



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

**Thierres Hernani Dias de Pontes**

**Efeitos do treinamento aeróbio intervalado no  
músculo sóleo de ratos infartados**

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

Orientadora: Profa. Adj Marina Politi Okoshi.  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Damatto

**Botucatu  
2019**

*Thierres Hernani Dias de Pontes*

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO  
INTERVALADO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS  
INFARTADOS**

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

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*  
Coorientador: Prof..Dr. *Ricardo Luiz Damatto*

Botucatu  
2019

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

Pontes, Thierres Hernani Dias de.  
Efeitos do treinamento aeróbio intervalado no músculo  
sóleo de ratos infartados / Thierres Hernani Dias de  
Pontes. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Marina Politi Okoshi  
Coorientador: Ricardo Luiz Damatto  
Capes: 40101002

1. Exercícios aeróbicos. 2. Insuficiência cardíaca. 3.  
Músculo esquelético.

Palavras-chave: Exercício Física Aerobio intervalado;  
Insuficiencia Cardíaca; Musculatura esquelética.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço de forma especial a minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Adj. MARINA POLITI OKOSHI, pela imensa oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional. Por ter tido a paciência e o esmero de me guiar para que conseguíssemos desenvolver um bom trabalho e ciclo de ensino-aprendizagem. Foi uma oportunidade única e uma honra imensa. Muito obrigado!

# **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe GERESIM, por todo o apoio incondicional. Tem sido a peça fundamental durante toda minha jornada pela vida.

A minha família, TÁBATA, RONALDO E VÓ JÚLIA.

Aos meus irmãos MÁRCIO YAMAUCHI e WILLIAM CANTAGALLO, por todo apoio e companheirismo, por estarem presentes mesmo que distantes.

Ao meu co-orientador RICARDO DAMATTO, pelos trabalhos que desenvolvemos juntos, pela oportunidade de vir a Botucatu para pós-graduação e pelo exemplo a ser seguido. Muito obrigado!

Aos companheiros de laboratório, ÉDER, MARIANA JANINI, LUANA, ALINÉ,, DAVID. LIDIANE, LEILIANE, AMANDA BERGAMO, GABRIELA BRANDÃO, MARIANA GATTO, FELIPE, MARCELO, ADRIANA por me receberam muito bem e me ajudarem muito em tudo, sempre.

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, realizada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Aos funcionários do DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO e da UNIDADE DE PESQUISA EXPERIMENTAL, muito agradecido por toda a ajuda e contribuição nesse tempo que estive aqui.

Agradeço em especial a amiga VICKELINE, por toda a ajuda que deu, não só contribuições científicas, mas para minha vida. Não saberia como agradecer todo apoio. ARIGATOU GOZAIMASSU!

Aos amigos AMANDA, YOHAN, KAIO, TAIANE, LARISSA, CAROL MIRANDA, EDUARDO, VERÔNICA, ANA PAULA FERRAZ, DIJON CAMPOS, GUSTAVO MOTTA, SÉRGIO, CAMILA, ANA LAURA, LEANDRO SANTOS, LAEL, TAINARA, SEIJI. Por toda ajuda, que contribuiu direta e indiretamente para conclusão desse trabalho.

A aqueles que por ventura esqueci de mencionar, mas sou muito grato a toda contribuição e apoio que tive nesse tempo.

A CAPES pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

Resumo.....	1
Introdução .....	4
Objetivos.....	11
Objetivo geral.....	12
Objetivos específicos.....	12
Materiais e Métodos.....	13
Resultados .....	27
Discussão .....	44
Conclusão.....	51
Referências.....	53

**RESUMO**

**Introdução:** Os efeitos do exercício físico aeróbico intervalado de alta intensidade (“high intensity interval training”, HIIT) sobre a remodelação cardíaca induzida por infarto do miocárdio (IM) e o músculo esquelético ainda não estão completamente esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do HIIT sobre a capacidade funcional e o processo de remodelação cardíaca de ratos após longa evolução de IM. Adicionalmente, analisamos o trofismo muscular, marcadores do estresse oxidativo e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético no músculo esquelético sóleo. **Métodos:** Três meses após indução de IM, ratos Wistar foram divididos nos grupos Sham, IM sedentário (IM) e IM submetido a HIIT (IM-HIIT). Os ratos foram treinados três vezes por semana, durante três meses, em esteira. Avaliação cardíaca foi realizada por ecocardiograma, antes e após o treinamento. Marcadores do estresse oxidativo e do metabolismo energético foram analisados por espectrofotometria e o trofismo muscular por morfometria em lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina. Análise estatística: ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis. **Resultados:** O HIIT foi seguro, bem tolerado, e aumentou substancialmente a capacidade funcional em relação aos grupos Sham e IM. Os grupos infartados apresentaram dilatação e hipertrofia do ventrículo esquerdo com disfunção sistólica evidente antes do treinamento físico. Ao final do protocolo, os grupos infartados mantiveram o mesmo padrão de remodelação cardíaca e disfunção sistólica, que não foi alterado pelo exercício. O tamanho do IM e a área seccional transversa das fibras do músculo sóleo não diferiram entre os grupos. A atividade da catalase foi menor nos grupos IM e IM-HIIT que no Sham. A atividade da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase e a concentração de hidróperóxido de lipídeo não diferiram entre os grupos. A atividade de enzimas do metabolismo muscular esquelético não diferiu entre os grupos IM e Sham. O HIIT aumentou a atividade da citrato sintase em relação aos grupos Sham e IM, e fosfofrutoquinase e carnitina palmitoiltransferase 1 em relação ao grupo IM. **Conclusão:** O treinamento aeróbico intervalado de alta intensidade melhora a capacidade funcional de ratos infartados, independentemente de alterações no processo de remodelação cardíaca. Melhora da capacidade física é acompanhada por

aumento da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético do músculo sóleo.

# INTRODUÇÃO

-

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo <sup>1</sup>. Entre elas, destacam-se a isquemia e o infarto do miocárdio, doenças isquêmicas resultantes da obstrução de artérias coronárias por aterosclerose e trombose <sup>1</sup>. No Brasil, há registro de 400 mil casos por ano, com um óbito para cada sete casos de infarto agudo do miocárdio. Apesar do avanço no tratamento da fase aguda, pacientes que sobrevivem ao infarto agudo do miocárdio apresentam alto risco de evoluir com falência ventricular, insuficiência cardíaca e óbito <sup>2</sup>.

No infarto, a obstrução ao fluxo sanguíneo coronariano leva, inicialmente, à morte dos cardiomiócitos. Concomitantemente à necrose miocitária, ocorre desintegração do colágeno interfibrilar, que favorece o afinamento da parede infartada e a dilatação da cavidade ventricular esquerda. Este processo agudo, conhecido como expansão pós-infarto, ocorre em período de poucos dias após o infarto <sup>3</sup>. Cronicamente, inicia-se o processo de remodelação cardíaca, que é definido como a ocorrência de alterações moleculares, celulares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por modificações na arquitetura, tamanho, massa, geometria e função do coração <sup>4</sup>. Como as alterações evoluem progressivamente para deterioração da função cardíaca, o processo de remodelação é considerado fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular e insuficiência cardíaca <sup>4</sup>.

A insuficiência cardíaca caracteriza-se pela redução da tolerância aos exercícios físicos causada pela ocorrência precoce de

-

fadiga e dispnéia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatogenia ainda não é completamente compreendida <sup>5, 6</sup>. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para realizar atividades físicas fosse causada por diminuição da função cardíaca com conseqüente congestão pulmonar e redução da perfusão e oxigenação tecidual. Posteriormente, foi observado que há fraca associação entre variáveis hemodinâmicas e de função ventricular em repouso e tolerância ao exercício, tanto em humanos como em animais com insuficiência cardíaca <sup>7-10</sup>. Como não foi confirmada a suposição inicial que a capacidade para exercícios fosse diretamente relacionada ao grau de disfunção ventricular, foi levantada a hipótese que alterações primárias na musculatura esquelética periférica pudessem ter papel na tolerância reduzida aos exercícios físicos <sup>11, 12</sup>.

A partir de 1990, diversas anormalidades passaram a ser descritas em músculos esqueléticos durante o processo de remodelação cardíaca como atrofia, aumento de fibrose e redução da densidade capilar <sup>13-19</sup>. Além das alterações estruturais, também foram descritas anormalidades metabólicas, enzimáticas e bioquímicas na insuficiência cardíaca <sup>10, 20, 21</sup>. Alterações no padrão das fibras musculares esqueléticas, com modificações da proporção entre fibras do tipo II, rápidas, e fibras do tipo I, lentas, têm sido frequentemente encontradas na insuficiência cardíaca <sup>16, 19, 22</sup>. O

-  
conjunto das anormalidades da musculatura esquelética foi denominado miopatia associada à insuficiência cardíaca.

Os fatores responsáveis pela miopatia ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns fatores podem estar envolvidos como redução da atividade física e neuromuscular e ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanha o desenvolvimento da insuficiência cardíaca <sup>23, 24</sup>.

Mais recentemente, aumento do estresse oxidativo tem sido considerado importante fator no desenvolvimento de alterações musculares <sup>20, 25</sup>. Estresse oxidativo pode ser definido como estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e mecanismos endógenos antioxidantes <sup>26</sup>. Na insuficiência cardíaca, o estresse oxidativo é frequentemente aumentado tanto no miocárdio como na musculatura esquelética <sup>27-29</sup>. Em músculos periféricos, o sistema de enzimas antioxidantes, composto pelas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, protege as células das ações de espécies reativas de oxigênio <sup>30</sup>. Em estudos clínicos e experimentais, foi observado que a expressão e atividade de enzimas antioxidantes encontram-se reduzidas durante a insuficiência cardíaca <sup>25</sup>.

Apesar do grande progresso no tratamento da remodelação e insuficiência cardíaca, sua mortalidade ainda permanece elevada <sup>1</sup>. Além disso, não há terapia específica para prevenção ou recuperação de alterações da musculatura esquelética associadas à insuficiência cardíaca. Assim, há grande

-

interesse no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento da progressiva deterioração muscular decorrente da insuficiência cardíaca. Mais recentemente, diretrizes internacionais <sup>31, 32</sup> e brasileira <sup>33</sup> passaram a preconizar a prática regular de exercícios físicos para o tratamento de pacientes estáveis, com insuficiência cardíaca em classes funcionais I a III de acordo com a classificação da New York Heart Association. Assim, o exercício físico tem sido considerado importante estratégia terapêutica não farmacológica na prevenção e reabilitação de doenças cardiovasculares incluindo a insuficiência cardíaca <sup>34-39</sup>.

Desde os trabalhos clássicos de Sullivan et al. <sup>40, 41</sup>, diversos estudos têm mostrado efeitos benéficos do exercício físico aeróbio contínuo de moderada intensidade, que afeta positivamente a função cardiovascular e marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, considera-se que o exercício físico apresenta papel importante na preservação e recuperação da massa muscular em doentes com insuficiência cardíaca <sup>42, 43</sup>. O exercício físico propicia aumento na atividade de enzimas antioxidantes, na densidade capilar, na proporção de fibras musculares do tipo I, na área seccional transversa das fibras, e na força e resistência muscular <sup>44</sup>. Adicionalmente, a prática regular de exercícios melhora a capacidade funcional e qualidade de vida, e reduz taxa de reinternações hospitalares <sup>45-47</sup>. Portanto, este tipo de exercício tem

-  
sido considerado a melhor modalidade para pacientes com insuficiência cardíaca <sup>48, 49</sup>.

Entretanto, mais recentemente, tem sido aventado que exercício aeróbico de alta intensidade intercalado com treinamento de moderada intensidade (“high intensity interval training”, HIIT) poderia promover benefícios superiores ao treinamento aeróbio contínuo <sup>34, 50-56</sup>. O maior aumento no pico de consumo de oxigênio com este tipo de exercício poderia estar envolvido em seus melhores resultados <sup>50, 57, 58</sup>. De fato, Moholdt et al. <sup>50</sup> mostraram que a intensidade do exercício é um fator importante na melhora da qualidade de vida, do remodelamento do ventrículo esquerdo e da função endotelial de pacientes com insuficiência cardíaca pós-infarto. Apesar de resultados iniciais promissores, ainda não está estabelecida a superioridade do treinamento intervalado de alta intensidade sobre o exercício aeróbio contínuo em moderada intensidade. Além disso, o impacto do HIIT sobre dimensões cardíacas e função ventricular e endotelial permanece incerto na insuficiência cardíaca <sup>48, 49, 59-61</sup> e alguns autores observaram efeitos deletérios desta modalidade de exercício na remodelação cardíaca induzida por sobrecarga pressórica <sup>62</sup>.

Os mecanismos envolvidos na resposta cardíaca aos exercícios de alta e moderada intensidade não estão completamente esclarecidos. Em ratos infartados com insuficiência cardíaca, o HIIT foi capaz de reverter parcialmente a disfunção contrátil de miócitos atriais <sup>63</sup>. Adicionalmente, esse tipo de

-  
exercício atenuou o declínio no desempenho cardíaco em camundongos com alteração do gene para SERCA-2 <sup>64</sup>.

Na musculatura esquelética, o HIIT também levou a resultados conflitantes. Tzanis et al <sup>65</sup> observaram que o HIIT reverteu a miopatia associada à insuficiência cardíaca. Por outro lado, Moreira et al <sup>66</sup> observaram que, apesar de superior na melhora da capacidade funcional de ratos infartados, o HIIT não diferiu do exercício aeróbio contínuo em seus efeitos benéficos na musculatura esquelética. Além disso, em ratos hipertensos, o HIIT foi inferior ao exercício moderado em melhorar a capacidade oxidativa de músculos esqueléticos <sup>67</sup>.

Devido aos resultados conflitantes existentes na literatura, neste trabalho avaliamos os efeitos do exercício físico aeróbio intervalado de alta intensidade sobre a capacidade funcional e o processo de remodelação cardíaca de ratos após longa evolução de infarto do miocárdio. No músculo esquelético sóleo, analisamos o trofismo muscular, marcadores do estresse oxidativo, e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético.

## **OBJETIVOS**

## **Objetivo geral**

Avaliar o efeito do exercício aeróbico intervalado de alta intensidade sobre a capacidade funcional e o processo de remodelação cardíaca de ratos após longa evolução de 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 e do metabolismo energético no músculo sóleo de ratos infartados;
- 3) Mensurar a área transversa das fibras musculares do músculo sóleo de ratos infartados.

# **MATERIAIS 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 ( $24 \pm 2$  °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 (Protocolo nº 1236/2017-CEUA).

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório<sup>22</sup>. 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 três grupos experimentais: 1) Sham (n=20); 2) IM sedentário (IM, n=26); 3) IM submetido a protocolo de exercício físico aeróbio intervalado de alta intensidade (IM-HIIT, n=24).

Em estudos prévios <sup>18, 68</sup> verificamos que, os ratos frequentemente apresentam insuficiência cardíaca a partir do sexto mês pós-cirurgia; 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 do treinamento, as estruturas cardíacas e a função do ventrículo esquerdo (VE) foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico.

Ao final do período experimental, foi realizado novo ecocardiograma. No dia seguinte, 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 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) <sup>18, 68</sup>.

## **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<sup>10,69</sup>. Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações, por 5 min/dia. O resultado do teste de capacidade física realizado após 45 dias de treinamento foi utilizado para ajuste da intensidade do exercício.

## **Protocolo de exercício físico**

O exercício físico aeróbico intervalado de alta intensidade 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 1. A partir da sexta semana, os animais foram submetidos a sessões de treinamento que consistiram de 3 minutos a 60% da capacidade máxima (considerada a maior velocidade atingida no teste de esforço máximo), seguido de 4 minutos a 85%. Esta sequência foi repetida sete vezes, totalizando 49 minutos cada

sessão; o treinamento foi mantido por três meses. O protocolo foi adaptado daquele utilizado por Moreira et al. <sup>66</sup>.

Tabela 1. Adaptação ao protocolo de exercício físico aeróbio

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

### **Avaliação das estruturas cardíacas e função ventricular *in vivo***

As estruturas cardíacas e a função do VE foram analisadas antes e após o período de treinamento por ecocardiograma transtorácico. A avaliação inicial teve como objetivo certificar a homogeneidade entre os grupos. Decorridas 48 horas após o teste de esforço final, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado equipamento da 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 laboratório <sup>70, 71</sup>. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography <sup>72</sup>. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos.

As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólicas da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); 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 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 (IMVE) pela divisão da massa do VE pelo peso corporal. A espessura relativa do VE foi calculada como  $2 \times EDPP/DDVE$ . 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: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endoc.):  $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$ ; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Enc. Mesoc.):  $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)$ ; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente

máxima do movimento sistólico da parede posterior; 4) fração de ejeção (FE):  $(DDVE^3 - DSVE^3)/DDVE^3$ ; 5) velocidade de deslocamento do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular; 6) porcentagem de variação da área do VE; e 7) índice de performance miocárdica do VE (índice de Tei). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); 4) picos de velocidade de deslocamentos diastólicos inicial (E') e tardio (A') do anel mitral obtidos por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E').

### **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. No dia seguinte à avaliação ecocardiográfica final, os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta de 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 4 °C, 4000 rpm durante 15 min; amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C. A seguir, foram

-

dissecados os músculos sóleos dos membros pélvicos direito e esquerdo. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. O peso dos pulmões foi utilizado para avaliação do grau de congestão pulmonar. Fragmentos do pulmão e 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 h e, a seguir, lavadas em água corrente e transferidas para solução com etanol 70%, de acordo com o método previamente descrito <sup>68</sup>. 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 Picrosirius 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 do músculo sóleo foi avaliado por análise morfométrica. Para o preparo de lâminas histológicas, 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 criostato (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 <sup>16</sup>. Em cada lâmina, foi efetuada a mensuração de 150 a 200 fibras musculares. Todas as análises histológicas foram realizadas utilizando o software Image J, por um mesmo examinador cego ao tratamento.

## **Avaliação do metabolismo energético**

Foram analisadas a atividade máxima de enzimas que participam do metabolismo da 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 músculo sóleo (30 mg) 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 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 foram utilizados 10 µL de amostra e tampão de ensaio contendo 50 mM Tris HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM 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 nm <sup>73</sup>. Para a mensuração da atividade da piruvato quinase (PK), utilizamos 1 µL de amostra e tampão contendo 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 340 nm em placas ultravioleta (UV) <sup>74</sup>. Para as análises enzimáticas de LDH, utilizamos kits comerciais da LABTEST, seguindo o protocolo do fabricante (LDH liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, Brasil). A atividade da citrato sintase

-

foi medida em mistura de reação contendo 100 mM de Tris-HCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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), em pH 8,1, e 2 µL da amostra. A taxa de alteração da absorbância foi monitorada a 412 nm <sup>75</sup>. A atividade máxima da enzima carnitina palmitoiltransferase 1 foi avaliada utilizando 20 µL de amostra em 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 nm <sup>76</sup>.

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 em solução com 10 µL da amostra e tampão de ensaio contendo 50 mM Tris HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 0,2 mM NADH, 1 mM ATP, 10 mM creatina, 2 mM de fosfoenolpiruvato, 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 creatina e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorbância em 340 nm em 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.

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

Amostras de músculo esquelético (100 mg) foram descongeladas e homogenizadas 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 quantificação de proteínas totais e hidroperóxido de lipídeo, e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England), em leitor de microplaca ( $\mu$ 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 glutathione peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada por meio da oxidação da glutathione 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 µL 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  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal). O  $\text{Fe}^{3+}$  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.

### **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 Bonferroni. Para variáveis não paramétricas, as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Teste t de Student ou teste de Mann-Whitney foram utilizados para comparar o tamanho de infarto entre os grupos infartados. O teste de Goodman foi utilizado para comparar a frequência de sinais clínico

-  
e patológicos de insuficiência cardíaca e a mortalidade entre os grupos infartados. O nível de significância considerado foi de 5%.

# RESULTADOS

## **Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas**

Após a indução do infarto, o grau de remodelação cardíaca, disfunção ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca depende do tamanho do infarto. Portanto, para que os animais apresentassem graus homogêneos de injúria cardíaca, ratos com infartos pequenos, menores que 30% da área do VE à análise histológica, foram excluídos do estudo. Assim, no grupo IM foram excluídos 13 animais e no grupo IM-HIIT 9. Durante o experimento, morreram 4 ratos do grupo IM e 6 do IM-HIIT; a mortalidade não diferiu significativamente entre os grupos infartados. Portanto, o estudo foi concluído com 20 animais no grupo Sham e 9 nos grupos IM e IM-HIIT. No grupo Sham, todos os 20 ratos sobreviveram até o final do período experimental.

A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca está apresentada na Tabela 2. O grupo IM 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-HIIT, efusão pleural, congestão pulmonar e hipertrofia do VD foram observadas em 2 ratos e ascite em 3. A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca não diferiu significativamente entre os grupos.

O peso corporal inicial e final e o peso do VE não diferiram entre os grupos. As variáveis anatômicas estão apresentadas na Tabela 3. O peso do ventrículo direito

-

normalizado pelo peso corporal, o peso dos átrios em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, e o peso dos pulmões foram maiores nos grupos IM e IM-HIIT que no Sham. O peso absoluto do ventrículo direito e a relação peso dos pulmões/peso corporal foram maiores no grupo IM que no Sham. Não verificamos diferenças entre os grupos IM-HIIT e IM.

O tamanho do infarto, avaliado por análise histológica do VE, não diferiu entre os grupos (IM  $39,6 \pm 5,95\%$ ; IM-HIIT  $42,0 \pm 7,00\%$  da área total do VE;  $P > 0,05$ ; Figura 1).

### **Teste de esforço**

No teste de esforço realizado antes do protocolo de exercícios, o tempo de permanência na esteira e a distância percorrida foram menores no grupo IM que no Sham e não diferiram entre os grupos infartados. Ao final do período experimental, o desempenho físico foi melhor no grupo IM-HIIT que outros grupos, caracterizado por maior tempo de permanência na esteira e distância percorrida (Figura 2).

### **Avaliação ecocardiográfica**

Exame ecocardiográfico foi realizado antes do início do protocolo de treinamento para assegurar distribuição homogênea dos ratos entre os grupos infartados. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das variáveis estruturais no início do

-

experimento. Os grupos IM e IM-HIIT apresentaram DDVE, DSVE, EDPP, AE/AO, DDVE/peso corporal (PC), MVE, e IMVE maiores que o grupo Sham. No grupo IM, AE e AE/PC foram maiores que no Sham. DDVE foi menor no grupo IM-HIIT que no IM. A porcentagem da área infartada não diferiu os grupos infartados. Resultados da avaliação inicial da função sistólica do VE estão mostrados na Tabela 5. Os grupos IM e IM-HIIT tiveram menor porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, VEPP, FE, porcentagem de variação da área, e  $S'$  média, e maior índice de Tei que o Sham. O índice de Tei avalia conjuntamente o desempenho miocárdico sistólico e diastólico; quanto menor seu valor, melhor o desempenho funcional do VE. Em relação à função diastólica, o grupo IM teve maior E/E' média que o Sham e maior E mitral que os grupos Sham e IM-HIIT. O grupo IM-HIIT apresentou maior TRIV e E' média que o Sham (Tabela 6).

Ao final do período experimental, os grupos IM e IM-HIIT apresentaram variáveis estruturais (DDVE, DSVE, EDPP, AE, AE/AO, DDVE/PC, AE/PC, MVE, IMVE) maiores que o Sham, e mantiveram o padrão de disfunção sistólica observado no exame inicial (Tabelas 7 e 8). O exercício não alterou as variáveis estruturais ou de função sistólica. A função diastólica não diferiu entre os grupos, exceto por aumento da relação E/E' média no grupo IM-HIIT em comparação ao Sham (Tabela 9).

### **Análise do trofismo muscular**

A área seccional transversa do músculo sóleo, avaliada em cortes histológicos, não diferiu entre os grupos (Figura 3).

### **Atividade de enzimas do metabolismo energético**

A atividade das enzimas do metabolismo energético no músculo sóleo não foi alterada pelo infarto do miocárdio (Tabela 10). O exercício físico aumentou a atividade da piruvato quinase e carnitina palmitoiltransferase 1 em relação ao grupo IM e da citrato sintase em relação aos grupos Sham e IM.

### **Avaliação do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo, avaliado pela concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo, não diferiu entre os grupos. A atividade da catalase foi menor nos grupos IM e IM-HIIT que no Sham (Tabela 11).

Tabela 2. Frequência (porcentagem e número absoluto) de sinais clínico e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca

	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
Trombo em átrios	11% (1)	-
Efusão pleural	11% (1)	22% (2)
Congestão pulmonar	44% (4)	22% (2)
Hipertrofia do VD	33% (3)	22% (2)
Ascite	22% (2)	33% (3)

IM: infarto do miocárdio; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; VD: ventrículo direito. Teste de Goodman;  $P > 0,05$ .

**Tabela 3. Variáveis anatômicas**

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
PC (g)	532 ± 47,3	544 ± 62,8	518 ± 56,0
VE (U/S)	4,00 (3,77-4,24)	4,13 (3,94-4,42)	3,89 (3,13-4,86)
VD (g)	0,23 (0,21-0,26)	0,36 (0,29-0,47) *	0,26 (0,24-0,43)
VD/PC (mg/g)	0,45 (0,40-0,47)	0,71 (0,52-0,90) *	0,55 (0,47-0,74) *
VD (U/S)	4,05 (3,80-4,26)	4,38 (3,94-5,10)	4,31 (4,11-4,37)
Átrios (g)	0,10 (0,09-0,12)	0,15 (0,11-0,31) *	0,21 (0,11-0,29) *
Átrios/PC (mg/g)	0,20 (0,16-0,24)	0,32 (0,22-0,54) *	0,41 (0,22-0,56) *
Átrios (U/S)	4,19 (3,77-4,86)	4,69 (3,29-5,54)	5,17 (4,04-8,52)
Pulmão (g)	1,93 ± 0,62	2,98 ± 0,89 *	2,34 ± 0,59 *
Pulmão/PC (mg/g)	3,66 (3,27-3,86)	5,18 (4,03-7,35) *	3,94 (3,73-5,52)
Pulmão (U/S)	4,49 (4,38-4,54)	4,28 (3,89-4,87)	4,54 (4,15-4,78)
Sóleo (g)	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,04
Sóleo/PC (g)	0,47 ± 0,05	0,43 ± 0,07	0,47 ± 0,06

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; U/S: relação entre peso úmido e peso seco. Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis. \* P<0,05 vs Sham.

Tabela 4. Avaliação ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
PC (g)	463 ± 41,9	458 ± 42,7	448 ± 42,0
FC (bpm)	284 ± 25,6	295 ± 26,1	267 ± 30,6
DSVE (mm)	17,7 (16,9 - 18,5)	23,2 (21,1 - 25,2)*	21,5 (20,7 - 24,2)*
EDPP (mm)	1,33 (1,27 - 1,37)	1,65 (1,53 - 1,96)*	1,63 (1,53 - 1,82)*
AO (mm)	4,01 (3,83 - 4,01)	3,94 (3,74 - 4,01)	3,83 (3,75 - 3,98)
AE/AO	1,36 (1,31 - 1,41)	1,94 (1,66 - 2,33)*	1,70 (1,41 - 1,82)*
DDVE/PC (mm/kg)	17,7 (16,1 - 18,5)	23,2 (21,1 - 25,2)*	21,5 (20,7 - 24,2)*
AE/PC (mm/kg)	11,8 (10,5 - 12,7)	17,4 (13,9 - 19,6)*	14,7 (12,0 - 16,5)
MVE (g)	0,73 (0,66 - 0,80)	1,53 (1,21 - 1,75)*	1,25 (0,96 - 1,49)*
IMVE (g/kg)	1,56 (1,51 - 1,69)	3,58 (2,63 - 3,97)*	2,85 (2,15 - 3,17)*
Esp. Rel. VE	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,04
% infarto		41,2 ± 7,6	36,7 ± 6,7

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE. Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs IM.

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

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
% Enc. Endoc.	56,0 ± 3,32	31,4 ± 5,78*	31,8 ± 4,8*
% Enc. Mesoc.	48,8 ± 3,77	20,7 ± 6,2*	21,1 ± 4,6*
VEPP (mm/s)	39,8 ± 5,4	24,5 ± 7,67*	29,1 ± 7,15*
Tei	0,45 (0,43 - 0,53)	0,74 (0,61 - 0,90)*	0,71 (0,56 - 0,80)*
FE	0,86 (0,84 - 0,89)	0,52 (0,42 - 0,57)*	0,49 (0,44 - 0,57)*
% var. área	66,1 (63,7 - 69,2)	26,1 (20,2 - 37,4)*	34,2 (28,7 - 39,7)*
S' média (cm/s)	3,47 ± 0,33	3,13 ± 0,36*	2,98 ± 0,25*

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; % 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; % var. área: fração de variação de área; S': velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (média das paredes lateral e septal). Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham.

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

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
E/A	1,71 (1,49 - 1,86)	2,02 (1,38 - 5,55)	1,72 (1,39 - 1,95)
TRIV (ms)	26,0 (22,0 - 26,0)	30,0 (25,0 - 33,0)	30,0 (25,0 - 36,0)*
TDE (ms)	48,5 (45,0 - 56,0)	39,0 (35,5 - 46,3)	48,5 (42,5 - 59,5)
E' média (cm/s)	4,15 ± 0,72	4,10 ± 0,52	3,49 ± 0,36*
E' lateral (cm/s)	4,09 ± 0,81	4,33 ± 0,86	3,6 ± 0,69
E' septal (cm/s)	4,21 ± 0,74	3,86 ± 0,61	3,35 ± 0,31
E/E' media	18,8 (16,9 - 21,6)	24,1 (20,6 - 25,5)*	23,0 (20,8 - 23,9)
A' média (cm/s)	2,90 (2,50 - 4,05)	2,85 (2,58 - 3,58)	2,75 (2,43 - 3,79)
A' lateral (cm/s)	3,20 (2,63 - 4,35)	3,00 (2,40 - 4,00)	2,70 (2,48 - 4,05)
A' septal (cm/s)	2,70 (2,40 - 3,08)	3,30 (2,40 - 4,50)	2,50 (2,33 - 3,65)
E' média/A' media	1,38 ± 0,37	1,35 ± 0,47	1,20 ± 0,26

IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; 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; 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 Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs IM.

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
PC (g)	547 ± 38,1	550 ± 59,8	517 ± 58,6
FC (bpm)	269 ± 46,8	301 ± 32,3	309 ± 38,9
DSVE (mm)	4,14 (3,96 - 4,30)	8,92 (8,32 - 9,65)*	8,59 (6,91 - 9,10)*
EDPP (mm)	1,40 (1,38 - 1,45)	1,80 (1,63 - 2,03)*	1,72 (1,58 - 1,86)*
AO (mm)	4,20 ± 0,16	4,01 ± 0,23*	4,07 ± 0,18
AE/AO	1,37 (1,25 - 1,43)	2,22 (1,60 - 2,36)*	1,56 (1,45 - 2,35)*
DDVE/PC (mm/kg)	15,0 (14,4 - 16,3)	21,5 (18,5 - 22,20)*	20,6 (17,8 - 22,6)*
AE/PC (mm/kg)	10,5 (9,22 - 11,1)	15,9 (11,8 - 17,6)*	13,9 (11,5 - 17,3)*
MVE (g)	0,85 (0,76 - 0,92)	1,66 (1,44 - 2,07)*	1,43 (1,27 - 1,74)*
IMVE (g/kg)	1,53 (1,46 - 1,70)	3,32 (2,63 - 4,11)*	3,00 (2,57 - 3,38)*
Esp. Rel. VE	0,35 (0,33 - 0,36)	0,32 (0,30 - 0,36)	0,35 (0,30 - 0,37)
% infarto		44,0 (34,2 - 47,8)	37,9 (29,1 - 46,1)

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbico intervalado de alta intensidade; n: número de animais; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE. Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham.

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

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
% Enc. Endoc.	50,1 ± 3,58	19,8 ± 6,28*	22,0 ± 5,19*
% Enc. Mesoc.	57,4 ± 3,06	30,6 ± 5,76*	32,5 ± 5,41*
VEPP (mm/s)	41,1 ± 5,68	25,4 ± 9,35*	31,8 ± 10,0*
Tei	0,45 (0,42 - 0,50)	0,62 (0,52 - 0,69)*	0,62 (0,56 - 0,69)*
FE	0,88 (0,85 - 0,90)	0,46 (0,40 - 0,55)*	0,49 (0,45 - 0,59)*
% var. área	68,5 ± 4,73	29,6 ± 8,92*	34,3 ± 8,58*
S' média (cm/s)	3,55 ± 0,36	2,80 ± 0,49*	2,98 ± 0,43*

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; % 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; % var. área: fração de variação de área; S': velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (média das paredes lateral e septal). Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham.

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

	Sham (n=20)	IM (n=9)	IM-HIIT (n=9)
E/A	1,71 (1,36 - 1,82)	4,27 (1,27 - 6,12)	1,20 (1,08 - 4,31)
TRIV (ms)	26,0 (24,0 - 28,0)	24,0 (22,0 - 33,0)	26 (22,0 - 32,3)
TDE (ms)	51,0 (48,0 - 55,8)	33,0 (33,0 - 51,0)*	39,0 (32,2 - 46,3)*
E' média (cm/s)	4,16 ± 0,68	4,18 ± 0,76	3,67 ± 0,39
E' lateral (cm/s)	4,24 ± 0,86	4,39 ± 1,06	3,46 ± 0,55
E' septal (cm/s)	4,09 ± 0,68	3,97 ± 1,22	3,89 ± 0,42
E/E' media	19,2 ± 2,90	23,0 ± 3,35	24,8 ± 4,89*
A' média (cm/s)	3,67 ± 1,26	3,31 ± 1,35	3,93 ± 1,31
A' lateral (cm/s)	3,40 (2,75 - 4,65)	2,70 (2,20 - 2,90)	3,40 (2,20 - 5,40)
A' septal (cm/s)	3,58 ± 1,31	3,44 ± 1,31	4,01 ± 1,28
E' média/A' media	1,29 ± 0,54	1,38 ± 0,42	1,06 ± 0,46

IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; 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; 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 Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs IM.

**Tabela 10.** Atividade de enzimas envolvidas no metabolismo

## energético

	Sham (n=8)	IM (n=8)	IM-HIIT (n=8)
CK	41,1 ± 4,96	40,5 ± 4,30	37,0 ± 13,9
PFK	16,2 (15,6-20,7)	20,6 (17,5-25,2)	19,7 (17,3-25,2)
PK	203 ± 32,2	187 ± 47,4	249 ± 40,6 #
LDH	495 ± 136	525 ± 55,9	540 ± 93,1
CS	66,0 ± 8,02	66,1 ± 10,1	81,3 ± 6,69 *#
CPT1	2,27 ± 0,60	2,35 ± 0,32	3,18 ± 0,67 #

IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; Unidade: nmol/min\*mg prot; CK: creatina quinase; PFK: fosfofrutoquinase; PK: piruvato quinase; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05; # P<0,05 vs IM.

Tabela 11. Avaliação do estresse oxidativo

	Sham (n=8)	IM (n=8)	IM-HIIT (n=8)
HP	106 ± 16,5	121 ± 12,9	98,9 ± 26,7
SOD	16,6 (15,8-17,7)	18,4 (16,9-20,3)	15,5 (14,5-17,9)
CAT	56,4 ± 4,95	39,8 ± 10,0 *	31,7 ± 5,25 *
GPX	169 ± 33,0	126 ± 27,5	146 ± 41,7

IM: infarto do miocárdio sedentário; IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n: número de animais; HP: hidroperóxido de lipídeo (nmol/g tecido); SOD: superóxido dismutase (nmol/mg proteína); CAT: catalase (µmol/g tecido); GPX: glutathiona peroxidase (nmol/mg tecido). Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância com pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis; \* P<0,05 vs Sham.

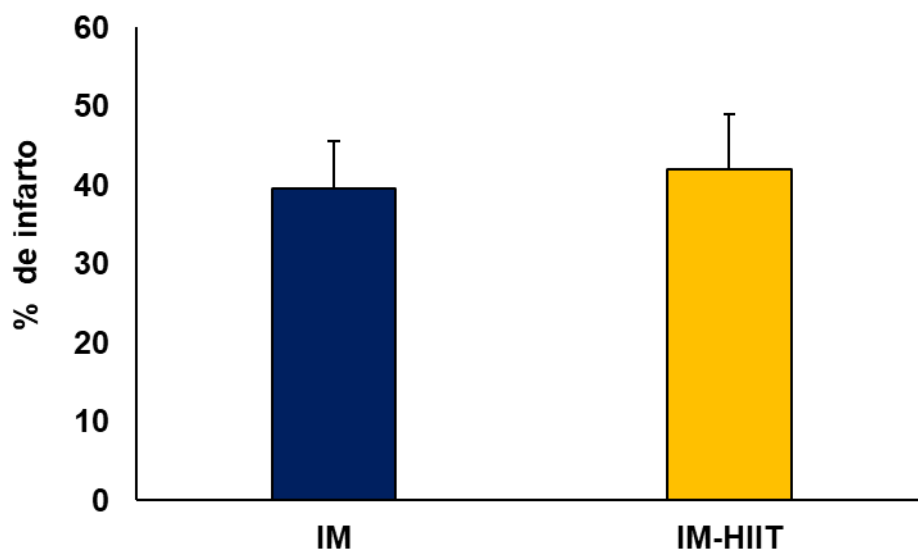


Figura 1. Tamanho do infarto do miocárdio em relação à área total do ventrículo esquerdo. Média e desvio padrão; IM: infarto do miocárdio sedentário (n=9); IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade (n=9). Teste t; P>0,05.

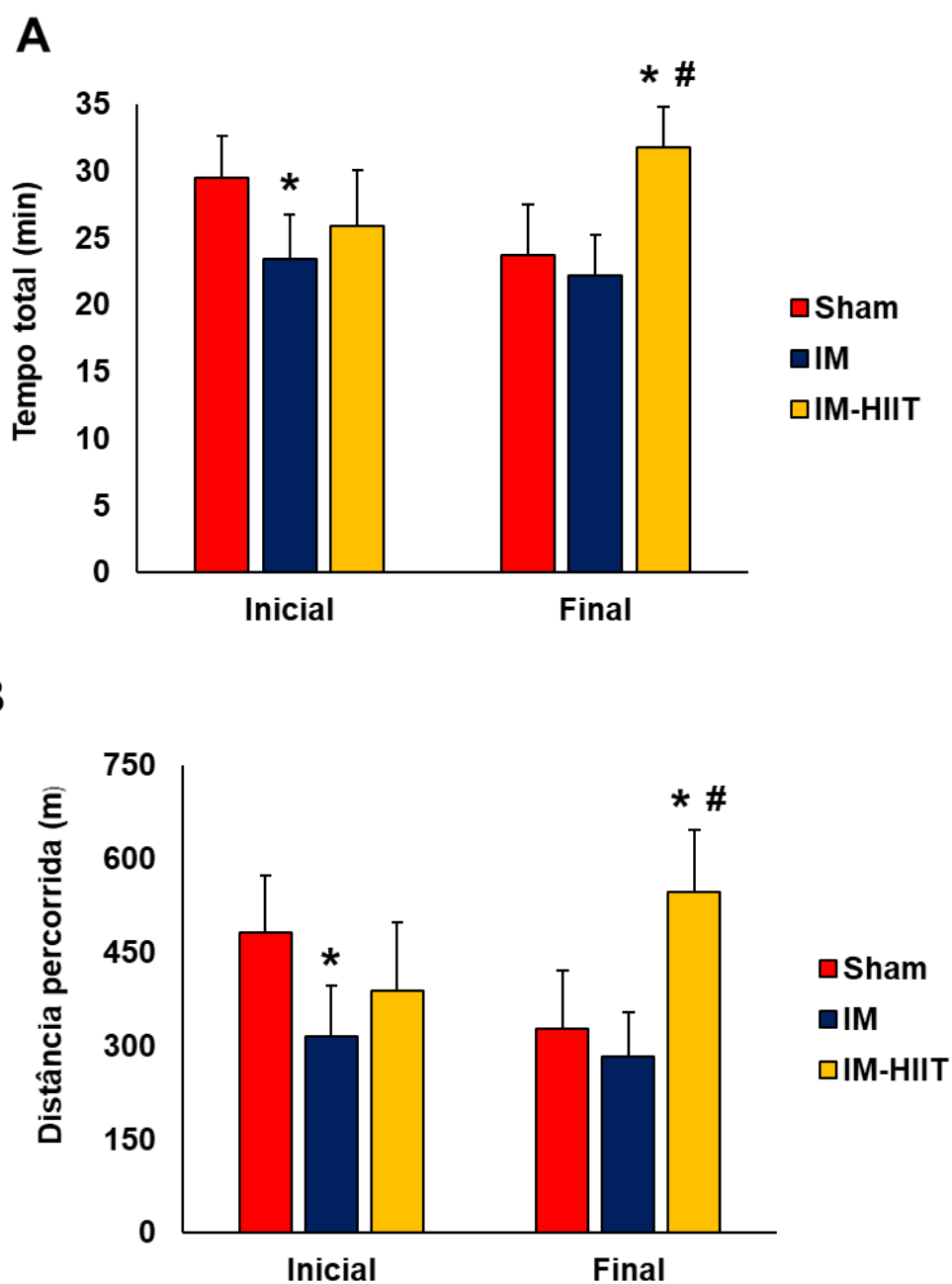


Figura 2. Avaliação da capacidade funcional. Tempo total (A) e distância percorrida (B) nos testes de esforço inicial e final. Média e desvio padrão; Sham (n=14); IM: infarto do miocárdio sedentário (n=8); IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade (n=7). Análise de variância com pós teste de Bonferroni. \*  $P < 0,05$  vs Sham, #  $P < 0,05$  vs IM.

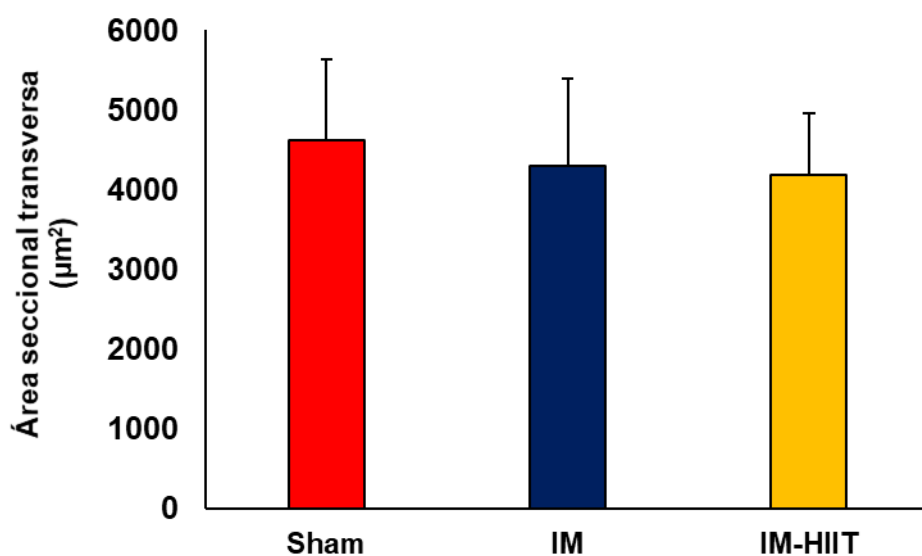


Figura 3. Área seccional transversa do músculo sóleo avaliada em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. Média e desvio padrão; IM: infarto do miocárdio sedentário, IM-HIIT: infarto do miocárdio submetido a exercício aeróbio intervalado de alta intensidade; n=8 animais por grupo. Análise de variância com pós teste de Bonferroni;  $P > 0,05$ .

# DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os efeitos do exercício aeróbio intervalado de alta intensidade sobre a capacidade funcional, a remodelação cardíaca, e o músculo esquelético sóleo de ratos com infarto do miocárdio.

O infarto do miocárdio tem sido frequentemente utilizado como modelo experimental para indução de remodelação cardíaca, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca<sup>68</sup>. O modelo possui as vantagens de mimetizar causas comuns de injúria cardíaca em humanos, como a isquemia e o infarto do miocárdio, evoluir lentamente para insuficiência cardíaca, e possuir custo relativamente baixo<sup>68</sup>. Como desvantagem, chama a atenção o tamanho imprevisível do infarto após a oclusão da artéria coronária.

Em ratos, o tamanho do infarto após a ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda depende da anatomia da circulação coronariana. Assim, após ligação desta artéria, ratos podem apresentar infartos que variam de pequeno a grande porte<sup>68, 77</sup>. Como infartos pequenos cursam com remodelação cardíaca mínima ou ausente no período de seis meses, e para uniformizar o grau de injúria miocárdica, excluímos deste estudo ratos com área infartada menor que 30% da área total do ventrículo esquerdo. Conseqüentemente, a média do tamanho do infarto foi de aproximadamente 40% nos grupos IM e IM-HIIT. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que o tamanho mínimo do infarto para que ratos desenvolvam alterações

-

morfológicas, funcionais e clínicas é de 36%, 38%, e 40%, respectivamente <sup>77</sup>. O tamanho do infarto é completamente estabelecido no prazo de 24 horas após a ligação da artéria coronária. Desta forma, não seria esperado redução do tamanho do infarto pelo treinamento físico.

Em decorrência à inclusão de ratos com infartos maiores que 30%, o processo de remodelação cardíaca foi evidente neste estudo. Após três meses da indução do infarto, e antes do treinamento físico, observou-se ao ecocardiograma dilatação e hipertrofia do VE com disfunção sistólica caracterizada por piora de todos os sete índices de função sistólica avaliados. Alteração da disfunção diastólica não foi detectada nos ratos infartados. O grupo IM-HIIT não diferiu do grupo IM antes do treinamento físico.

A capacidade física não diferiu entre os grupos IM-HIIT e IM antes do protocolo de treinamento. O HIIT foi seguro, bem tolerado, e resultou em aumento substancial da capacidade funcional do grupo IM-HIIT em relação aos grupos Sham e IM. Melhora da capacidade funcional tem sido observada em ratos infartados após exercícios de moderada ou alta intensidade <sup>66</sup>.

Ao final do protocolo, os grupos infartados mantiveram o mesmo padrão de remodelação cardíaca e disfunção ventricular sistólica, que não foi alterado pelo exercício físico. Da mesma maneira, a frequência de sinais de insuficiência cardíaca não diferiu entre os grupos IM-HIIT e IM. Como a frequência de

-

sinais foi relativamente baixa, podemos concluir que, neste estudo, avaliamos os efeitos do exercício em ratos com disfunção ventricular importante, porém antes do desenvolvimento de insuficiência cardíaca na maioria dos casos.

Como o processo de remodelação cardíaca não foi alterado pelo exercício, a melhora da capacidade funcional e da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo energético podem ser consideradas consequência direta do treinamento físico, e não decorrentes de melhora da função cardíaca.

A área seccional transversa do músculo sóleo não diferiu entre os três grupos. Este resultado mostra que os ratos infartados ainda não tinham desenvolvido atrofia da musculatura esquelética, processo frequentemente observado na insuficiência cardíaca avançada <sup>23, 68</sup>.

O HIIT aumentou a atividade das seguintes enzimas envolvidas no metabolismo energético: citrato sintase em relação aos grupos Sham e IM, e fosfofrutoquinase e carnitina palmitoiltransferase 1 em relação ao grupo IM.

O estresse oxidativo é caracterizado por aumento das espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio. Ele pode ser causado por redução da capacidade antioxidante devida a baixas concentrações de antioxidantes e piora da atividade de enzimas antioxidantes, e/ou por produção aumentada de espécies reativas de oxigênio <sup>78</sup>. Em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio atuam ativando ou inibindo enzimas tais como as

proteínas quinases ativadas por mitógenos, fosfatases, e cascatas dependentes de genes e têm papel essencial na sinalização redox e sobrevivência celular<sup>79</sup>. Entretanto, elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio induzem alterações ou dano em DNA, proteínas e lipídeos, e pode estimular morte celular por apoptose<sup>78, 80</sup>.

Os músculos esqueléticos consomem grandes quantidades de oxigênio e podem gerar quantidade substancial de espécies reativas de oxigênio. Estas são principalmente geradas na mitocôndria durante a respiração normal como produtos derivados da fosforilação oxidativa<sup>81, 82</sup>. As espécies reativas de oxigênio também podem ser produzidas no citosol e membranas em resposta a diferentes estímulos como fatores de crescimento e citocinas inflamatórias<sup>20, 21, 81</sup>. Várias enzimas participam da geração de espécies reativas de oxigênio como xantina oxidase, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), e óxido nítrico sintase<sup>83</sup>. Em condições fisiológicas, o estresse oxidativo é neutralizado pelo sistema antioxidante, que inclui moléculas endógenas e exógenas. As principais defesas enzimáticas são a superóxido dismutase, catalase, e glutatona peroxidase<sup>81</sup>. Estas enzimas podem ser modificadas por diversos fatores como exercício, nutrição e envelhecimento<sup>84</sup>. Os antioxidantes exógenos incluem, principalmente, vitaminas e minerais<sup>79</sup>. Os antioxidantes mantêm o estado redox e atenuam atenuações intracelulares induzidas por espécies reativas de oxigênio<sup>79</sup>.

-

Na insuficiência cardíaca, o estresse oxidativo é frequentemente aumentado tanto no miocárdio, como na circulação sistêmica. Mais recentemente, aumento do estresse oxidativo foi observado também em músculos esqueléticos<sup>20, 25, 85</sup>. Em estudos prévios, observamos aumento do estresse oxidativo no músculo sóleo de ratos infartados com insuficiência cardíaca evidente<sup>20, 21</sup>.

Neste estudo, o estresse oxidativo do músculo sóleo, avaliado pela concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo, não diferiu entre os grupos. Os resultados divergentes entre o presente estudo e nossos trabalhos prévios<sup>20, 21</sup> provavelmente são decorrentes de diferenças no grau de insuficiência cardíaca. Nos trabalhos anteriores, a frequência de dispneia foi de 54% e de derrame pleural, congestão pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito foi próxima de 75% nos ratos infartados. Apesar do estresse oxidativo não ter sido alterado pelo infarto do miocárdio, a atividade da catalase foi reduzida nos grupos IM e IM-HIIT. Podemos, portanto, concluir que o infarto do miocárdio, em sua fase de disfunção ventricular avançada, não foi associado a aumento do estresse oxidativo muscular, mas foi acompanhado por redução da atividade da catalase.

Em resumo, o infarto do miocárdio induziu extenso processo de remodelação cardíaca caracterizado por dilatação e hipertrofia do ventrículo esquerdo e severa disfunção ventricular esquerda. No músculo sóleo, o infarto, apesar de não alterar o

-

estresse oxidativo, reduziu a atividade da catalase. O treinamento aeróbio intervalado de alta intensidade melhorou a capacidade funcional dos ratos, independentemente de alterações no processo de remodelação cardíaca. Uma vez que o exercício não modificou o grau de injúria cardíaca e disfunção ventricular, podemos concluir que a melhora da capacidade funcional foi decorrente de melhora das condições metabólicas da musculatura esquelética. De fato, o treinamento físico aumentou a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético do músculo sóleo.

**CONCLUSÃO**

-

O treinamento aeróbio intervalado de alta intensidade melhora a capacidade funcional de ratos infartados, independentemente de alterações no processo de remodelação cardíaca. Melhora da capacidade física é acompanhada por aumento da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético do músculo sóleo.

## **REFERÊNCIAS**

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139:e56-e528.
2. Wajner A, Zuchinali P, Olsen V, Polanczyk CA, Rohde LE. Causes and predictors of in-hospital mortality in patients admitted with or for heart failure at a tertiary hospital in Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109:321-330.
3. Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Zornoff LA. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95:635-639.
4. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-582.
5. Florea VG, Mareyev VY, Achilov AA, Popovici MI, Coats AJS, Belenkov YN. Central and peripheral components of chronic heart failure: Determinants of exercise tolerance. *Int J Cardiol*. 1999;70:51-56.
6. 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.
7. 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.
  8. 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.
  9. Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Bonomo C, Campos DH, Gomes MJ, Martinez PF, Oliveira SAJ, Gimenes R, Rosa CM, Guizoni DM, 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, Garcia CM, Reyes DA, 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. 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.
12. Zizola C, Schulze PC. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2013;18:623-630.
  13. Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Yamada Y, Hanada A, Ohtsubo M, Morita N, Murakami T, Nishijima H, Kitabatake A. 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.
  14. Filippatos GS, Anker SD, Kremastinos DT. Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8:249-254.
  15. Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1995;269:1507-1513.
  16. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit.* 2010;16:374-383.
  17. Damatto RL, Martinez PF, Lima AR, Cezar MD, Campos DH, Oliveira SAJ, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatani BT, Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Okoshi K, et al. Heart failure-induced

- skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2013;167:698-703.
18. 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.
  19. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M. 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.
  20. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Pagan LU, Seiva FR, Fernandes DC, Laurindo FRM, Novelli EL, 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.
  21. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Pagan LU, Seiva FR, Bueno RT, Fernandes DC, Laurindo FR, 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.
  22. Lima AR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MD, Guizoni DM, Bonomo C, Oliveira SAJ, Dal-Pai Silva M, Zornoff LA, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced diaphragm myopathy.

- Cell Physiol Biochem.* 2014;34:333-345.
23. Okoshi MP, Capalbo RV, Romeiro FG, Okoshi K. Cardiac cachexia: Perspectives for prevention and treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2017;108:74-80.
  24. Okoshi MP, Romeiro FG, Paiva SA, Okoshi K. Heart failure-induced cachexia. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100:476-482.
  25. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Mobius-Winkler S, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. 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.
  26. Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin.* 2009;5:561-577.
  27. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H2181-H2190.
  28. Ohta Y, Kinugawa T, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N, Yokota T, Hirabayashi K, Tsutsui H. 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.
  29. Bechara LR, Moreira JB, Jannig PR, Voltarelli VA, Dourado PM, Vasconcelos AR, Scavone C, Ramires PR, Brum PC. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart

- failure rats. *Int J Cardiol.* 2014;175:499-507.
30. Bertaglia RS, Reissler J, Lopes FS, Cavalcante WL, Carani FR, Padovani CR, Rodrigues SA, Cicogna AC, Carvalho RF, Fernandes AA, Gallacci M, Dal Pai Silva M. 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.
  31. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey Jr. DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, 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.
  32. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, 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.
  33. 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.
34. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, Tjonna AE, Helgerud J, Slordahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. A randomized study. *Circulation.* 2007;115:3086-3094.
  35. Nilsson BB, Westheim A, Risberg MA. Effects of group-based high-intensity aerobic interval training in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2008;102:1361-1365.
  36. Wall HK, Ballard J, Troped P, Njike VY, Katz DL. Impact of home-based, supervised exercise on congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;145:267-270.
  37. Flynn KE, Pina IL, Whellan DJ, Lin L, Blumenthal JA, Ellis SJ, Fine LJ, Howlett JG, Keteyian SJ, Kitzman DW, Kraus WE, Miller NH, et al. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure. *J Am Med Assoc.* 2009;301:1451-1459.
  38. Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U, Ljubkovic M. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. *Cardiovasc Res.* 2013;99:55-64.
  39. Guizoni DM, Oliveira-Junior SA, Noor SL, Pagan LU, Martinez PF, Lima AR, Gomes MJ, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C,

- Zornoff LA, Okoshi K, 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.
40. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation.* 1991;84:1597-1607.
41. Sullivan MJ, Higginbotham MB, Cobb FR. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation.* 1988;78:506-515.
42. Lenk K, Erbs S, Höllriegel R, Beck E, Linke A, Gielen S, Winkler SM, Sandri M, Hambrecht R, Schuler G, Adams V. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19:404-411.
43. Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2009;81:555-564.
44. 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.
45. 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.
46. O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, Leifer ES, Kraus WE, Kitzman DW, Blumenthal JA, Rendall DS, Miller NH, 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.
  47. Souza RW, Piedade WP, Soares LC, Souza PA, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, Campos DH, Fernandes AA, Okoshi K, Carvalho RF, Cicogna AC, Dal-Pai-Silva M. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One*. 2014;9:e110020.
  48. Giallauria F, Smart NA, Cittadini A, Vigorito C. Exercise training modalities in chronic heart failure: Does high intensity aerobic interval training make the difference? *Monaldi Arch Chest Dis*. 2016;86:754.
  49. Giallauria F, Piccioli L, Vitale G, Sarullo FM. Exercise training in patients with chronic heart failure: A new challenge for cardiac rehabilitation community. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2018;88:987.
  50. Moholdt T, Aamot IL, Granoien I, Gjerde L, Myklebust G,

- Walderhaug L, Brattbakk L, Hole T, Graven T, Stolen TO, Amundsen BH, Molmen-Hansen HE, et al. Aerobic interval training increases peak oxygen uptake more than usual care exercise training in myocardial infarction patients: A randomized controlled study. *Clin Rehabil.* 2012;26:33-44.
51. Huang SC, Wong MK, Lin PJ, Tsai FC, Fu TC, Wen MS, Kuo CT, Wang JS. Modified high-intensity interval training increases peak cardiac power output in patients with heart failure. *Eur J Appl Physiol.* 2014;114:1853-1862.
52. Wewege MA, Ahn D, Yu J, Liou K, Keech A. High-intensity interval training for patients with cardiovascular disease-is it safe? A systematic review. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e009305.
53. Chou CH, Fu TC, Tsai HH, Hsu CC, Wang CH, Wang JS. High-intensity interval training enhances mitochondrial bioenergetics of platelets in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2019;274:214-220.
54. Taya M, Amiya E, Hatano M, Maki H, Nitta D, Saito A, Tsuji M, Hosoya Y, Minatsuki S, Nakayama A, Fujiwara T, Konishi Y, et al. High-intensity aerobic interval training can lead to improvement in skeletal muscle power among in-hospital patients with advanced heart failure. *Heart Vessels.* 2018;33:752-759.
55. Angadi SS, Mookadam F, Lee CD, Tucker WJ, Haykowsky MJ, Gaesser GA. High-intensity interval training vs. moderate-

- intensity continuous exercise training in heart failure with preserved ejection fraction: A pilot study. *J Appl Physiol*. 2015;119:753-758.
56. Ugata Y, Wada H, Sakakura K, Ibe T, Ito M, Ikeda N, Fujita H, Momomura SI. High-intensity interval training for severe left ventricular dysfunction treated with left ventricular assist device. *Int Heart J*. 2018;59:216-219.
  57. Huang YC, Tsai HH, Fu TC, Hsu CC, Wang JS. High-intensity interval training improves left ventricular contractile function. *Med Sci Sports Exerc*. 2019:in press.
  58. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol*. 2017;595:2915-2930.
  59. Gomes Neto M, Duraes AR, Conceicao LSR, Saquetto MB, Ellingsen O, Carvalho VO. High intensity interval training versus moderate intensity continuous training on exercise capacity and quality of life in patients with heart failure with reduced ejection fraction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2018;261:134-141.
  60. Gayda M, Ribeiro PA, Juneau M, Nigam A. Comparison of different forms of exercise training in patients with cardiac disease: Where does high-intensity interval training fit? *Can J Cardiol*. 2016;32:485-494.
  61. Ellingsen O, Halle M, Conraads V, Stoylen A, Dalen H, Delagardelle C, Larsen AI, Hole T, Mezzani A, Van

- Craenenbroeck EM, Videm V, Beckers P, et al. SMARTEX Heart Failure Study (Study of Myocardial Recovery After Exercise Training in Heart Failure) Group. High-intensity interval training in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Circulation*. 2017;135:839-849.
62. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10:e0121138.
63. Johnsen AB, Hoydal M, Rosbjorgen R, Stolen T, Wisloff U. Aerobic interval training partly reverse contractile dysfunction and impaired Ca<sup>2+</sup> handling in atrial myocytes from rats with post infarction heart failure. *PLoS One*. 2013;8:e66288.
64. Ericsson M, Sjaland C, Andersson KB, Sjaastad I, Christensen G, Sejersted OM, Ellingsen O. Exercise training before cardiac-specific SERCA2 disruption attenuates the decline in cardiac function in mice. *J Appl Physiol*. 2010;109:1749-1755.
65. Tzanis G, Philippou A, Karatzanos E, Dimopoulos S, Kaldara E, Nana E, Pitsolis T, Rontogianni D, Koutsilieris M, Nanas S. Effects of high-intensity interval exercise training on skeletal myopathy of chronic heart failure. *J Card Fail*. 2017;23:36-46.
66. Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW,

- Dourado PM, Wisloff U, Brum PC. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol*. 2013;114:1029-1041.
67. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Quadrilatero J, Spriet LL. High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308:R927-R924.
68. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SAJ, Campos DH, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol*. 2011;111:543-551.
69. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Zanati SG, Damatto RL, Rodrigues EA, Carvalho RF, Fernandes AAH, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, 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.
70. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Damatto FC, Damatto RL, Depra I, Campos DHS, Fernandez AAH, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP. 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.

- 
71. Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, Cezar MDM, Guirado GN, Pagan LU, Chaer ID, Fernandes DC, Laurindo FR, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:15.
  72. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, 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.
  73. Hengartner H, Harris JI. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic micro-organisms. *FEBS Lett*. 1975;55:282-285.
  74. Zammit VA, Beis I, Newsholme EA. Maximum activities and effects of fructose bisphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and invertebrates in relation to the control of glycolysis. *Biochem J*. 1978;174:989-998.
  75. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1976;154:689-700.

- 
76. Bieber LL, Abraham T, Helmrath T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.* 1972;50:509-518.
  77. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SAR, Zornoff LAM. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol.* 2011;151:242-243.
  78. Altenhofer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23:406-427.
  79. Baumann CW, Kwak D, Liu HM, Thompson LV. Age-induced oxidative stress: How does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J Appl Physiol.* 2016;121:1047-1052.
  80. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: Molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6:197-207.
  81. Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical oxygen species, exercise and aging: An update. *Sports Med.* 2015;45:1245-1261.
  82. Joseph AM, Adihetty PJ, Leeuwenburgh C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *J Physiol.* 2016;594:5105-

5023.

83. Ferreira LF, Laitano O. Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:18-28.
84. Franzke B, Halper B, Hofmann M, Oesen S, Jandrasits W, Baierl A, Tosevska A, Strasser EM, Wessner B, Wagner KH. Vienna Active Ageing Study Group. The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. *Mutagenesis.* 2015;30:147-153.
85. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, Nakamura K, Ichikawa K, Utsumi H, Takeshita A. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation.* 2001;104:134-136.