



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Éder Anderson Rodrigues

Influência do exercício físico resistido sobre a remodelação cardíaca de ratos com infarto do miocárdio

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em “Fisiopatologia em Clínica Médica”. Área de concentração: cardiologia

Orientadora: Profa. Adj. Marina Politi Okoshi

Co-Orientadora: Dra. Aline Regina Ruiz Lima

**Botucatu
2018**

Éder Anderson Rodrigues

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO SOBRE A REMODELAÇÃO CARDÍACA DE RATOS COM INFARTO DO MIOCÁRDIO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em “Fisiopatologia em Clínica Médica”. Área de concentração: cardiologia.

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*

Co-Orientadora: Dra. *Aline Regina Ruiz Lima*

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

Rodrigues, Éder Anderson.

Influência do exercício físico resistido sobre a remodelação cardíaca de ratos com infarto do miocárdio / Éder Anderson Rodrigues. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi
Coorientador: Aline Regina Ruiz Lima
Capes: 40101100

1. Infarto do miocárdio. 2. Remodelação ventricular. 3. Insuficiência cardíaca. 4. Exercício. 5. Estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exercício resistido; Infarto do miocárdio; Insuficiência cardíaca; Remodelação cardíaca.

DEDICATÓRIA

Agradecimento especial

Agradeço de maneira muito especial à minha orientadora Prof^a Adj. MARINA POLITI OKOSHI, pela rica oportunidade de aprendizado dentro do campo da pesquisa. Obrigado por me direcionar, ensinar e por toda paciência e compreensão que sempre teve comigo. É muito gratificante e me sinto honrado em ser seu orientando. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à CAPES, agência de fomento responsável pelo financiamento deste trabalho, sem qual o seria impossível a realização do mesmo. Muito obrigado!

Agradeço ao UNIVERSO pelo privilégio de superar todos os obstáculos que a vida me impôs até aqui, e pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal através de cada dificuldade.

Agradeço à minha avó Dna. ANA (*in memoriam*), por ter feito tudo o que pôde para me ver bem e feliz!

Ao meu pai SÉRGIO (*in memoriam*) pelo cuidado e provisão enquanto estive neste plano.

Aos meus tios, Sr. HÉLIO e Dna. LUZIA por terem me amparado e me educado dentro de suas possibilidades!

Aos meus primos/irmãos, LUCIANA, MARA e JUNINHO pelo carinho e acolhimento de sempre!

Agradeço ao amigo Dr. DAVID REYES por ter me apresentado à Dra. MARINA POLITI OKOSHI e por ter confiado na minha capacidade para o desenvolvimento do mestrado. Agradeço também o acolhimento em sua casa sempre que se fez necessário. Muito obrigado!

À minha amiga/irmã NY, que torce sempre por mim e se orgulha de cada conquista minha! Você me faz acreditar que o amor da amizade nunca morre, e que sempre terei um lugar pra retornar quando eu não encontrar uma saída à minha frente! Te amo!

Agradeço à minha querida amiga FABIANA, a qual nunca mediu esforços para me ver bem e sempre esteve ao meu lado! Obrigado por tanto carinho!

Agradeço aos amigos, RODRIGO, FRANCISCO, CLAUDINEI, VAGSON, RAFAEL, AMÍLTON e RAFA CHAVES por fazerem parte de um momento tão especial da minha vida, que foi o início da faculdade! Obrigado por toda

ajuda, apoio e alegria que me proporcionaram e ainda me proporcionam em cada reencontro. Jamais me esquecerei de vocês!

Agradeço aos meus amigos de república (novos e antigos) que se tornaram minha família: ANA, PINGA, GUSTAVO, VÍTOR TANU, BRUNO, MAURÍCIO e BISNAGA. Obrigado por tudo!

Aos amigos queridos que a graduação me presenteou, e que ainda fazem parte da minha vida de uma maneira muito especial: ANA, PINGA, JOSI, ANNE, BÁRBARA, LIDI, MAURÍCIO, GUILHERME, THAÍS DE CÁSSIA, MATHEUS, AMANDA, ALINE, SUSHI, e TANTOS OUTROS. Muito obrigado por estarem por perto ainda, seja fisicamente ou por pensamento, mas a presença é real! Amo vocês!

Aos amigos que surgiram de maneira muito especial nas casualidades da vida: JULIANA, VÍTOR BORGES, FABRÍCIO, FILIPE, FLÁVIO, JEFF, BRUNINHO, GABY, RAFAEL AUGUSTO e LUCAS EZIAS. Quando penso em vocês percebo que a vida é muito generosa comigo, pois me deu os melhores! Agradeço à Dra. ALINE REGINA RUIZ LIMA pela co-orientação, pela paciência comigo em meus passos iniciais no laboratório, pelos puxões de orelha e por compartilhar tanto conhecimento durante as etapas de experimento. Muito obrigado!!!

Ao Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, agradeço pela avaliação ecocardiográfica de todos os animais, bem como pela disposição e paciência em nos ensinar.

Ao Prof. Dr. LEONARDO ZORNOFF pela cirurgia de indução de infarto nos animais.

À Prof^a. Dra. ANNA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES, pela análise das enzimas antioxidantes, realizada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

À Prof^a Dra. CAMILA RENATA CORREA pelas análises e avaliação do malonaldeído, pela paciência em ensinar e pela disposição de sempre!

Aos amigos do laboratório, DAVID, LUANA, MARIANA, LIDI, THIERRES, ALINE, CAMILA, FELIPE, AMANDA, LEILI, MARCELO, RICARDO e ADRIANA. Muito obrigado por toda a ajuda, pelos conselhos, pelas dúvidas esclarecidas e por tantos ensinamentos que cada um me proporciona!

Ao amigo DIJON CAMPOS, pelos conselhos e ajuda em qualquer assunto que estivesse ao seu alcance. Obrigado!

Agradeço ao colega e funcionário da Unipex, ÍGOR DEPRÁ por toda ajuda com a avaliação da expressão gênica presente neste trabalho!

À ANA MENGUE, secretária do Departamento de Clínica Médica, por toda a colaboração na solução das questões burocráticas.

À ex-secretária da Unipex, GUIOMAR, por me receber com tanto carinho e por sempre ter me ajudado com os assuntos burocráticos deste trabalho! Obrigado, Gui!!!

Obrigado a todos os FUNCIONÁRIOS DA UNIPEX!

Agradeço a TODOS, que de maneira direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui!

SUMÁRIO

Resumo	1
Introdução	4
Objetivos	10
Materiais e Métodos.....	12
Resultados Parciais.....	24
Discussão	35
Conclusões.....	40
Referências	42

RESUMO

Introdução: O exercício físico é considerado importante estratégia terapêutica para pacientes com insuficiência cardíaca (IC) estável. A compreensão dos benefícios do exercício na IC resultou, principalmente, de investigações com exercício aeróbio, uma vez que treinamento muscular resistido não era considerado seguro. Mais recentemente, exercícios resistidos têm sido recomendados na IC. Os mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício resistido sobre o miocárdio ainda não estão esclarecidos. Neste estudo, foi avaliado os efeitos do exercício físico resistido, durante o processo de remodelação cardíaca, sobre alterações cardíacas estruturais, funcionais e moleculares induzidas por infarto do miocárdio (IM) em ratos. **Métodos:** Três meses após a indução do IM, ratos Wistar foram divididos em três grupos: Sham (n=20); IM sedentário (IM-Sed, n=20); IM submetido a exercício físico resistido (IM-R, n=20). Os ratos treinaram 3 vezes por semana durante três meses subindo escada com diferentes cargas. A avaliação das estruturas cardíacas e função ventricular foi realizada por ecocardiograma. O menor diâmetro dos miócitos foi analisado em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. A avaliação do metabolismo energético, hidropéroxido de lipídeo, enzimas antioxidantes, malonaldeído (MDA) e carbonilação de proteínas foi realizada por espectrofotometria. A análise de mRNAs das subunidades da enzima NADPH oxidase Nox2, Nox4, p22phox e p47phox e dos genes de referência ciclofilina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR). A análise estatística foi feita por ANOVA complementada pelo teste de Tukey ou teste de Dunn's. **Resultados:** O exercício resistido melhorou a capacidade de carga máxima e não alterou as estruturas cardíacas e o função do ventrículo esquerdo. Os valores do menor diâmetro das fibras cardíacas foram menores no grupo IM-Sed que no Sham e IM-R. A atividade da lactato desidrogenase foi menor no grupo IM-Sed que no Sham e foi restaurada pelo exercício resistido. A atividade da catalase foi menor nos grupos infartados. O hidropéroxido de lipídeo foi menor no grupo IM-R que no IM-Sed. A expressão da p47^{phox} foi menor no grupo IM-Sed. **Conclusões:** Ratos com infarto do miocárdio apresentam remodelação cardíaca caracterizada por dilatação do átrio e ventrículo esquerdos, disfunção sistólica, e redução da atividade da lactato desidrogenase e catalase, e da subunidade p47phox do complexo da NADPH

oxidase no miocárdio. O exercício resistido iniciado tardiamente é seguro, bem tolerado, aumenta a capacidade muscular de carga máxima, reduz o estresse oxidativo, e preserva a atividade da lactato desidrogenase e a expressão gênica da subunidade p47phox do complexo da NADPH oxidase miocárdica em ratos infartados.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca (IC) representa importante problema de saúde pública por ser condição de alta prevalência e elevada morbimortalidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento^{1, 2}. Estudos apontam que até 2035, mais de 130 milhões de adultos da população dos EUA são projetados para desenvolver algum tipo de doença cardiovascular². No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, sendo responsáveis por aproximadamente 20% das mortes em pessoas acima de 30 anos³. Segundo dados do Sistema Único de Saúde, dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca é a mais frequente causa de internação hospitalar^{3, 4}.

A insuficiência cardíaca pode ser definida como síndrome clínica resultante de anormalidades cardíacas estruturais e/ou funcionais, adquiridas ou hereditárias, que prejudicam a capacidade de enchimento e ejeção ventricular⁵. Clinicamente, a insuficiência cardíaca caracteriza-se por redução da capacidade para exercícios físicos devido à ocorrência precoce de fadiga e dispneia aos esforços⁵. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida⁶⁻¹⁰. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para exercícios fosse causada por diminuição da função cardíaca e pulmonar e por alteração da perfusão tecidual decorrente de queda do débito cardíaco. Entretanto, a suposição inicial de que a capacidade para exercícios pudesse relacionar-se diretamente com a função ventricular não se confirmou, tendo sido observada pobre correlação entre variáveis hemodinâmicas e tolerância aos exercícios^{6, 11, 12}. Mais recentemente, foi aventado que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética e descondicionamento físico pudessem estar envolvidos na redução da capacidade para realizar exercícios físicos^{13, 14}.

As principais causas de insuficiência cardíaca são a isquemia miocárdica, hipertensão arterial sistêmica, miocardiopatias e doença valvar¹⁵. Independentemente da etiologia da insuficiência cardíaca, após a agressão cardíaca inicial, ocorrem alterações gênicas, moleculares, celulares, intersticiais e funcionais, que manifestam-se, clinicamente, como modificações no tamanho, forma e função do coração. Este processo é denominado remodelação cardíaca⁵. Tais alterações

podem afetar adversamente as funções cardíacas, favorecendo assim, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e aumentando o risco de morte¹⁶. Os mecanismos celulares e as vias de sinalização, que em envolvem essas modificações, são complexas e mais estudos são necessário para que se tenha uma melhor compreensão do quadro de remodelação cardíaca. Locatti et al¹⁷ propõem que o exercício físico pode ter um papel benéfico sobre o remodelamento cardíaco, atenuando essas modificações e melhorando a função cardíaca.

Atualmente, considera-se que aumento do estresse oxidativo tenha papel importante na fisiopatologia da remodelação cardíaca e no desenvolvimento da insuficiência cardíaca¹⁸. Estresse oxidativo pode ser definido como estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs) e mecanismos endógenos antioxidantes. No miocárdio, o sistema de enzimas antioxidantes, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Cat), protege as células das ações de EROs. Desequilíbrio entre atividades pró e antioxidantes resulta no aumento do estresse oxidativo¹⁹.

Durante a insuficiência cardíaca, há aumento do estresse oxidativo tanto no miocárdio como no sangue²⁰. Diversas fontes podem contribuir para a geração de EROs como a cadeia mitocondrial de transferência de elétrons, a xantina oxidase (XO), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e a NADPH oxidase²⁰. No miocárdio insuficiente, a produção de EROs é aumentada na mitocôndria. Aumento crônico na produção de EROs mitocondrial resulta em piora da atividade mitocondrial, induzindo geração de mais EROs e, conseqüentemente, lesão celular²⁰.

A família da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase parece ser especialmente importante para a sinalização redox^{19, 21}. A classe de proteínas NADPH oxidase constitui um grupo de enzimas cuja função é produzir espécies reativas de oxigênio. Ela foi inicialmente descoberta em fagócitos, há várias décadas, com a caracterização da isoforma Nox2, também referida como gp91phox. Mais recentemente, seis outros membros da família codificados por genes distintos foram identificados: Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, dupla oxidase (DUOX) 1 e DUOX2. As isoformas predominantemente expressas nos cardiomiócitos são a Nox2 e Nox4^{18, 20}. Estas isoformas diferem entre si quanto ao modo de ativação, à interação com

a pequena proteína transmembrana p22phox e à necessidade adicional de fatores de maturação e ativação. A Nox2 forma um complexo com a p22phox, cuja ativação depende da ligação com as subunidades regulatórias citosólicas, p47phox e p67phox. Diferentemente das outras isoformas, a Nox4 é constitutivamente ativa e independente de proteínas citosólicas regulatórias ou ativadoras. A função das enzimas NADPH oxidase é catalisar a transferência de um elétron da NADPH para o oxigênio molecular, gerando EROs²².

Em condições fisiológicas, a NADPH oxidase é quiescente. Entretanto, quando se torna ativada durante a contração muscular ou por estímulos infecciosos e pró-inflamatórios, a NADPH oxidase pode gerar grandes quantidades do ânion radical superóxido, que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima antioxidante superóxido dismutase²³. A atividade da NADPH-oxidase pode ser exacerbada por vários estímulos geralmente presentes durante a insuficiência cardíaca como, por exemplo, estiramento mecânico do miócito, angiotensina II e endotelina-1^{20, 23}. Estudos recentes demonstraram que a Nox4, localizada principalmente na mitocôndria de miócitos cardíacos, é responsável pela maior produção de EROs em situação de sobrecarga de pressão e envelhecimento^{20, 23}.

Aumento da atividade e da expressão da NADPH oxidase foi observado na hipertrofia ventricular esquerda (HVE) por sobrecarga de pressão e no infarto do miocárdio experimental^{18, 20}. Aumento do estresse oxidativo tem efeitos diretos sobre as estruturas e função cardíaca. Em excesso, as EROs causam disfunção contrátil devida a alterações na atividade de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração. Adicionalmente, as EROs ativam fatores de transcrição e vias intracelulares envolvidas na indução de hipertrofia miocitária e apoptose e estimulam a proliferação de fibroblastos cardíacos. Os eventos celulares acima descritos estão envolvidos na disfunção do miócito e no desenvolvimento e progressão da remodelação do miocárdio e da matriz extracelular^{20, 24}. As vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva a alterações miocárdicas ainda não estão completamente esclarecidas.

Apesar do avanço considerável no tratamento da insuficiência cardíaca, principalmente nas últimas décadas, sua mortalidade ainda é elevada.

Indivíduos com insuficiência cardíaca em classes funcionais II a III apresentam mortalidade de cerca de 30 % em seis anos²⁵. O mau prognóstico da insuficiência cardíaca mostra que mecanismos fisiopatológicos importantes ainda permanecem inalterados pelas modalidades terapêuticas atuais. Mais recentemente, o exercício físico tem sido considerado importante estratégia terapêutica não farmacológica na prevenção e reabilitação de muitas doenças cardiovasculares incluindo a insuficiência cardíaca crônica (Downing J)²⁶. Conseqüentemente, diretrizes internacionais^{1,27} e brasileiras²⁸ para tratamento da insuficiência cardíaca passaram a preconizar a prática regular de exercícios físicos para pacientes estáveis, com insuficiência cardíaca 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.²⁹, no final da década de 80, diversos estudos têm mostrado efeitos benéficos do exercício físico aeróbio, que afeta positivamente a função cardiovascular, marcadores inflamatórios, ativação neuro-humoral, estresse oxidativo e sistema músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, a prática regular de exercícios melhora a capacidade funcional e qualidade de vida, aumenta o consumo máximo de oxigênio, e reduz taxa de reinternações hospitalares e de mortalidade por doença cardiovascular^{26, 30-32}.

Atualmente, apesar de serem evidentes os benefícios do exercício, ainda não estão completamente identificados os mecanismos moleculares pelos quais o treinamento físico melhora a função ventricular de pacientes com insuficiência cardíaca. Entre os efeitos benéficos do exercício físico, destaca-se a ação antioxidante. O exercício físico promove aumento na expressão de enzimas antioxidantes e redução na expressão de enzimas pró-oxidantes. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes pode ser observado em vários tecidos, após treinamento aeróbio ou anaeróbio³³. Os radicais livres produzidos durante a contração muscular atuam como moléculas de sinalização, estimulando a expressão gênica e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes. Adicionalmente, modulam vias de proteção ao estresse oxidativo promovendo, por exemplo, aumento de enzimas reparadoras do DNA no miocárdio³⁴⁻³⁶.

A compreensão dos benefícios do exercício físico em pacientes com insuficiência cardíaca 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 aeróbio³⁷.

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 arterial³⁸. 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 esquelético³⁹,⁴⁰. A somatória desses fatores resulta em melhora da performance para atividades de vida diária e da qualidade de vida dos pacientes³⁷. Entretanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício físico resistido no miocárdio ainda não estão esclarecidos.

Um dos modelos mais utilizados para a indução de falência cardíaca em ratos é a ligadura da artéria coronária esquerda, com o consequente infarto do miocárdio⁴¹⁻⁴³. O método é prático e de baixo custo quando comparado a outros modelos experimentais. Além disso, mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto do miocárdio, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subsequentes⁴¹.

Não está esclarecido se a prática de exercícios físicos, realizada durante o processo de remodelação ventricular e disfunção ventricular, porém antes da insuficiência cardíaca estar estabelecida, pode prevenir ou atenuar o processo de remodelação ventricular. Neste estudo, testaremos a hipótese que o exercício físico resistido, durante o processo de remodelação cardíaca, previne ou atenua alterações cardíacas estruturais, funcionais e moleculares induzidas por infarto do miocárdio.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício resistido, sobre alterações estruturais, funcionais e moleculares que ocorrem no coração de ratos com infarto do miocárdio.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar as estruturas cardíacas e a função ventricular de ratos com infarto do miocárdio por ecocardiografia transtorácica;
- 2) Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes no ventrículo esquerdo de ratos com infarto do miocárdio;
- 3) Analisar a expressão gênica de subunidades do complexo enzimático da NADPH oxidase;
- 4) Mensurar a área seccional transversa das fibras musculares miocárdicas;

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 quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos invertidos de luminosidade de 12 h. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Proc. nº 1101).

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório^{44, 45}. Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária descendente anterior 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 foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com algodão. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto.

Foram constituídos, inicialmente, dois grupos de animais: controle (Sham) e infarto do miocárdio (IM). Três meses após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a ecocardiograma transtorácico e os ratos do grupo infarto do miocárdio (IM) foram subdivididos em dois grupos. Dessa forma, foram constituídos três grupos experimentais: 1) Sham (n=20); 2) IM sedentário (IM, n=20); 3) IM submetido a protocolo de exercício físico resistido (IM-ER, n=20).

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 e em variáveis relacionadas a análises por biologia molecular^{9, 46-48}. Como a mortalidade no período pós-operatório é elevada, em torno de 40%, optamos por iniciar cada grupo experimental com 20 animais.

O protocolo de treinamento físico foi aplicado a partir do terceiro mês após a indução do infarto, por período de três meses. Antes e após o período de exercícios, foram realizadas avaliações estruturais e funcionais cardíacas por ecocardiograma. Em estudos prévios em nosso laboratório⁴¹, verificamos que, a partir do sexto mês pós-cirurgia, os animais já apresentam insuficiência cardíaca; portanto, optamos por iniciar o experimento três meses após a indução do infarto do miocárdio.

Capacidade física aeróbia

A capacidade física aeróbia foi avaliada pelo teste de tolerância ao esforço físico, realizado antes e após o período de treinamento. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, sendo iniciado na velocidade de 6 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 calculada⁴⁹. Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações, por 10 min/dia.

Determinação da carga máxima para exercício resistido

O exercício resistido foi realizado em escada especialmente construída para ratos. Dois dias após a adaptação ao protocolo, cada animal foi avaliado para estabelecer a capacidade máxima de carga. O teste constituiu de subidas em escada com aumento progressivo de carga^{40, 50}. Inicialmente, foi colocado 75% do peso corporal do rato e acrescido múltiplos de 15% até que fosse atingida a carga com a qual o rato não conseguisse subir completamente. A maior carga com a qual o rato foi capaz de subir o comprimento total da escada foi considerada a capacidade máxima deste animal. O teste foi repetido após 45 dias para ajuste da intensidade do exercício.

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. Ao atingirem o topo da escada (house chamber), os animais tiveram dois minutos de recuperação e foram estimulados a subir a escada novamente. Esse procedimento foi repetido até que os ratos subissem a escada três vezes sem necessidade de estímulo. Posteriormente, foi adicionada carga correspondente a 15% do peso corporal, que foi aumentada gradativamente, conforme a tabela abaixo (Tabela 1). 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 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 de Leite et al.^{50, 51}

Tabela 1: Adaptação ao protocolo de exercício físico

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

Avaliação estrutural e funcional do coração pelo ecocardiograma

As estruturas cardíacas e a função ventricular esquerda foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico. Após anestesia com cloridrato de cetamina (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 morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório²⁴. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography⁵². 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) e 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 $[(DDVE+EDPP+EDSIV)^3-DDVE^3] \times 1,04$, onde 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 de tecidos para análise

A coleta do material foi realizada na Unidade de Pesquisa Experimental, UNIPEX da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Um dia após a realização do ecocardiograma final, os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios e o ventrículo direito foram dissecados e pesados separadamente. O sangue foi centrifugado a 4 °C, amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C até o momento das dosagens. O peso dos pulmões foi utilizado para avaliação do grau de congestão pulmonar. Fragmentos de pulmão foram pesados antes e após desidratação em estufa a 65 °C por 72 horas para avaliar o grau de edema dos tecidos.

Análise histológica do coração

Para caracterizar o grau de comprometimento do coração pelo infarto do miocárdio, foi realizada a mensuração da porcentagem de área infartada em relação à área total do VE e do menor diâmetro dos miócitos. O VE foi mantido em solução de formol a 10% por 24 h. A seguir, foi lavado em água corrente por 24 h e transferido para solução com etanol 70%. Foi realizado corte transversal do VE a 6 mm do ápice para a base; esse corte reflete a média dos resultados de cortes de todo o ventrículo^{41, 53}. O tecido miocárdico foi corado em lâmina com solução de hematoxilina-eosina. As medidas histológicas foram analisadas com o auxílio de microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram medidos os comprimentos epicárdico e endocárdico dos segmentos infartado e não infartado e calculada a porcentagem de comprimento infartado em relação ao comprimento total do VE⁴¹. Em cada lâmina, foi medido o menor diâmetro das fibras musculares cardíacas,

segundo os critérios preconizados por Dubowitz ⁵⁴, em amostras de pelo menos 150 fibras do músculo cardíaco.

Avaliação metabolismo energético

Foram analisadas a atividade máxima de enzimas chave que participam do metabolismo de glicose: 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: carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1, EC 2.3.1.21). Amostras do ventrículo esquerdo (30 mg de tecido) foram homogenizadas 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 min a 4 °C em homogenizador Bullet Blender® (Next Advance, Inc., NY, USA). O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25 °C utilizando espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para avaliação da atividade da fosfofrutoquinase, foi utilizado tampão de ensaio contendo 50 mM Tris HCl, 2 mM MgSO₄, 5mM KCl, 0,2 mM NADH, 1 mM ATP, 3 mM de frutose 6 fosfato (F6P), 2 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 2 U de lactato desidrogenase (LDH), 4 U de piruvato quinase (PK) e 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 nm⁵⁵. Para a mensuração da atividade da piruvato quinase (PK), foi adicionado ao homogeneizado 100 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0,05% Triton x 100, 9 U LDH, 0,17 mM NADH e 5 mM ADP. Como iniciador da reação, foi utilizado 2 mM de PEP. A leitura da absorbância foi efetuada a 340 nm em placas UV⁵⁶. 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 em 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. A taxa de alteração da absorbância foi monitorada

a 412 nm⁵⁷. A atividade máxima da enzima carnitina palmitoiltransferase 1 foi avaliada utilizando tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 60 mM de Tris-HCl, 1,5 mM EDTA, 0,25 mM de DTNB, Triton X-100 0,05% (v/v) e 0,035 mM palmitoil-CoA. A reação foi iniciada com a adição de 1,25 mM L-carnitina e as absorbâncias lidas a 412 nm⁵⁸.

Análise do hidroperóxido de lipídeo e da atividade de enzimas antioxidantes

Amostras do músculo cardíaco (200 mg) foram descongeladas e homogenizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 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 análise da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Cat) e dosagem de hidroperóxido de lipídeo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, 21 England) e em leitor de microplaca (µQuant-MQX 200 com Kcjunior software, BioTec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência 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 hidroperóxido de cumene. 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 uL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240 nm. A concentração de hidroperóxido de lipídeo 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. Associada Ana Angélica Fernandes.

Quantificação de malonaldeído no miocárdio

A concentração de malonaldeído (MDA) e a carbonilação de proteínas foram avaliadas em homogenato (1:10 em PBS) de miocárdio do ventrículo esquerdo. Para a quantificação do MDA, foram utilizados 250 μL de homogenato para 750 μL de ácido tricloroacético 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm; por 5 min; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% na proporção (1:1) e as amostras foram aquecidas por 15 min a 100 °C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1:2 MDA-TBA; após resfriamento, foi realizada a leitura a 535 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi obtida através do coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e das absorbâncias das amostras e o resultado final foi expresso em nmol/g de proteína.⁵⁹

A carbonilação foi quantificada por método adaptado de Mesquita et al. (2014)⁶⁰ em 100 μL de homogenato para 100 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 50 μL de NaOH (6 M) e as amostras foram novamente incubadas por 10 min em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). O resultado foi obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado final foi expresso em nmol/mg de proteínas.

Avaliação da expressão gênica de subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase por RT-PCR em tempo real

A análise de mRNAs das subunidades da enzima NADPH oxidase Nox2, Nox4, p22phox e p47phox e dos genes de referência ciclofilina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR). A extração de RNA total do ventrículo esquerdo foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito⁶¹. Resumidamente, o fragmento no ventrículo esquerdo congelado foi mecanicamente homogenizado em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogenizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa formada após a centrifugação foi separada, acrescida de 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubada por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA.

Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4 °C. O sedimento de RNA foi submetido a secagem por 10 min à temperatura ambiente e ressuspenso em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60 °C, por 10 min. Para remover qualquer contaminação de DNA, as amostras foram incubadas com DNase I (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Posteriormente, foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm foram de aproximadamente 2,0. Um micrograma de RNA foi submetido a RT utilizando-se o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para volume total de reação de 20 µL, de acordo com método recomendado pelo fabricante. Alíquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), foram submetidas à PCR em tempo real utilizando-se 10 µL

2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e antisenso e sonda Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene: NOX2 (Taqman assay Rn00576710_m1; Ref. seq. Genbank NM_023965.1), NOX4 (Taqman assay Rn00585380_m1; Ref. seq. Genbank NM_053524.1), p22phox (Taqman assay Rn00577357_m1; Ref. seq. Genbank NM_024160.1) e p47phox (Taqman assay 20 Rn00586945_m1; Ref. seq. Genbank NM_053734.2). A amplificação e a análise foram realizadas utilizando o Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados de expressão gênica dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes de referência ciclofilina (Taqman assay Rn00690933_m1; Ref. seq. Genbank NM_017101.1) e GAPDH (Taqman assay Rn01775763_g1 Ref. Seq. Genbank NM_058704.1). As reações foram feitas em triplicata e a expressão gênica foi calculada pelo método do CT (critical threshold cycle) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$)⁶⁰.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão ou mediana e quartis, de acordo com a distribuição. As comparações entre os grupos foram analisadas por ANOVA complementada pelo teste de Tukey ou teste de Dunn's. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

Na tabela 2 está apresentada a frequência dos sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca. Ao final do período experimental, o grupo IM-Sed (n=09) apresentou a seguinte frequência de alterações compatíveis com insuficiência cardíaca: trombo em átrios em 1 rato, efusão pleural em 1, congestão pulmonar em 3, hipertrofia do ventrículo direito em 3 e ascite em 2 animais. No grupo IM-R (n=13), 3 ratos tiveram trombo em átrios, 4 efusão pleural, 3 congestão pulmonar, 4 hipertrofia do ventrículo direito e 2 ascite. A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca não diferiu entre os grupos.

As variáveis anatômicas estão apresentadas na Tabela 3. O peso corporal não diferiu entre os grupos. O peso do VD, em valores absolutos e normalizados pelo peso corporal, foi maior nos grupos infartados em relação ao Sham. O peso absoluto do pulmão foi maior no grupo IM-Sed que no Sham. O treinamento físico não modificou essas variáveis.

Teste de esforço

No teste de esforço realizado antes e após o protocolo de exercícios, a distância percorrida e o tempo de permanência na esteira não diferiram entre os grupos (Figura 1).

Teste de carga máxima

O teste de carga máxima foi realizado antes e após o período de exercício (Figura 3). Na avaliação inicial, o grupo IM-Sed (n=09) apresentou desempenho menor em relação ao Sham. O grupo IM-R (n=13) apresentou desempenho maior na avaliação final em relação à avaliação inicial e aos outros grupos.

Avaliação Ecocardiográfica

Na Tabela 4, estão apresentadas as variáveis cardíacas estruturais e nas Tabelas 5 e 6, as variáveis de função do VE antes do protocolo de exercício. Os grupos IM-Sed e IM-R apresentaram hipertrofia e dilatação das câmaras cardíacas esquerdas caracterizadas 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 com redução das porcentagens de encurtamento endocárdico e mesocárdico, da velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, da fração de ejeção e da porcentagem de variação da área do VE, e aumento do índice de Tei. Em relação à função diastólica, houve aumento da onda E mitral no grupo IM-Sed em relação ao Sham. As outras variáveis não diferiram entre os grupos.

Os dados referentes à avaliação ecocardiográfica ao final do experimento estão apresentados nas Tabelas 7 a 9. Os grupos com infarto do miocárdio mantiveram o padrão de hipertrofia e dilatação das câmaras cardíacas observado na avaliação inicial. Funcionalmente, os ratos infartados persistiram com disfunção sistólica, caracterizada por redução das porcentagens de encurtamento endocárdico e mesocárdico, da velocidade de encurtamento da parede posterior, da porcentagem de variação de área e da fração de ejeção, e aumento do índice de Tei.

Análise histológica do músculo cardíaco

Na figura 2, estão expostas as imagens representativas do miocárdio e o gráfico com os valores do menor diâmetro das fibras cardíacas. O grupo IM-Sed apresentou valores menores que os grupos Sham e IM-R.

Avaliação metabolismo energético

Na tabela 10, estão apresentados os resultados da atividade das enzimas do metabolismo energético. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi

menor no grupo IM-Sed que no grupo Sham. A atividade das demais enzimas não diferiu entre os grupos.

Análise da atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi menor nos grupos infartados que no Sham. (Tabela 11). A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e da superóxido dismutase (SOD) não diferiu entre os grupos.

Marcadores do estresse oxidativo no miocárdio

A concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídeo foi menor no grupo IM-R que no IM-Sed. A concentração de malonaldeído e a carbonilação proteica não diferiram entre os grupos (Tabela 12).

Expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase

A expressão da subunidade p47phox da NADPH oxidase foi menor no grupo IM-Sed que no Sham. A expressão de Nox2, Nox4, e p22phox não diferiu entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 2. Frequência de sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca nos grupos com infarto do miocárdio

	Frequência (%)	
	IM-Sed (n=9)	IM-R (n=13)
Trombo em átrios	11,1 (1)	23,1 (3)
Efusão pleural	11,1 (1)	30,8 (4)
Congestão pulmonary	33,3 (3)	25,0 (3)*
Hipertrofia do ventrículo direito	33,3 (3)	33,3 (4)*
Ascite	22,2 (2)	15,4 (2)

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Teste de Goodman; P > 0,05; * n=12.

Tabela 3. Variáveis anatômicas

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=9)	IM-R (n=13)
PC (g)	556 ± 39	550 ± 60	525 ± 80
VE (U/S)	3,98 (3,61-4,11)	4,13 (3,94-4,41)	3,97 (3,57-4,15)
VD (g)	0,24 (0,21-0,26)	0,36 (0,30-0,43)*	0,34 (0,30-0,50)*
VD/PC (mg/g)	0,43 (0,41-0,45)	0,71 (0,52-0,86)*	0,65 (0,56-0,94)*
VD (U/S)	3,91 (3,77-4,22)	4,38 (4,00-4,93)	4,20 (4,09-4,27)
Átrios (mg)	0,11 (0,10-0,18)	0,15 (0,11-0,31)	0,17 (0,14-0,23)
Átrios/PC (mg/g)	0,19 (0,16-0,31)	0,32 (0,22-0,51)	0,32 (0,22-0,51)
Átrios (U/S)	0,19 (0,16-0,32)	0,32 (0,22-0,54)	0,33 (0,24-0,49)*
Pulmão (g)	1,98 ± 0,68	2,98 ± 0,89*	2,64 ± 0,70
Pulmão/PC (mg/g)	3,65 (3,19-3,70)	5,18 (4,43-7,24)*	4,82 (3,77-5,27)
Pulmão (U/S)	4,49 (4,38-4,53)	4,28 (4,01-4,84)	4,50 (4,22-4,87)

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; U/S: relação entre peso úmido e peso seco. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

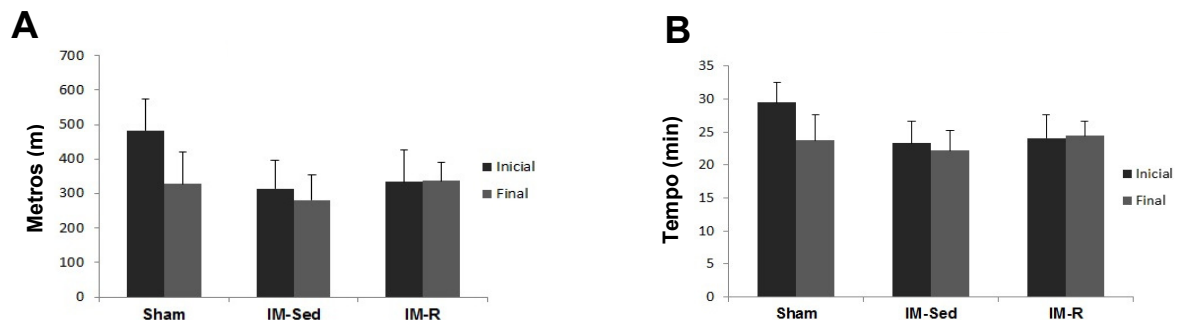


Figura 1. Capacidade máxima de esforço avaliada em esteira antes (Inicial) e após (Final) período de treinamento resistido. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n=10 ratos por grupo. Dados expressos em média ± desvio padrão; p>0,05.

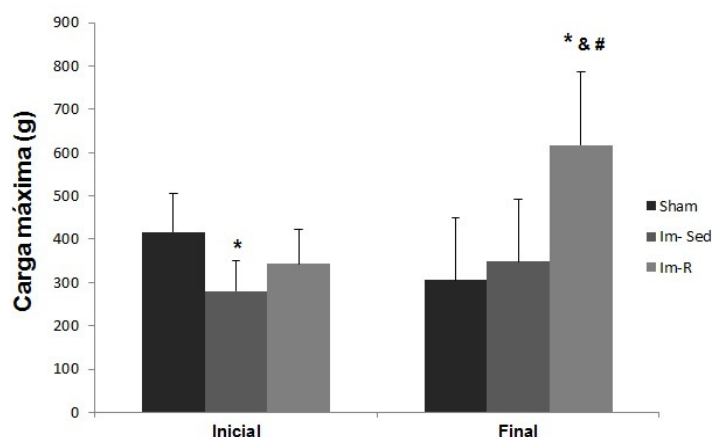


Figura 2. Capacidade máxima de carga avaliada em teste de carga máxima antes (Inicial) e após (Final) treinamento resistido. IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n=10 ratos por grupo. Valores expressos em média e desvio padrão; ANOVA e Tukey; * $p < 0,05$ vs Sham; $^{\epsilon}p < 0,05$ vs IM-Sed; # $p < 0,05$ vs Início.

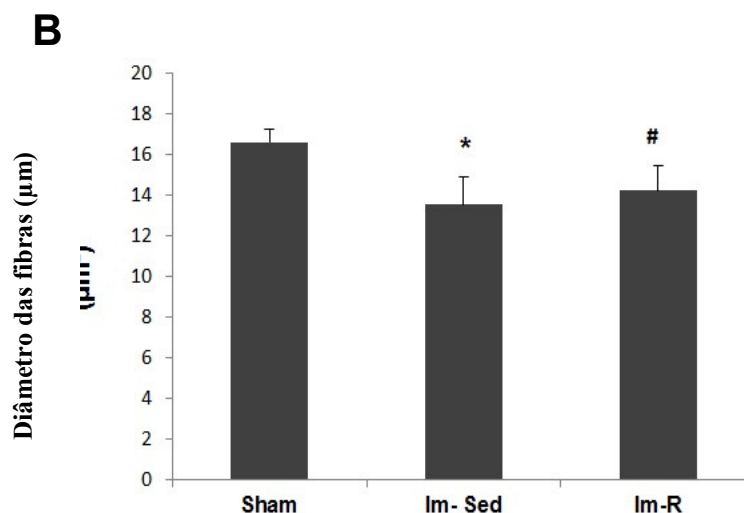
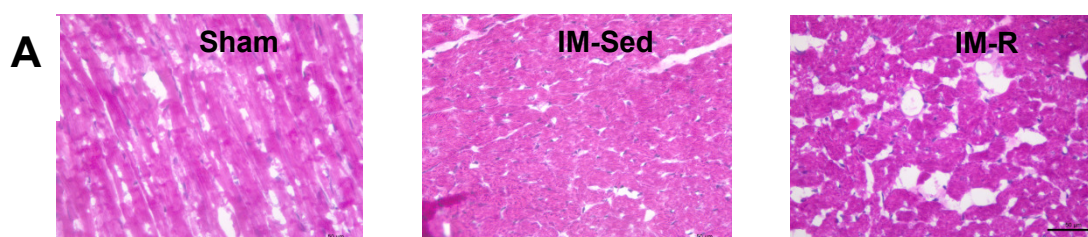


Figura 3. Cortes histológicos do miocárdio corados com hematoxilina-eosina; objetiva: 40X (A). Menor diâmetro das fibras musculares do miocárdio (B). Sham (n=10); IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário (n=07); IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido (n=10). Valores expressos em média e desvio padrão; ANOVA; $p < 0,05$: * vs Sham; # vs IM-Sed.

Tabela 4. Avaliação ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
PC inicial (g)	471 ± 47	458 ± 43	447 ± 47
DDVE (mm)	8,07 ± 0,44	10,53 ± 0,69*	10,16 ± 1,07*
DDVE/PC (mm/kg)	17,3 ± 1,39	23,2 ± 2,68*	22,8 ± 2,56*
DSVE (mm)	4,10 (3,81-4,30)	8,16 (7,99-8,62)*	7,89 (7,23-8,55)*
EDPP (mm)	1,33 (1,27-1,37)	1,65 (1,54-1,95)*	1,65 (1,49-1,74)*
EDSIV (mm)	1,33 (1,27-1,37)	1,53 (1,36-1,89)	1,40 (1,27-1,62)
Esp. rel. VE	0,33 (0,32-0,34)	0,30 (0,30-0,34)	0,32 (0,30-0,37)
AO (mm)	4,01 (3,83-4,01)	3,94 (3,78-4,01)	3,83 (3,61-4,01)
AE (mm)	5,29 (5,11-5,66)	7,66 (6,70-8,27)*	6,75 (6,27-7,41)*
AE/AO	1,35 (1,32-1,39)	1,94 (1,67-2,27)*	1,80 (1,55-1,99)*
AE/PC (mm/kg)	11,6 (10,4-12,3)	17,4 (13,9-19,5)*	15,3 (13,3-17,5)*
Massa VE (g)	0,71 (0,65-0,80)	1,53 (1,28-1,69)*	1,13 (1,08-1,63)*
Índ. MVE (g/kg)	1,54 (1,46-1,66)	3,58 (2,70-3,95)*	2,74 (2,43-3,58)*
Área diast. (mm ²)	44,2 ± 7,43	89,5 ± 14,7*	80,5 ± 14,3*
Área sist. (mm ²)	15,6 (12,5-18,0)	61,6 (55,6-72,1)*	52,2 (43,1-58,9)*
Perímetro (mm)	Sham	36,3 ± 2,88	34,4 ± 3,03
IM perímetro (mm)	Sham	15,0 ± 3,60	13,0 ± 2,97
% de área infartada	Sham	41,2 ± 7,61	37,6 ± 6,72

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; 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 Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica inicial da função sistólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
FC (bpm)	292 ± 25	295 ± 26	275 ± 24
% enc. endoc.	49,3 ± 4,10	20,7 ± 6,20*	21,9 ± 6,24*
% enc. mesoc.	56,4 ± 3,58	31,4 ± 5,78*	32,4 ± 5,99*
VEPP (mm/s)	40,5 ± 5,58	24,5 ± 7,67*	28,6 ± 8,37*
Tei	0,47 (0,44-0,53)	0,74 (0,63-0,89)*	0,76 (0,63-0,81)*
FE	0,86 (0,84-0,89)	0,51 (0,43-0,57)*	0,50 (0,42-0,58)*
% variação area	65,7 ± 5,52	28,6 ± 8,19*	33,7 ± 7,59*

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; % enc. endoc. e % enc. 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 Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 6. Avaliação ecocardiográfica inicial da função diastólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
E mitral (cm/s)	80,3 ± 7,53	99,1 ± 16,5*	88,5 ± 18,3
A mitral (cm/s)	47 (45-55)	44 (21-64)	42 (23-58)
E/A	1,65 (1,47-1,82)	2,02 (1,44-5,27)	1,63 (1,41-4,70)
TRIVn	26 (22-26)	30 (26-33)	30 (25-32)
TDE (ms)	48 (45-49)	39 (36-45)	43 (37-57)
TRIV/R-R	54,8 ± 6,83	63,1 ± 10,7	62,0 ± 13,3

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; 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 e pós teste de Tukey ou Dunn's; P<0,05: * vs Sham.

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
PC final (g)	552 (527-582)	531 (511-572)	526 (476-570)
DDVE (mm)	8,34 ± 0,43	11,12 ± 0,88*	10,89 ± 0,82*
DDVE/PC (mm/g)	15,0 ± 1,16	20,4 ± 2,34*	21,1 ± 2,68*
DSVE (mm)	4,09 ± 0,38	8,96 ± 1,33*	8,62 ± 1,16*
EDPP (mm)	1,42 (1,38-1,43)	1,80 (1,64-2,01)*	1,69 (1,60-1,73)*
EDSIV (mm)	1,42 (1,39-1,45)	1,69 (1,40-1,87)	1,57 (1,31-1,73)
Esp. rel. VE (mm)	0,34 (0,33- 0,35)	0,32 (0,30-0,36)	0,31 (0,28-0,32)*
AO (mm)	4,21 ± 0,15	4,01 ± 0,23	4,06 ± 0,27
AE (mm)	5,68 ± 0,46	8,23 ± 1,30*	7,80 ± 1,26*
AE/AO	1,38 (1,24-1,44)	2,22 (1,63-2,34)*	1,86 (1,78-2,23)*
AE/PC (mg/g)	10,1 (9,21-11,1)	15,9 (12,0-17,5)*	14,7 (12,8-17,1)*
Massa VE (g)	0,87 (0,76-0,91)	1,66 (1,47-1,98)*	1,61 (1,39-1,78)*
Índ. MVE (g/kg)	1,51 (1,45-1,59)	3,32 (2,75-3,97)*	3,06 (2,55-3,46)*
Área diast (mm²)	49,2 (47,0-51,1)	89,9 (85,1-96,1)*	93,5 (79,9-105,5)*
Área sist (mm²)	14,7 (14,1-17,7)	64,5 (55,6-72,3)*	59,5 (47,0-76,3)*
% variação área	68,2 ± 4,25	29,7 ± 8,92*	34,5 ± 12,19*
Perímetro (mm)	-	37,2 ± 2,86	36,9 ± 3,00
IAM perímetro (mm)	-	15,5 ± 3,73	13,5 ± 4,17
% infarto	-	41,2 ± 7,75	36,1 ± 9,44

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; 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 Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica final da função sistólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
FC (bpm)	280 ± 39	300 ± 32	292 ± 21
% enc. endoc.	51,0 ± 3,26	19,8 ± 6,27*	21,1 ± 6,45*
% enc. mesoc.	58,1 ± 2,91	30,6 ± 5,76*	31,2 ± 6,31*
VEPP (mm/s)	41,5 ± 6,18	25,4 ± 9,35*	27,9 ± 6,20*
Tei	0,47 (0,43-0,50)	0,61 (0,56-0,67)*	0,69 (0,59-0,72)*
FE	0,88 (0,87-0,90)	0,46 (0,40-0,54)*	0,53 (0,42-0,59)*

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; % enc. endoc. e % enc. 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 Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 9. Avaliação ecocardiográfica final da função diastólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=14)	IM-Sed (n=09)	IM-R (n=13)
E mitral (cm/s)	77,0 (74,0-85,5)	101,5 (78,5-119,5)	77,5 (72,0-121,0)
A mitral (cm/s)	50,8 ± 14,7	38,6 ± 27,69	47,25 ± 20,7
E/A (mm/s)	1,71 (1,41-1,80)	4,27 (1,30-5,99)	1,41 (1,24-5,53)
TRIVn	25,4 ± 3,69	26,5 ± 5,20	27,4 ± 4,27
TDE (ms)	49,0 (45,7-54,0)	33,0 (33,0-47,5)	39,5 (37,0-53,0)
TRIV/R-R	54,4 ± 6,91	59,1 ± 10,9	60,4 ± 8,51

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; 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 e pós teste de Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 10. Variáveis do metabolismo energético no músculo cardíaco

	Sham (n=09)	IM-Sed (n=10)	IM-R (n=10)
PFK (nmol/min*g de proteína)	23,7 (20,5 – 28,3)	21,5 (14,3 - 27,6)	25,3 (22,9 - 28,3)
PK (nmol/min*g de proteína)	235 ± 38,8	207 ± 23,8	225 ± 40,6
LDH (nmol/min*g de proteína)	1241 ± 131	1057 ± 128*	1129 ± 158
CS (umol/min*g de proteína)	23,7 (20,5 - 28,3)	21,5 (14,3 - 27,6)	25,3 (22,9 - 28,3)
CK (nmol/min*g de proteína)	30,8 ± 4,93	25,6 ± 5,25	28,8 ± 3,86
CPT1 (nmol/min*g de proteína)	16,8 ± 4,46	21,8 ± 6,33	22,9 ± 6,76

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais; PFK: fosfofrutoquinase; PK: piruvato quinase; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase; CK: creatina quinase; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Tukey ou Dunn's; * P<0,05 vs Sham.

Tabela 11. Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio

	Sham (n=07)	IM-Sed (n=08)	IM-R (n=08)
Superóxido dismutase (nmol/g de tecido)	7,49 (6,22 – 8,87)	6,67 (5,67 – 7,25)	5,78 (5,36 – 6,13)
Catalase (µmol/g de tecido)	54,2 ± 8,31	47,3 ± 10,34*	40,82 ± 6,97*
Glutaciona peroxidase (nmol/g de proteína)	30,0 ± 5,70	29,3 ± 6,95	29,7 ± 7,66

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis; ANOVA e Tukey; * p<0,05 vs Sham.

Tabela 12. Marcadores de estresse oxidativo miocárdico

	Sham (n=07)	IM-Sed (n=08)	IM-R (n=08)
Malonaldeído (nmol/mg de proteína)	4,98 (4,77 - 5,29)	5,46 (3,71 - 7,89)	4,88 (4,36 - 9,82)
Carbonilação proteica (nmol/mg de proteína)	3,12 (3,05 - 3,26)	3,02 (2,82 - 3,14)	3,14 (3,10 - 3,21)
Hidroperóxido de lipídio (nmol/g de tecido)	160 (128 - 187)	204 (182 - 244)	128 (118 -152)#

IM-S: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de animais. Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis; ANOVA e Tukey; # p<0.05 vs IM-Sed.

Tabela 13. Expressão gênica das subunidades do complexo enzimático NAPH oxidase no miocárdio

	Sham (n=08)	IM-Sed (n=06)	IM-R (n=08)
Nox2	1,00 (0,91 - 1,07)	1,43 (1,19 - 2,30)	1,74 (1,03 - 2,54)
Nox4	1,00 ± 0,45	1,60 ± 0,41	1,43 ± 0,53
p22phox	1,00 (0,96 - 1,03)	1,06 (0,89 - 1,20)	1,24 (0,99 - 1,37)
p47phox	1,02 (0,85 - 1,12)	0,66 (0,60 - 0,68)*	0,78 (0,55 - 0,92)

IM-Sed: infarto do miocárdio sedentário; IM-R: infarto do miocárdio submetido a exercício resistido; n: número de ratos. Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis; ANOVA e Tukey ou Dunn's; *p<0,05 vs Sham; Nox2: p<0.03.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o efeito do treinamento físico resistido sobre variáveis cardíacas estruturais e funcionais, estresse oxidativo, capacidade antioxidante e expressão de subunidades da NADPH oxidase no miocárdio de ratos Wistar com infarto do miocárdio⁴¹.

O infarto do miocárdio em ratos é considerado um bom modelo experimental porque possui custo relativamente baixo e alta taxa de reprodutibilidade dos resultados em relação aos estudos clínicos. Além disso, assemelha-se com causas de insuficiência cardíaca frequentemente observadas em humanos, como a isquemia e o infarto^{62, 41}.

O tamanho do infarto é fundamental para o desenvolvimento de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca pós-infarto. Neste estudo, foram excluídos os ratos que apresentaram infarto de tamanho pequeno na avaliação ecocardiográfica inicial, pois geralmente apresentam apenas leve disfunção ventricular, o que dificulta a avaliação de estratégias terapêuticas. Após a análise histológica do coração, somente os animais com área infartada superior a 30% da área total do ventrículo esquerdo foram mantidos no estudo. Apesar deste cuidado metodológico, e do tempo longo de evolução do infarto, tivemos pequena porcentagem de animais com insuficiência cardíaca nos dois grupos infartados. Conseqüentemente, a frequência de ratos com insuficiência cardíaca não diferiu entre os grupos IM-Sed e IM-R.

Os animais foram submetidos ao teste de esforço para a avaliação da capacidade física. Neste teste, realizado antes e após o protocolo de exercício, não identificamos diferenças entre os grupos. No teste de carga máxima realizado antes do protocolo de exercício, o grupo IM-Sed teve desempenho estatisticamente inferior ao grupo Sham. Os ratos foram submetidos ao protocolo do exercício físico três meses após a indução do infarto pois, neste período, não é frequente a presença de insuficiência cardíaca. Assim, os ratos toleram bem o exercício e, adicionalmente, é possível avaliar o efeito do exercício resistido na prevenção ou atenuação das alterações miocárdicas decorrentes da insuficiência cardíaca.

No teste final de avaliação da carga máxima, o grupo IM-R apresentou maior carga máxima que os grupos Sham e IM-Sed, mostrando a efetividade do protocolo de treinamento resistido. Este resultado tem grande importância, pois

estudos têm mostrado que a fraqueza muscular, resultante da perda de massa muscular está associada a maior mortalidade em pacientes com insuficiência⁶³⁻⁶⁷. Estudo recente mostrou que o exercício físico resistido regula a expressão de fatores de crescimento como IGF1, MGF e NRG1, os quais estão relacionados às vias de sinalização da Akt e ERK 1/2, essenciais para a manutenção, regeneração ou crescimento da massa muscular esquelética⁶⁸.

A avaliação das variáveis estruturais cardíacas e funcionais do ventrículo esquerdo foi feita por ecocardiograma, que fornece dados importantes para a determinação do grau de comprometimento do coração após o infarto do miocárdio. A análise realizada três meses após o infarto permitiu assegurar a homogeneidade dos grupos IM-Sed e IM-R antes do treinamento físico. Ambos os grupos apresentaram dilatação do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo, com disfunção sistólica moderada.

O mesmo padrão de remodelação cardíaca foi observado após três meses de treinamento. O exercício físico resistido não alterou as variáveis ecocardiográficas. Portanto, podemos incluir que o exercício físico, apesar de bem tolerado pelos ratos infartados, não levou a melhora das alterações cardíacas induzidas pelo infarto. Atualmente, ainda há dúvidas se pacientes pós-infarto do miocárdio podem ser submetidos a programa intensivo de exercícios resistidos. Durante o levantamento de peso, há aumento da pressão intra-arterial, que é transmitida ao ventrículo esquerdo durante a sístole ventricular. A elevação da pressão intraventricular, mesmo que por pouco período de tempo, pode induzir dilatação da cavidade ventricular esquerda. Este resultado, portanto, tem importância clínica, e sugere que o modelo de exercício resistido possa vir a ser testado em estudos em humanos.

O grupo IM-Sed apresentou menor diâmetro dos miócitos inferior ao do grupo Sham, o que está de acordo com a dilatação ventricular que ocorreu após o infarto do miocárdio. No grupo IM-R, o menor diâmetro dos miócitos foi superior ao do grupo IM-Sed e não diferiu dos valores do grupo Sham. Este resultado reforça o conceito que o exercício resistido não somente não esteve associado à dilatação adicional da cavidade ventricular esquerda, como também colaborou para preservar o menor diâmetro dos miócitos.

O músculo cardíaco é altamente dependente da síntese constante de elevados níveis de ATP^{69,70}. Em corações saudáveis, os cardiomiócitos geram mais de dois terços de suas necessidades de ATP por meio da oxidação de ácidos graxos; o restante do ATP é proveniente da oxidação de glicose e de outros substratos⁷¹. Na fase inicial da remodelação cardíaca e disfunção ventricular, observa-se diminuição da oxidação de ácidos graxos, por substratos competidores como glicose, carboidratos e corpos cetônicos⁷².

Neste estudo, foi avaliada a atividade da PK e PFK, enzimas essenciais na fase inicial da glicólise, da CS, enzima pertencente à via aeróbica do ciclo de Krebs, da LDH, da via anaeróbica e da CPT1, importante transportadora de glicose para o interior da mitocôndria. A única diferença observada entre os grupos, foi a redução da atividade da LDH no grupo IM-Sed em relação ao Sham. Portanto, não observamos nos animais infartados reprogramação energética bem estabelecida, que é frequentemente observada na remodelação patológica do ventrículo esquerdo. A LDH é uma importante enzima do metabolismo energético, que converte o piruvato em lactato e, conseqüentemente, o NADH em NAD⁺. Este resultado está de acordo com os dados de Muders et al. (2001)⁷³, que verificaram que a atividade da LDH 1, isoforma mais abundante no miocárdio e atuante na via aeróbica foi reduzida, enquanto que a atividade das isoformas LDH 2 e 3 foi aumentada em coelhos com injúria cardíaca induzida por epinefrina.

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os agentes antioxidantes^{18, 19}. As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no processo de remodelação cardíaca patológica⁷⁴. Neste estudo, avaliamos os seguintes marcadores de estresse oxidativo: concentração miocárdica de malondialdeído e de hidroperóxido de lipídeo e carbonilação proteica. A concentração de hidroperóxido de lipídeo foi menor no grupo IM-R que no IM-Sed, mostrando que o exercício físico reduziu o estresse oxidativo miocárdico. Em relação às enzimas antioxidantes, observamos redução da atividade da catalase nos grupos IM-Sed e IM-R em relação ao Sham. Resultados semelhantes foram observados por Murtaza et al.⁷⁴.

O complexo enzimático NADPH oxidase tem importante papel na geração de espécies reativas de oxigênio, as quais modulam vias de sinalização

intracelular relacionadas à fibrose e contração miocárdica⁷⁵. Neste estudo, avaliamos as subunidades Nox2, Nox4, p22^{phox} e p47^{phox} deste complexo. A expressão da subunidade Nox2 é aumentada no miocárdio após infarto e parece contribuir para o remodelamento cardíaco adverso e disfunção contrátil nesta situação^{76,77}. Esta enzima torna-se ativa para gerar O₂⁻ após sua associação com a subunidade citosólica p47^{phox}⁷⁷. Thomas et al.⁷⁸ sugerem que a p47^{phox} tenha papel prejudicial nas doenças cardiovasculares. Neste estudo, a expressão gênica da p47^{phox} foi menor no grupo IM-Sed que no Sham e normalizada pelo exercício resistido. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a influência do exercício físico no comportamento das subunidades da NADPH oxidase.

Poucos autores avaliaram os efeitos do exercício resistido no processo de remodelação cardíaca após infarto do miocárdio. Os resultados de nosso estudo são divergentes dos observados recentemente por Alves et al.⁷⁹, que observaram que o exercício resistido foi associado a melhora hemodinâmica de ratos com infarto do miocárdio. Diferenças no protocolo de estudo como o início do período de treinamento cinco semanas apenas a indução do infarto e a falta de avaliação da função cardíaca previamente ao início do período de exercício podem ter colaborado para a divergência de resultados.

CONCLUSÕES

Em conclusão, ratos com infarto do miocárdio apresentam remodelação cardíaca caracterizada por dilatação do átrio e ventrículo esquerdos, disfunção sistólica, e redução da atividade da lactato desidrogenase e catalase, e da subunidade p47phox do complexo da NADPH oxidase no miocárdio.

O exercício resistido iniciado tardiamente é seguro, bem tolerado, e aumenta a capacidade muscular de carga máxima em ratos com infarto do miocárdio. Adicionalmente, reduz o estresse oxidativo, e preserva a atividade da lactato desidrogenase e a expressão gênica da subunidade p47phox do complexo da NADPH oxidase miocárdica.

REFERÊNCIAS

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, 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 Heart J*. 2016;37:2129-2200.
2. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR et al American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e247-e492.
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. Farris SD, Moussavi-Harami F, Stempien-Otero A . Heart failure with preserved ejection fraction and skeletal muscle physiology. *Heart Fail Rev* (2017) 22:141-148.
5. Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P, Braunwald E, eds. Braunwald's heart disease. Philadelphia: Elsevier saunders; 2012:487-504.
6. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation*. 1992;85:1364-1373.
7. Williams AD, Selig S, Hare DL, Hayes A, Krum H, Patterson J, Geerling RH, Toia D, Carey MF. Reduced exercise tolerance in chf may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. *J Card Fail*. 2004;10:141-148.
8. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation*. 2005;111:996-1005.
9. Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Bonomo C, Campos DH, Gomes MJ, Martinez PF, Oliveira SAJ, Gimenes R, et al. Long-term low intensity physical

- exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:61-74.
10. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Damatto FC, Rosa CM, 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.
 11. Harrington D, Anker SD, Coats AJS. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J*. 2001;22:392-399.
 12. Agapitou V, Dimopoulos S, Kapelios C, Karatzanos E, Manetos C, Georgantas A, Ntalianis A, Terrovitis J, Karga H, Nanas S. Hormonal imbalance in relation to exercise intolerance and ventilatory inefficiency in chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32:431-436.
 13. 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.
 14. Zizola C, Schulze PC. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2013;18:623-630.
 15. Okoshi MP, Romeiro FG, Martinez PF, Oliveira Jr SA, Polegato BF, Okoshi K. Cardiac cachexia and muscle wasting: definition, physiopathology, and clinical consequences. *Res Reports Clin Cardiol*. 2014;5:319-326.
 16. Lamas GA, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: Clinical course and beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am Heart J*. 1991 Apr; 121 (4 Pt 1): 1194-202. (ref 16 na introdução)
 17. Locatelli J, Paiva NCN, Carvalho SHR, Lavorato VN, Gomes LHLS, Castro QJT, et al. Swim training attenuates the adverse remodeling of LV structural and mechanical properties in the early compensated phase of hypertension. *Life Sci*. 2017;187:42 - 49.
 18. Octavia Y, Brunner-La Rocca HP, Moens AL. NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: from pathogenic roles to therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:291-297.

19. Altenhofer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of ANDPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:406-427.
20. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2181-H2190.
21. Cave A, Grieve D, Johar S, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360:2327-2334.
22. Zhang M, Perino A, Ghigo A, Hirsch E, Shah AM. NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1024-1041.
23. Wang M, Zhang J, Walker SJ, Dworakowski R, Lakatta EG, Shah AM. Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:765-772.
24. Cezar MD, Damatto RL, Pagan LU, Lima AR, Martinez PF, Bonomo C, Rosa CM, Campos DH, Cicogna AC, Gomes MJ, et al. Early spironolactone treatment attenuates heart failure development by improving myocardial function and reducing fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:1453-1466.
25. Tang ASL, Wells GA, Talajic M, Arnold MO, Sheldon R, Connolly S, Hohnloser SH, Nichol G, Birnie DH, Sapp JL, et al. Cardiac-resynchronization therapy for mild-to-moderate heart failure. *N Engl J Med*. 2010;363:2385-2395.
26. Downing J, Balady GJ. The role of exercise training in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:561-569.
27. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey Jr. DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: Executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128:1810-1852.
28. 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.

29. Sullivan MJ, Higginbotham MB, Cobb FR. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation*. 1988;78:506-515.
30. 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.
31. O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, Leifer ES, Kraus WE, Kitzman DW, Blumenthal JA, et al. HF-ACTION Investigators. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301:1439-1450.
32. Souza RW, Piedade WP, Soares LC, Souza PA, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, Campos DH, Fernandes AA, Okoshi K, Carvalho RF, et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One*. 2014;9:e110020.
33. Pinho RA, Araujo MC, Ghisi GL, Benetti M. Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94:549-555.
34. Gomes EC, Silva AN, Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:756132.
35. Golbidi S, Laher I. Exercise and the cardiovascular system. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:210852.
36. Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M, Colombo PC, Cohen-Solal A, Evans T, LeJemtel TH. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:194-198.
37. 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.
38. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ. American Heart Association Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Resistance exercise in individuals with and without

- cardiovascular disease: 2007 update. A scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2007;116:572-584.
39. 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.
40. Grans CF, Feriani DJ, Abssamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C, Figueroa DM, Angelis KD, Irigoyen MC, Rodrigues B. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103:60-68.
41. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SAJ, Campos DH, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, Guizoni DM, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol*. 2011;111:543-551.
42. Lima AR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LA, Campos DH, Oliveira SAJ, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path*. 2010;91:54-62.
43. Lima AR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MD, Guizoni DM, Bonomo C, Oliveira SAJ, Dal-Pai Silva M, Zornoff LA, Okoshi K, et al. Heart failure-induced diaphragm myopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:333-345.
44. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, et al. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit*. 2010;16:374-383.
45. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Pagan LU, Seiva FR, Bueno RT, 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.
46. Okoshi MP, Cezar MD, Iyomasa RM, Silva MB, Costa LC, Martinez PF, Campos DH, Damatto RL, Minicucci MF, Cicogna AC, et al. Effects of early aldosterone

- antagonism on cardiac remodeling in rats with aortic stenosis-induced pressure overload. *Int J Cardiol.* 2016;222:569-575.
47. Guizoni DM, Oliveira-Junior SA, Noor SL, Pagan LU, Martinez PF, Lima AR, Gomes MJ, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, et al. Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2016;221:406-412.
48. Rosa CM, Gimenes R, Campos DH, Guirado GN, Gimenes C, Fernandes AA, Cicogna AC, Queiroz RM, Falcão-Pires I, Miranda-Silva D, et al. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;in press.
49. Gimenes C, Gimenes R, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, Cezar MDM, Guirado GN, Cicogna AC, Takamoto AHR, et al. Low intensity physical exercise attenuates cardiac remodeling and myocardial oxidative stress and dysfunction in diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2015:ID 457848.
50. Leite RD, Durigan RC, Souza LAD, Souza CMV, Souza MD, Selistre-de-Araujo HS, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. 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.
51. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, Domingos MM, Baldissera V, de Andrade Perez SE. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009;34:1079-1086.
52. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, 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.
53. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation.* 1993;87:598-607.

54. Dubowitz V. *Muscle biopsy: A practical approach*. London: Bailliere Tindall; 1985.
55. Hengartner H, Harris JI. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic microorganisms. *FEBS Lett*. 1975 Jul 15;55(1):282-5.
56. 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 Sep 15;174(3):989-98.
57. Alp PR, Newsholme, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1976 Mar 15;154(3):689-700.
58. Bieber LL, Abraham T, Helmrath T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem*. 1972 Dec;50(2):509-18.
59. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat ' s Brain, Liver , and Kidney. 2016;2016.
60. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues J V., Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem*. 2014;458:69-71
61. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Pagan LU, Seiva FR, Fernandes DC, 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.
62. Pfeffer Ma, Braunward E, Moye LA, Basta, Brown EJJ, Cuddy TE, Davis BR et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 1992;327:669-677.

63. Hülsmann M, Quittan M, Berger R, Crevenna R, Springer C, Nuhr H, et al. Muscle strength as a predictor of long-term survival in severe congestive heart failure / *The European Journal of Heart Failure* 6 (2004) 101-107.
64. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2015; 6: 197-207.
65. Suzuki T, Palus S, Springer J. Skeletal muscle wasting in chronic heart failure. *ESC Heart Failure* 2018; 5: 1099-110.
66. Okoshi MP, Capalbo RV, Romeiro FG, Okoshi K. Cardiac Cachexia: Perspectives for Prevention and Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2017 Jan;108(1):74-80
67. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Okoshi K, Okoshi MP. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 2017 Mar 21;8(12):20428-20440.
68. Cai M, Wang Q, Liu Z, D Jia , Feng R , Tian Z, et al. Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction. *Life Sciences* 213 (2018) 40-49.
69. Ritterhoff J, Tian R. Metabolism in cardiomyopathy: every substrate Matters. *Cardiovascular Research* (2017) 113, 411-421.
70. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED, Phil D. Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013 August 30; 113(6): 709-724.
71. Velden J, Tocchetti CG, Varricchi G. Metabolic changes in hypertrophic cardiomyopathies: scientific update from the Working Group of Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research* (2018) 114, 1273-1280.
72. Lionetti V, Stanley WC, Recchia FA, et al. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovascular Research* (2011) 90, 202-209.
73. Muders F, Neubauer S, Luchner A, et al. Alterations in myocardial creatinine kinase _CK/ and lactate dehydrogenase _LDH/ isoenzyme-distribution in a model of left ventricular dysfunction. *The European Journal of Heart Failure* 3 (2001). 1 - 5.

74. Murtaza I, Wan H, Feng X, Alenina N, Bader M, Prabhakar BS et al. Down-regulation of Catalase and Oxidative Modification of Protein Kinase CK2 Lead to the Failure of Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain to Inhibit Cardiomyocyte Hypertrophy. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 283, NO. 10, pp. 5996 -6004, March 7, 2008
75. Streeter J, Thiel W, Brieger K, Miller FJ Jr, et al. Opportunity Nox: The Future of NADPH Oxidases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Cardiovascular Therapeutics* 31 (2013) 125-137.
76. Krijnen PAJ, Meischl C, Hack CE, Meijer CJLM, Visser CA, Roos D et al. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol* 2003;56:194-199.
77. Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Caverna AC et al. Involvement of Nox2 NADPH Oxidase in Adverse Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *Hypertension* AHA.107.101980.
78. ThomasM, Gavrila D, McCormick ML, Miller Jr FJ, Daugherty A et al. Deletion of p47phox Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 2006 August 1; 114(5): 404-413.
79. Alves JP, Nunes RB, Ferreira DC, Stefani GP, Jaenisch RB, Lago PD. High-intensity resistance training alone or combined with aerobic training improves strength, heart function and collagen in rats with heart failure. *Am J Transl Res* 2017;9(12):5432-5441.