-1484
74. Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:15
75. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16:233-270
76. Crabtree B, Higgins SJ, Newsholme EA. The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1972;130:391-396
77. Hengartner H, Harris JI. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic microorganisms. *FEBS Lett.* 1975;55:282-285
78. Zammit VA, Beis I, Newsholme EA. Maximum activities and effects of fructose biphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and

- invertebrates in relation to the control of glycolysis. *Biochem J.* 1978;174:989-998
79. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1976;154:689-700
80. Lynen F. Lipide metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1955;24:653-688
81. Bieber LL, Abraham T, Helmraath T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.* 1972;50:509-518
82. Oliveira-Junior SA, Dal Pai M, Guizoni DM, Torres BP, Martinez PF, Campos DHS et al. Effects of AT1 receptor antagonism on interstitial and ultrastructural remodeling of heart in response to a hypercaloric diet. *Physiol Rep.* 2019;7:e13964
83. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Damatto FC, Damatto RL et al. N-acetylcysteine influence on oxidative stress and cardiac remodeling in rats during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44:2310-2321
84. Cattadori G, Segurini C, Picozzi A, Padeletti L, Anza C. Exercise and heart failure: An update. *ESC Heart Fail.* 2018;5:222-232
85. Pacagnelli F, Okoshi K, Campos DHS, De Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF et al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol.* 2014;20:3889-3905
86. Souza RW, Piedade WP, Soares LC, Souza PA, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One.* 2014;9:e110020
87. Feriani DJ, Coelho-Junior HJ, de Oliveira JCMF, Delbin MA, Mostarda CT, Dourado PMM et al. Pyridostigmine improves the effects of resistance exercise training after myocardial infarction in rats. *Front Physiol.* 2018;9:53
88. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013;6:25-39

89. Loncar G, Fulster S, von Haehling S, Popovic V. Metabolism and the heart: An overview of muscle, fat, and bone metabolism in heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;162:77-85
90. Liou GY, Storz P. Detecting reactive oxygen species by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2015;1292:97-104
91. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras.* 1997;43:61-68
92. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008;88:1243-1276
93. Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech.* 2001;55:236-248
94. Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology.* 2005;6:71-75
95. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR et al. Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 2017;8:20428-20440
96. Barreiro E, Hussain SN. Protein carbonylation in skeletal muscles: Impact on function. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:417-429
97. Opoku-Nsiah KA, Gestwicki JE. Aim for the core: Suitability of the ubiquitin-independent 20s proteasome as a drug target in neurodegeneration. *Transl Res.* 2018;198:48-57
98. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation.* 2000;102:1847-1853
99. Mancini DM, Coyle E, Coggan A, Beltz J, Ferraro N, Montain S et al. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 1989;80:1338-1346

100. Mettauer B, Zoll J, Garnier A, Ventura-Clapier R. Heart failure: A model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch.* 2006;452:653-666
101. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:84-89
102. Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;43:43-51
103. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5:1027-1059