



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

Mariana Janini Gomes

**Influência do exercício físico sobre o
estresse oxidativo, as MAPK e o NF- κ B no
músculo sóleo de ratos com insuficiência
cardíaca induzida por estenose aórtica**

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”

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*
Coorientadora: Profa. Adj. *Paula Felipe Martinez*

Botucatu
2015

Mariana Janini Gomes

Influência do exercício físico sobre o estresse oxidativo, as MAPK e o NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica

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”

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*

Coorientadora: Profa. Adj. *Paula Felipe Martinez*

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gomes, Mariana Janini.

Influência do exercício físico sobre o estresse oxidativo, as MAPK e o NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica / Mariana Janini Gomes. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Marina Politi Okoshi
Coorientador: Paula Felipe Martinez
Capes: 40101002

1. Insuficiência cardíaca. 2. Stress oxidativo. 3. Sistema musculoesquelético. 4. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca; estresse oxidativo; exercício físico; músculo esquelético.

Now this is not the end.
It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning.

(Winston Churchill)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais MIGUEL e MARCIA, aos meus irmãos MARCELO e MARINA e ao meu namorado RAFAEL.

Agradecimento Especial

À minha orientadora Profa. Adj. MARINA POLITI OKOSHI, por seus valiosos ensinamentos, pela competência na orientação, pela paciência em todos os momentos, por acreditar na minha capacidade e confiar em meu trabalho. Obrigada por participar dessa etapa da minha formação e por ter sido fundamental para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, MIGUEL e MARCIA, meus exemplos, por serem inspiração em minha vida, sempre me apoiarem em todas as decisões, mesmo que elas pudessem nos distanciar, por não medirem esforços para me verem feliz. Pai e mãe, muito obrigada pela educação, carinho, amor, ensinamentos e dedicação em toda minha trajetória. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos MARCELO e MARINA, pelo amor, pelo apoio em todas as etapas da minha vida e em todas as minhas escolhas, por encherem minha vida de alegria e por fazerem perfeitos meus finais de semana em Prudente. Não sei viver sem vocês!

Aos meus avós, EVA, MIGUEL (*in memorian*) e ANALIA, por todo amor e por torcerem por mim sempre. Em especial ao meu avô PEDRO (*in memorian*), grande incentivador para realização de todos os meus sonhos.

A TODOS DA MINHA FAMÍLIA, pelos conselhos e ensinamentos, pelo afeto, alegria e apoio. Muito obrigada!

Ao meu namorado, RAFAEL, por ser meu melhor amigo, por compartilhar comigo as pequenas conquistas do dia a dia e tornar mais fáceis os momentos de estresse! Obrigada por todo amor, carinho e conselhos. Te amo!

Aos meus cunhados MAISA, MARINEZ e VINÍCIUS e meus futuros sogros FRANCISCO e MARCIA, pela amizade e bons momentos compartilhados. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Às minhas amigas de Prudente, que torceram pelo meu sucesso, em especial à ANA PAULA, CAMILA, GABRIELI e SUELLEN, por terem feito parte da minha vida e hoje, mesmo longe, ainda estarem presentes.

À UNOESTE e meus professores da graduação responsáveis pela minha formação, em especial CLÁUDIO, DEBORAH, DANILO, FRANCIS, GABRIELA, HIRO, MARCELO, RENATA, SHOLA e WEBER. Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui! Obrigada!

À Profa Adj. PAULA FELIPPE MARTINEZ, pela coorientação, por ser tão paciente e acessível, sempre esclarecendo minhas dúvidas e me ensinando muito, pela importante participação neste trabalho e na minha formação. Obrigada!

Ao Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, pela realização da avaliação ecocardiográfica de todos os animais. Agradeço pela disponibilidade e pela gentileza, sempre disposto a ensinar.

À Profa. Dra. ANA 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.

Ao Prof. Adj. Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aos pesquisadores DENISE e JOÃO aos técnicos do laboratório MARIA BERTOLINE e VITOR pela análise da atividade da NADPH oxidase e geração total de espécies reativas de oxigênio.

Às professoras Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO e Dra. MELIZA GOI ROSCANI, pelas valiosas sugestões proferidas no exame de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos queridos amigos, ALINE, ANDREA, CAMILA, LUANA, MARCELO, PRISCILA, PAULA, RICARDO, SANDRO, SILVIO, pessoas que conheci no laboratório e levarei para toda a vida. Aprendi muito com vocês e sou muito grata por tudo. Vocês foram imprescindíveis não só para a realização deste trabalho, mas por me acolherem em Botucatu, num momento de transição da minha vida. Muito obrigada!

Ao amigo DIJON CAMPOS, pela cirurgia para indução de estenose aórtica nos animais e pela amizade.

A todos os colegas da Unipex, CAMILA ROSA, CAMILA GARCIA, FELIPE, MARCELA, KARLA, YASMIN, DAVID, VINICIUS, DANI VILEIGAS, ADRIANA, PAULA GRIPPA, MIRIANE, REGIANE, MARIA TERESA, BRUNA, FERNANDA, FABIANE, ÂNGELO, ANA PAULA, CAMILA CÔRREA, CARLINHOS, CRISTINA, DIEGO, DANILO, DE LALLA, ELIZETE, ELENIZE, EDUARDO, FÁTIMA, FLORIAN, IGOR, JOSÉ CARLOS GEORGETE, LUCAS, MÁRIO BRUNO, MARIA REGINA, MARA, MARTA, PAULINHO, REGINA, RENATA,

ROGÉRIO, SUELI CLARA, VÍTOR, pela colaboração para realização deste trabalho, convivência e bons momentos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, ANA MARIA MENGUE, ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, BRUNO JOSÉ FAIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, RENATO BORGES PEREIRA, pela dedicação e simpatia com que sempre me ajudaram.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO, pela disponibilidade e eficiência para resolver problemas.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP processo nº 2012/22485-3) pelo apoio financeiro.

A TODAS AS PESSOAS que fizeram parte da minha vida, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	1
Summary	4
Introdução	7
Objetivos	13
Material e Métodos	15
Resultados	27
Discussão	44
Conclusão	52
Referências	54

RESUMO

Introdução: A insuficiência cardíaca caracteriza-se por redução da capacidade física com ocorrência precoce de fadiga e dispneia. Alterações da musculatura esquelética têm sido responsabilizadas, pelo menos parcialmente, pelos sintomas. Embora aumento do estresse oxidativo participe da fisiopatologia das alterações musculares, as fontes de geração de espécies reativas de oxigênio e suas vias de sinalização intracelular ainda não foram completamente elucidadas. Estudos sugerem que as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e proteínas da via do fator nuclear- κ B (NF- κ B) estejam envolvidas na resposta muscular ao estresse oxidativo. Atualmente, as diretrizes recomendam a prática regular de exercícios físicos para pacientes com insuficiência cardíaca estável. Os efeitos do exercício aeróbico sobre a capacidade física e a musculatura esquelética durante sobrecarga pressórica persistente do ventrículo esquerdo não foram esclarecidos. Neste estudo avaliamos a influência do exercício aeróbico sobre o estresse oxidativo, as MAPK e o NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica. **Métodos:** Vinte semanas após indução de estenose aórtica, ratos Wistar foram alocados nos grupos controle sedentário (C-Sed, n=22), controle exercitado (C-Ex, n=19), estenose aórtica sedentário (EA-Sed, n=18) e estenose aórtica exercitado (EA-Ex, n=18). Exercício físico foi realizado em esteira, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. A capacidade física foi avaliada por teste de esforço máximo em esteira antes e após o período de exercício. Ecocardiograma transtorácico foi realizado antes e após o treinamento. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutationala peroxidase e catalase e a concentração do hidroperóxido de lipídeo foram avaliados por espectrofotometria. A atividade da NADPH oxidase foi analisada pela redução de lucigenina e a expressão gênica de suas subunidades NOX 2, NOX 4, p22^{phox} e p47^{phox} por qPCR. A geração total de espécies reativas de oxigênio foi quantificada por HPLC e a expressão proteica por Western blot. Análise estatística: análise de variância para o esquema fatorial 2 X 2 complementada pelo teste de Tukey ou teste de Mann-Whitney (valor de p x 2). Nível de significância: 5%. **Resultados:** O treinamento físico melhorou a capacidade funcional sem alterar as estruturas cardíacas ou a função do ventrículo esquerdo. O estresse oxidativo foi maior no grupo EA-Sed que no C-Sed e foi normalizado

pelo exercício. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase mostrou-se alterada no grupo EA-Sed e foi restaurada pelo exercício físico. A atividade da NADPH oxidase e a expressão gênica de suas subunidades não diferiram entre os grupos EA-Ex e EA-Sed. O exercício físico modulou as proteínas MAPK JNK e pERK no grupo EA-Ex e não alterou a expressão de proteínas da via do NF- κ B. **Conclusões:** O exercício físico melhora a capacidade funcional de ratos com estenose aórtica independentemente de alteração das estruturas cardíacas ou função ventricular esquerda. No músculo sóleo, o exercício físico reduz o estresse oxidativo, preserva a atividade de enzimas antioxidantes e modula a expressão das MAPK JNK e pERK, sem alterar a atividade da enzima NADPH oxidase, a expressão gênica de suas subunidades ou a expressão de proteínas da via NF- κ B.

Palavras-Chave: Insuficiência cardíaca; estresse oxidativo; exercício físico; músculo esquelético.

SUMMARY

Introduction: Heart failure is characterized by reduced physical capacity with early occurrence of fatigue and dyspnea. Skeletal muscle abnormalities have been considered responsible, at least partially, for the symptoms. Although increased oxidative stress participates in the pathophysiology of muscle abnormalities, sources of reactive oxygen species generation and their intracellular signaling pathways are not completely elucidated. Studies suggest that mitogen-activated protein kinases (MAPK) and the nuclear factor-kappaB (NF- κ B) pathway are involved in muscle response to oxidative stress. Currently, guidelines recommend regular physical exercise for patients with stable heart failure. The effects of aerobic exercise on physical capacity and skeletal muscle changes during left ventricular persistent pressure overload have not been established. In this study, we evaluated the influence of aerobic exercise on oxidative stress, the MAPK and the NF- κ B pathway in the soleus muscle of rats with aortic stenosis-induced heart failure. **Methods:** Twenty weeks after aortic stenosis induction, rats were assigned into four groups: sedentary control (C-Sed, n=22), exercised control (C-Ex, n=19), sedentary aortic stenosis (AS-Sed, n=18) and exercised aortic stenosis (AS-Ex, n=18). Exercise was performed on a treadmill, 5 times a week for 8 weeks. Physical capacity was assessed by maximal exercise test on a treadmill before and after the exercise period. Transthoracic echocardiography was performed before and after training. Activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase, and lipid hydroperoxide concentration were evaluated by spectrophotometry. NADPH oxidase activity was analyzed by reduction of lucigenin and gene expression of its subunits NOX 2, NOX 4, p22phox, and p47phox by qPCR. Total generation of reactive oxygen species was measured by HPLC and protein expression by Western blot. Statistical analysis: analysis of variance for factorial 2 X 2 and Tukey test or Mann-Whitney test (p x 2 value). Significance level: 5%. **Results:** Physical exercise improved functional capacity without changing cardiac structures or left ventricle function. Oxidative stress was higher in EA-Sed group than C-Sed and EA-Ex groups. The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase was changed in the EA-Sed group and restored by exercise in the EA-Ex group. The NADPH oxidase activity and gene expression of its subunits did not differ between

EA-Ex and EA-Sed groups. Exercise modulated the MAPK total JNK and phosphorylated ERK proteins in the EA-Ex group and did not change protein expression of the NF- κ B pathway. **Conclusions:** Physical exercise improves functional capacity of stenosis aortic rats independent of changes in cardiac structures or left ventricular function. In the soleus muscle, exercise reduces oxidative stress, preserves the activity of antioxidant enzymes and modulates protein expression of the MAPK total JNK and phosphorylated ERK. NADPH oxidase activity and gene expression of its subunits or protein expression of the NF- κ B pathway are not changed by physical exercise.

Keywords: Heart failure; oxidative stress; physical exercise; skeletal muscle.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca representa importante problema de saúde pública por ser condição de alta prevalência e elevada morbimortalidade e custos financeiros, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento ¹. De acordo com a American Heart Association, 5,1 milhões de americanos acima de 20 anos têm insuficiência cardíaca, projeções estimam que, em 2030, a prevalência de insuficiência cardíaca será 25% maior do que a observada em 2013 ². No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos ³. Dados do Sistema Único de Saúde mostram que, dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca é a causa mais frequente de internação hospitalar ^{4, 5}.

A insuficiência cardíaca caracteriza-se, clinicamente, por redução da capacidade para exercícios físicos e atividades cotidianas, devido à ocorrência precoce de fadiga e dispneia aos esforços ^{6, 7}.

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela intolerância ao exercício envolvem alterações cardíacas, pulmonares e ventilatórias, neuro-humorais, endoteliais e da músculo esqueléticas ⁸⁻¹³.

Nas últimas duas décadas, o conjunto das alterações intrínsecas da musculatura esquelética que ocorrem em doentes com insuficiência cardíaca crônica, denominado miopatia associada à insuficiência cardíaca, tem se destacado como uma importante causa de intolerância aos exercícios físicos. Diversas anormalidades como redução da massa muscular, alteração na proporção dos tipos de fibras e das cadeias pesadas de miosina, diminuição da atividade de enzimas de metabolismo oxidativo e de geração de ATP, e atraso na ressíntese de compostos de alta energia estão entre as evidências que sugerem relação entre disfunção músculo-esquelética e intolerância aos exercícios na insuficiência cardíaca crônica ⁹.

Os fatores responsáveis pela miopatia associada à insuficiência cardíaca ainda não estão completamente esclarecidos. Aumento do estresse oxidativo tem sido considerado importante fator no desenvolvimento de alterações musculares durante a insuficiência cardíaca.

O estresse oxidativo ocorre por desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante, com predominância do primeiro ¹⁴. Há substancial evidência que o estresse oxidativo está aumentado tanto no miocárdio como em nível sistêmico, inclusive na musculatura esquelética, durante a insuficiência cardíaca ^{15, 16}. Mais recentemente, o papel do estresse oxidativo em anormalidades do músculo esquelético tem sido explorado como mecanismo de progressão da insuficiência cardíaca, sendo relacionado à hipoperfusão periférica em consequência de baixo débito cardíaco e disfunção endotelial periférica ¹⁵. No músculo esquelético, o sistema de enzimas antioxidantes, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (Cat), protege as células das ações de espécies reativas de oxigênio (EROs) ⁸. Em estudos clínicos e experimentais, foi observado que a expressão e atividade de enzimas antioxidantes encontram-se reduzidas no músculo esquelético durante a insuficiência cardíaca ^{15, 16}.

Embora o aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca já esteja bem caracterizado, as fontes de geração de EROs, assim como as vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva a alterações da musculatura esquelética, ainda não estão completamente esclarecidas. A NADPH oxidase (NOX) constitui importante fonte geradora de EROs. O complexo NADPH oxidase foi originalmente identificado e caracterizado em fagócitos, onde a enzima exerce papel essencial na defesa do hospedeiro contra microorganismos. 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 dismutase ¹⁷. Nos últimos anos, vários homólogos da subunidade catalítica NOX2 de fagócitos foram descritos em diversos tecidos, incluindo o músculo esquelético, onde são expressas duas isoformas, as NOX2 e NOX4 ¹⁸⁻²⁰. Estas isoformas diferem entre si quanto ao modo de ativação, à interação com a proteína transmembrana p22^{phox} e à necessidade adicional de fatores de maturação e ativação. A NOX2 forma complexo com a p22^{phox}, cuja ativação depende da ligação com as subunidades

regulatórias citosólicas p47^{phox} e p67^{phox} ²¹. Diferentemente das outras isoformas, a NOX4 é constitutivamente ativa e independente de proteínas citosólicas regulatórias ou ativadoras ²².

Na insuficiência cardíaca, há poucos trabalhos sobre o complexo NADPH oxidase. Embora tenha sido identificado aumento na atividade da NADPH oxidase no músculo plantar de ratos ²³ e em músculos esqueléticos de camundongos infartados ²⁴, não encontramos alteração em sua atividade no músculo sóleo de ratos infartados com insuficiência cardíaca ¹⁶. Não identificamos na literatura trabalhos avaliando o complexo NADPH oxidase na musculatura esquelética em outros modelos experimentais de insuficiência cardíaca.

Quanto às vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva a alterações da musculatura esquelética, há evidências que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear- κ B (NF- κ B) podem estar envolvidas na resposta muscular ao estresse oxidativo ²⁵. Em nosso laboratório, avaliamos a participação das MAPK e do NF- κ B na resposta do tecido muscular esquelético ao estresse oxidativo de ratos infartados com insuficiência cardíaca crônica. Observamos redução da atividade das enzimas antioxidantes glutationala peroxidase e superóxido dismutase no músculo sóleo que, associada à preservação da atividade da NADPH oxidase, sugere aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético ¹⁶. Além disso, o aumento do estresse oxidativo foi associado à alteração na expressão de proteínas das vias MAPK e do NF- κ B ²⁶.

Estenose aórtica ascendente em ratos jovens tem sido considerada bom modelo para estudo da insuficiência cardíaca experimental ^{27, 28}. Neste modelo, clip de prata não obstrutivo é colocado ao redor da aorta ascendente. À medida que os animais crescem, passam a manifestar aestenose aórtica e a desenvolver hipertrofia ventricular esquerda concêntrica e disfunção diastólica. Mais tardiamente, ocorrem redução do desempenho ventricular sistólico e insuficiência cardíaca ²⁹⁻³³. Além disso, aestenose aórtica ascendente tem se mostrado bom modelo para estudo das alterações da musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca. Sousa et al. ³⁴ observaram aumento das cadeias pesadas de miosina IIa, decréscimo da capacidade oxidativa e alteração na função mitocondrial no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por

estenose aórtica. Em nosso laboratório, verificamos atrofia muscular, alteração na distribuição dos tipos de fibras e das isoformas das cadeias pesadas de miosina, e anormalidades na expressão gênica de metaloproteases e de fatores de regulação miogênica em músculos esqueléticos de ratos com estenose aórtica e insuficiência cardíaca ^{32, 35, 36}.

Atualmente, não há terapia farmacológica disponível para tratamento das alterações musculares que ocorrem durante a insuficiência cardíaca. Assim, há grande interesse no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento da progressiva deterioração muscular associada à insuficiência cardíaca.

O exercício físico tem sido considerado importante terapia não farmacológica na prevenção e reabilitação de muitas doenças cardiovasculares. Mais recentemente, diretrizes internacionais ^{37, 38} e nacionais ³⁹ 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. De acordo com a Diretriz Brasileira de insuficiência cardíaca ³⁹, exercício físico deve ser estimulado para todos os pacientes com insuficiência cardíaca estável que sejam capazes de participar de programa de treinamento físico.

O exercício físico pode afetar positivamente o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), a capacidade física, e as funções cardíaca, autonômica do sistema nervoso, muscular e vascular periférica ^{9, 40}. A intensidade da atividade física que promove mais benefícios durante a insuficiência cardíaca ainda não está bem definida ⁴¹. O exercício contínuo de intensidade moderada, que pode ser mantido por 30 minutos ou mais, tem sido tradicionalmente recomendado para tratamento de doenças cardiovasculares, pois melhora a capacidade funcional na insuficiência cardíaca e reduz a frequência de internações hospitalares e de mortalidade cardíaca ^{42, 43}.

Entre os efeitos benéficos do exercício físico, destaca-se sua ação antioxidante, uma vez que o exercício promove aumento na expressão de enzimas antioxidantes. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes pode ser observado em vários tecidos em decorrência de treinamento tanto aeróbio como

anaeróbio. 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 outras vias de proteção ao estresse oxidativo promovendo, por exemplo, aumento de enzimas reparadoras do DNA nos músculos esqueléticos ¹⁷. Poucos estudos avaliaram os efeitos do treinamento físico sobre as fontes produtoras de EROs. Adams et al. ⁴⁴ observaram redução da expressão das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase na artéria mamária interna esquerda em pacientes com doença arterial coronariana após período de exercício físico em cicloergômetro por quatro semanas.

Também em modelos experimentais de insuficiência cardíaca, o exercício físico resulta em efeitos benéficos ⁴⁵. Por exemplo, ratos com insuficiência cardíaca submetidos a corrida em esteira em intensidade moderada durante oito semanas apresentaram atenuação do estresse oxidativo no músculo esquelético e da ativação do sistema ubiquitina-proteossoma ⁴⁶.

Embora sejam evidentes os benefícios do exercício, não estão completamente identificados os mecanismos moleculares pelos quais o treinamento físico melhora a musculatura esquelética na insuficiência cardíaca. Não identificamos trabalhos que tenham avaliado os efeitos do exercício físico sobre o estresse oxidativo e as vias de sinalização das MAPK e do NF- κ B na IC. Neste trabalho, testaremos a hipótese que as MAPK e o NF- κ B participam da resposta muscular ao aumento do estresse oxidativo durante a insuficiência cardíaca e que o treinamento físico pode atenuar alterações nestas vias sinalizadoras.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência do exercício físico aeróbio contínuo sobre o estresse oxidativo e as vias de sinalização das MAPK e do NF- κ B na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes e quantificar a geração de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica;
2. Analisar a atividade da NADPH oxidase e a expressão gênica de suas subunidades;
3. Quantificar a expressão de proteínas das vias das MAPK e do NF- κ B;
4. Verificar se exercício físico aeróbio de intensidade moderada em esteira atenua ou previne alterações musculares e se este potencial efeito benéfico é mediado pelas vias estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 90 a 100 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e com ciclos de luminosidade de 12 h, e alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Para a indução da estenose aórtica, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg intramuscular) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg intramuscular) e submetidos a toracotomia mediana. A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm da raiz da aorta ²⁹. Durante a cirurgia, os ratos foram ventilados manualmente a pressão positiva. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe.

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que, neste modelo experimental, IC manifesta-se em período variável entre 18 e 28 semanas após a indução da estenose aórtica ^{29, 31, 35}. Portanto, 18 semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos a ecocardiograma transtorácico para determinar o grau de comprometimento cardíaco. A seguir, foram aleatoriamente alocados em quatro grupos: controle sedentário (C-Sed), controle exercitado (C-Ex), estenose aórtica sedentário (EA-Sed) e estenose aórtica exercitado (EA-Ex). Os grupos exercitados foram submetidos a protocolo de exercício físico e os grupos sedentários foram colocados na esteira por cinco minutos, em baixa velocidade, para se adaptarem ao estresse decorrente dos procedimentos de treinamento.

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a constituição de grupos experimentais com 10 a 20 animais é adequada para estudos sobre função ventricular e aspectos morfológicos e moleculares dos músculos esqueléticos ^{35, 36, 47, 48}. Como a mortalidade após indução de estenose aórtica é

cerca de 20% a 40% (dados não publicados de nosso laboratório), cada grupo foi composto, inicialmente, por 25 a 27 ratos. Como nos grupos controle, a mortalidade é menor, e praticamente restrita ao período peri-operatório (cerca de 10% a 20%), estes foram constituídos por 22 a 23 animais.

Ao final do período experimental, foi realizado novamente ecocardiograma transtorácico. No dia subsequente, os animais foram avaliados por dois examinadores para verificação do sinal clínico de insuficiência cardíaca taquipnéia/respiração laboriosa e, a seguir, eutanasiados para coleta de sangue e obtenção de tecidos. No exame *post mortem*, foram pesquisados sinais patológicos para confirmação do diagnóstico de insuficiência cardíaca como ascite, derrame pleural e pericárdico, trombo em átrios, congestão hepática, 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) ^{48, 49}.

Tolerância ao esforço

A tolerância ao esforço físico foi avaliada 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 ⁵⁰. A velocidade máxima de corrida foi registrada e a distância total percorrida calculada. Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações, por 10 min/dia.

Protocolo de exercício

O exercício físico foi realizado em esteira, cinco vezes por semana. Inicialmente, houve período de adaptação, com aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício, conforme descrito abaixo (Quadro 1). A partir da sexta semana de treinamento, os ratos exercitaram à velocidade de 10 - 12 m/min, com duração de 30 min/dia, até o final do período experimental de oito semanas.

Quadro 1 - Protocolo de exercício físico

Semanas	Velocidade (m/min)	Duração (min)
1 ^a	5	10
2 ^a	7,5	14
3 ^a	10-12	18
4 ^a	10-12	22
5 ^a	10-12	26
6 ^a a 8 ^a	10-12	30

m: metros; min: minutos.

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 laboratório ^{49, 51}. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography ⁵². 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 diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa da parede posterior do VE foi calculada como $2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc endo): $(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% enc meso): $[(\text{DDVE} + 1/2 \text{EDPP} + 1/2 \text{EDSIV}) - (\text{DSVE} + 1/2 \text{ESPP} + 1/2 \text{ESSIV})] / \text{DDVE}$.

ESSIV)]/(DDVE + 1/2 EDPP + 1/2 EDSIV); 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede; 4) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular. Adicionalmente, foi calculado o 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 em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($TRIV_n: TRIV/(R-R)^{0,5}$, onde R-R é a distância entre dois complexos R ao eletrocardiograma em segundos; 4) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas 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 do material foi realizada no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica 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, o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE), incluindo o septo, 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.

A seguir, foram dissecados os músculos sóleos dos membros pélvicos direito e esquerdo. O tecido epitelial do membro pélvico foi removido e o músculo gastrocnêmio rebatido, possibilitando a retirada do músculo sóleo. 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 de pulmão e

fígado foram pesados antes e após desidratação em estufa a 65 °C por 72 horas para avaliar o grau de edema dos tecidos.

Análise histológica da musculatura esquelética

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por meio de 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 em sistema de análise por imagem computadorizada utilizando a técnica de Pearse modificada por Dubowitz. Para cada animal, foram medidos, em média, 15 campos, totalizando 150 a 200 fibras.

Quantificação do estresse oxidativo

O grau de estresse oxidativo foi analisado por meio da quantificação do marcador de lipoperoxidação (hidroperóxido) e pela atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no músculo sóleo. Para elucidar a fonte de EROs, a atividade da NADPH oxidase foi avaliada no músculo sóleo.

Amostras de músculo esquelético (200 mg) foram descongeladas e homogeneizadas 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), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (Cat) e dosagem de hidroperóxido de lipídeo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II,

England) e em leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência 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 μ L de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240 nm.

A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada pela oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O 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.

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, p22^{phox} e p47^{phox} 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 músculo esquelético sóleo foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito⁵³. O fragmento muscular congelado foi mecanicamente homogeneizado 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, homogeneizado 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 ressuspensão 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 (40). A pureza do RNA foi satisfatória, com razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm 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. Aliquotas 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), p22^{phox} (Taqman assay Rn00577357_m1; Ref. seq. Genbank NM_024160.1) e p47^{phox} (Taqman assay 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 calculada pelo método do C_T (*critical threshold cycle*) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$)⁵⁴.

Avaliação da atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada em frações enriquecidas de membrana celular pela redução da lucigenina detectada por luminômetro. A lucigenina, uma vez reduzida para seu cátion-radical (LucH⁺) por uma redutase (principalmente flavoenzimas, que utilizam o NADH como substrato), sofre uma segunda redução ao reagir (especificamente) com ânion radical superóxido e gera o composto instável dioxetano, que por sua vez decai espontaneamente para acridona liberando luz, que pode ser quantificada⁵⁵.

O músculo sóleo foi cuidadosamente lavado em PBS para remoção de coágulos sanguíneos e trombos. Fragmentos de músculo de aproximadamente 200 mg foram homogeneizados com auxílio de um Polytron, em gelo, com 1 mL de tampão de lise contendo Tris 50 mM (pH 7,4), DTPA 100 mM, β -mercaptoetanol 0,1% e inibidores de protease. A seguir, as amostras foram submetidas a sonicação (3 ciclos de 10 s a 8 Watts) e centrifugação a 1.000 g, por 3 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 18.000 g, por 10 min, a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para tubo de ultra-centrífuga e submetido a centrifugação a 100.000 g, por 45 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 100 μ L de tampão de lise, obtendo-se, assim, a fração enriquecida de membrana⁵⁶. A quantificação de proteínas totais foi realizada, então, pelo método de Bradford.

Posteriormente, foram incubados 30 μ g de fração enriquecida de membrana em PBS (pH 7,4 contendo EDTA 10 μ M) e 150 μ L de NADPH 2mM em tubos de plástico colocados no equipamento Luminômetro Sirius Berthold, que realiza injeção automática de 20 μ L de lucigenina 0,25 mM em cada tubo. Os dados de luminescência foram obtidos a cada 2 s durante 5 min por meio do programa FB12/Sirius. A atividade da NADPH oxidase avaliada pela redução da

lucigenina foi apresentada pela área sob a curva dos dados de luminescência obtidos durante a reação.

Avaliação da geração total de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A geração total de EROs no músculo sóleo foi avaliada pela quantificação dos compostos fluorescentes 2-hidroxi-etídio e etídio derivados da oxidação do DHE, detectada por meio de HPLC ^{56, 57}. Resumidamente, o fragmento muscular foi lavado em PBS para remoção de coágulos sanguíneos e trombos. O tecido foi cortado em fragmentos de 3 mm (2 a 10 mg) e incubado em solução PBS/DTPA contendo DHE 50 μ M por 30 min a 37 °C em ambiente sem luz. A seguir, o tecido foi lavado em PBS, transferido para nitrogênio líquido, homogeneizado e ressuspenso em solução de acetonitrila. O lisado foi centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi, então, utilizado para avaliar a geração total de EROs pela quantificação por HPLC de produtos de fluorescência derivados de oxidação do DHE, de acordo com o método preconizado por Laurindo e cols. ^{56, 57}.

Western blot

A expressão proteica das formas total e fosforilada de proteínas das MAPK (JNK, ERK e p38-MAPK), do NF- κ B (subunidade p65) e de seu inibidor (I κ B) foi avaliada por Western blot ⁵⁸.

Fragmentos do músculo sóleo (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 μ L de tampão RIPA, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12.000 rpm, a 4 °C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e armazenado a -80 °C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford. A seguir, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida a 4 °C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V) e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose (Biorad). As etapas seguintes (bloqueio, incubação com anticorpo primário e incubação com

anticorpo secundário) foram realizadas no equipamento Snap i.d. Protein Detection System (Millipore, U.S.). Após transferência, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 0,5 % em temperatura ambiente por 5 min para prevenção de ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi incubada por 10 min, a temperatura ambiente, com anticorpo primário específico para cada proteína. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, a membrana foi novamente lavada com TBST e os sinais foram visualizados com auxílio de kit para quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e analisador de imagens (Gel Logic 6000 Pro, Carestream Health Inc., Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, USA).

Após obtenção da imagem com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana incubada com anticorpo primário para a proteína constitutiva GAPDH. O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal pelo analisador de imagens. As bandas obtidas nas imagens foram quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

Foram utilizados os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) primários anti- p-JNK (sc-6254), JNK total (sc-137019), p-ERK (sc-16982), ERK total (sc-93), p-p38-MAPK (sc-17852), p38-MAPK total (sc-7972), p-I κ B- α (sc-101713), I κ B- α total (sc-1643), Ser 536 p-p65 NF- κ B (sc-33020), p65 NF- κ B total (sc-7151) e GAPDH (sc-32233) e os anticorpos secundários anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

Análise estatística

Os dados estão expressos como média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Para variáveis paramétricas, a comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via para o esquema fatorial 2 X 2 complementada pelo teste de Tukey. Para variáveis não paramétricas, as comparações foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney (valor de $p \times 2$). Comparações de interesse: C-Ex vs C-Sed, EA-Sed vs C-Sed, EA-Ex vs EA-Sed e EA-Ex vs C-Ex. O teste de Goodman foi utilizado para comparar mortalidade e a frequência de sinais clínico e patológico de insuficiência cardíaca entre os grupos EA-Ex e EA-Sed. O nível de significância considerado será de 5%.

RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

No final do período experimental, o grupo C-Sed estava composto por 22 ratos e o grupo C-Ex por 19 animais. No exame *post-mortem*, um rato do grupo C-Sed apresentou ascite e um do C-Ex, derrame pleural. No final do experimento, o grupo EA-Sed tinha 18 ratos, que apresentaram a seguinte frequência de sinais de insuficiência cardíaca: taquipneia em 4, derrame pleural e/ou pericárdico em 12, ascite em 4, trombo atrial em 6, congestão pulmonar em 12, congestão hepática em 3 e hipertrofia do ventrículo direito em 13 animais. O grupo EA-Ex, composto ao final do experimento por 18 ratos, apresentou a seguinte frequência de sinais de insuficiência cardíaca: taquipneia em 3, derrame pleural e/ou pericárdico em 10, ascite em 1, trombo atrial em 7, congestão pulmonar em 12, congestão hepática em 2 e hipertrofia ventricular direita em 11 ratos. A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca não diferiu entre os grupos EA-Sed e EA-Ex (Tabela 1).

As variáveis anatômicas estão apresentadas na Tabela 2. O peso corporal final não diferiu entre os grupos. O peso do VE foi maior no grupo C-Ex que no C-Sed. Os pesos do VE, ventrículo direito, átrios e pulmões, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, foram maiores nos grupos EA-Sed e EA-Ex do que nos seus respectivos controles. O peso do músculo sóleo foi menor no grupo EA-Sed que no C-Sed.

Teste de esforço

No teste de esforço realizado antes do protocolo de exercício, os grupos com estenose aórtica apresentaram menor distância e tempo percorridos do que os respectivos grupos controle. Ao final do experimento, os grupos C-Ex e EA-Ex tiveram maior tempo e distância percorridos que os grupos C-Sed e EA-Sed, respectivamente. Os grupos EA-Sed e EA-Ex tiveram redução da capacidade funcional em comparação aos grupos C-Sed e C-Ex (Tabela 3).

Avaliação ecocardiográfica

Na Tabela 4, estão apresentadas as variáveis cardíacas estruturais e nas Tabelas 5 a 7, as variáveis de função do ventrículo esquerdo antes do protocolo de exercícios físicos. Os grupos com estenose aórtica apresentaram hipertrofia ventricular concêntrica caracterizada por aumento da espessura das paredes do VE, da massa do VE, do diâmetro do átrio esquerdo e da espessura relativa do VE em comparação a seus respectivos controles. Funcionalmente, os grupos com estenose apresentaram discreta disfunção sistólica, caracterizada pela redução da velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, e disfunção diastólica, caracterizada pela redução do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de desaceleração da onda E e pelo aumento da relação E/E'. Não detectamos diferenças significantes entre os grupos EA-Ex e EA-Sed.

Os dados referentes à avaliação ecocardiográfica, ao final do experimento, estão apresentados nas Tabelas 8 a 11. Os grupos EA-Sed e EA-Ex, apesar de apresentarem aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do VE, mantiveram padrão de hipertrofia ventricular concêntrica, caracterizada pelo aumento da massa do VE e da espessura relativa do VE. Funcionalmente, os grupos com estenose persistiram com disfunção sistólica leve, caracterizada pela redução da velocidade de encurtamento da parede posterior do VE e da média das velocidades máximas de deslocamento das paredes lateral e septal do anel mitral avaliada por Doppler tissular (S média). A disfunção diastólica final foi grave, sendo caracterizada pelo aumento da relação E/A e das alterações previamente observadas. Não observamos alterações estatisticamente significantes entre os grupos com estenose, sedentário e exercitado.

Análise morfométrica

O trofismo do músculo sóleo foi avaliado por morfometria em lâminas histológicas (Figura 1). A área seccional das fibras musculares esqueléticas não diferiu entre os grupos (C-Sed 3980 ± 231 ; C-Ex 4113 ± 253 ; EA-Sed 3541 ± 200 , EA-Ex $3941 \pm 253 \mu\text{m}^2$; $p > 0,05$).

Marcador do estresse oxidativo

A concentração de hidroperóxido de lipídeo foi maior no grupo EA-Sed que nos grupos C-Sed e EA-Ex (C-Sed $136 \pm 36,0$; C-Ex $141 \pm 31,2$; EA-Sed $197 \pm 37,8$; EA-Ex $143 \pm 35,0$ nmol/g tecido; Figura 2).

Atividade das enzimas antioxidantes

A Figura 3 mostra a atividade das enzimas antioxidantes no músculo sóleo. A atividade da enzima superóxido dismutase foi maior no grupo EA-Sed que nos grupos C-Sed e EA-Ex (C-Sed $8,52 \pm 1,95$; C-Ex $8,09 \pm 0,94$; EA-Sed $12,7 \pm 1,55$; EA-Ex $8,60 \pm 0,93$ nmol/mg proteína; $p < 0,001$). A atividade da glutathione peroxidase foi menor nos grupos C-Ex e EA-Sed que no C-Sed e maior no grupo EA-Ex que no EA-Sed (C-Sed $85,6 \pm 12,3$; C-Ex $70,2 \pm 14,8$; EA-Sed $45,2 \pm 9,73$, EA-Ex $74,7 \pm 10,6$ nmol/mg proteína, $p < 0,001$). A atividade da catalase não diferiu entre os grupos (C-Sed $34,9 \pm 9,20$; C-Ex $41,8 \pm 10,2$; EA-Sed $52,9 \pm 10,9$; EA-Ex $43,6 \pm 15,2$ μ mol/g tecido; $p > 0,05$).

Expressão gênica das subunidades do complexo NADPH oxidase

Os valores da expressão de mRNA das subunidades do complexo NADPH oxidase, normalizados pelos genes GAPDH e ciclofilina estão apresentados na Tabela 12. A expressão gênica de $p22^{phox}$ foi maior no grupo EA-Ex que no grupo C-Ex. A expressão da $p47^{phox}$, NOX 2 e NOX 4 não diferiu entre os quatro grupos.

Atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase, avaliada em frações enriquecidas de membrana celular pela redução da lucigenina e detectada por luminômetro, não diferiu entre os grupos (Figura 4).

Geração total de espécies reativas de oxigênio

A geração total de espécies reativas de oxigênio no músculo sóleo foi avaliada pela quantificação de dois compostos fluorescentes derivados da oxidação de dihidroetídio (DHE) por HPLC: 2-hidroxi-etídio (EOH) e etídio. A relação EOH/DHE foi menor no grupo EA-Ex que no C-Ex e não diferiu entre os grupos com estenose aórtica. A relação etídio/DHE não diferiu entre os grupos (Figura 5).

Expressão proteica

Os resultados da expressão das proteínas da família MAPK estão apresentados na Tabela 13. A forma total da JNK foi menor no grupo EA-Ex que nos grupos C-Ex e EA-Sed e a forma fosforilada da ERK foi maior no EA-Ex que no EA-Sed (Figuras 6 e 7). As outras proteínas avaliadas não diferiram entre os grupos.

Com relação à via do NF- κ B, foram avaliados a subunidade p65 do NF- κ B e seu inibidor I κ B. Não foram encontradas diferenças entre os quatro grupos na expressão proteica da subunidade p65 em sua forma total e fosforilada. A forma fosforilada do I κ B foi menor nos grupos C-Ex e EA-Sed comparados ao grupo C-Sed. A expressão proteica do I κ B total não diferiu entre os grupos (Tabela 14).

Tabela 1. Incidência de sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca em ratos com estenose aórtica

	Incidência (%)	
	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=18)
Taquipneia e respiração laboriosa	22,2	16,7
Trombo em átrio esquerdo	33,3	38,9
Derrame pleuropericárdico	66,7	55,6
Congestão hepática	16,7	11,1
Congestão pulmonar	66,7	66,7
Hipertrofia do ventrículo direito	72,2	61,1
Ascite	22,2	5,60

EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; n: número de animais. Teste de Goodman; P > 0,05.

Tabela 2. Variáveis anatômicas

	C-Sed (n=22)	C-Ex (n=19)	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=18)
PC (g)	454 ± 57,4	466 ± 64,6	435 ± 35,8	439 ± 47,8
VE (mg)	0,92 (0,86–0,99)	0,96 (0,84–1,04)	1,40 (1,28–1,73) *	1,36 (1,23–1,50) #
VE/PC (mg/g)	1,95 (1,78–1,99)	1,88 (1,67–2,11)	3,17 (2,67–3,86) *	3,35 (2,74–3,84) #
VD (mg)	0,24 (0,21–0,25)	0,23 (0,21–0,28)	0,45 (0,31–0,55)*	0,43 (0,26–0,54) #
VD/PC (mg/g)	0,48 (0,42–0,51)	0,50 (0,41–0,56)	0,99 (0,76–1,22) *	0,98 (0,62–1,28) #
Átrio (mg)	0,09 (0,07–0,10)	0,09 (0,08–0,11)	0,31 (0,27–0,38) *	0,27 (0,15–0,35) #
Átrio/PC (mg/g)	0,19 (0,14–0,21)	0,19 (0,16–0,23)	0,68 (0,59–0,87) *	0,68 (0,59–0,87) #
Pulmão (mg)	1,84 (1,65–2,02)	1,78 (1,48–2,03)	3,35 (2,31–4,08) *	3,15 (2,11 – 3,50) #
Pulmão/PC (mg/g)	3,84 (3,54–4,25)	3,60 (2,98–4,12)	6,58 (4,40–8,10)*	7,36 (4,83–10,25)#
Sóleo (g)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,04 *	0,21 ± 0,03
Sóleo/PC (mg/g)	0,50 ± 0,10	0,45 ± 0,11	0,48 ± 0,07	0,49 ± 0,09
Gastrocnêmio (g)	2,67 ± 0,33	2,70 ± 0,29	2,44 ± 0,33 *	2,42 ± 0,27 #
Gastro/PC (mg/g)	5,39 ± 0,41	5,51 ± 0,44	5,33 ± 0,54	5,54 ± 0,41

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; PC: peso corporal final; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; Gastro: músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann-Whitney. P < 0,05: * vs C-Sed; # vs C-Ex.

Tabela 3. Distância e tempo percorridos durante teste de esforço em esteira antes e após treinamento físico

		C-Sed (n=22)	C-Ex (n=19)	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=19)
Distância	Inicial	257 ± 86,5	247 ± 55,8	171 ± 59,7 *	163 ± 35,5 #
	Final	225 ± 64,8	304 ± 47,5 *	154 ± 48,9 *	254 ± 47,2 #†
Tempo	Inicial	22,8 ± 4,10	22,7 ± 2,53	18,5 ± 3,16 *	18,1 ± 2,16 #
	Final	21,7 ± 3,51	25,1 ± 1,94 *	18,0 ± 3,05 *	22,7 ± 2,61 #†

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann-Whitney; P<0,05: * vs C-Sed; # vs C-Ex; † vs EA-Sed.

Tabela 4. Avaliação ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

	C-Sed (n=11)	C-Ex (n=11)	EA-Sed (n=15)	EA-Ex (n=13)
PC (g)	458 ± 61,9	462 ± 48,5	440 ± 33,2	447 ± 53,6
DDVE (mm)	8,08 ± 0,51	8,28 ± 0,42	8,71 ± 0,56 *	8,58 ± 0,97
DDVE/PC (mm/kg)	17,84 ± 2,02	18,05 ± 1,44	19,84 ± 1,34 *	19,47 ± 3,28
DSVE (mm)	3,76 (3,37–4,05)	3,86 (3,48–4,56)	4,05 (3,36–4,39)	3,97 (3,40–5,01)
EDPP (mm)	1,41 (1,38–1,44)	1,44 (1,33–1,46)	2,07 (1,95–2,32) *	2,12 (1,65–2,26) #
ESPP (mm)	2,94 (2,73–3,06)	3,05 (2,78–3,16)	3,95 (3,63–4,16) *	3,60 (3,21–3,97) #
EDSIV (mm)	1,41 (1,39–1,44)	1,44 (1,33–1,46)	2,07 (1,95–2,32) *	2,12 (1,65–2,27) #
ESSIV (mm)	2,45 (2,31–2,55)	2,48 (2,37–2,65)	3,11 (3,01–3,50) *	3,11 (2,73–3,48) #
Esp. rel. VE	0,34 (0,33–0,37)	0,34 (0,33–0,36)	0,45 (0,38–0,54) *	0,48 (0,43–0,53) #
AO (mm)	3,90 ± 0,29	3,91 ± 0,29	3,84 ± 0,24	3,81 ± 0,19
AE (mm)	5,26 (4,84–5,75)	5,66 (5,20–5,80)	7,88 (6,49–8,48) *	7,66 (5,47–8,59) #
AE/AO	1,37 (1,32–1,42)	1,41 (1,34–1,46)	1,94 (1,68–2,28) *	2,05 (1,54–2,29) #
AE/PC (mm/kg)	11,5 (10,7–12,7)	11,6 (11,2–12,7)	18,3 (14,7–19,8) *	16,5 (12,2–20,7) #
Massa VE	0,77 (0,74–0,88)	0,80 (0,76–0,92)	1,51 (1,30–1,71) *	1,65 (0,88–1,85) #
Índice MVE	1,72 (1,68–1,79)	1,80 (1,72–1,90)	3,31 (2,89–3,91) *	3,60 (1,98–4,14) #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; PC: peso corporal; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); EDPP e ESPP: espessura diastólica e sistólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

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

	C-Sed (n=11)	C-Ex (n=11)	EA-Sed (n=15)	EA-Ex (n=13)
FC (bpm)	260 ± 23,7	270 ± 32,2	278 ± 41,5	278 ± 39
%enc.endo	53,6 ± 4,34	51,0 ± 5,72	54,7 ± 7,02	52,5 ± 9,86
% enc.meso	32,1 ± 2,96	29,9 ± 3,85	30,1 ± 5,61	29,4 ± 5,07
VEPP	39,4 ± 3,20	37,2 ± 4,12	31,2 ± 4,53*	31,9 ± 7,05#
Tei	0,45 (0,41 – 0,50)	0,48 (0,44 – 0,51)	0,46 (0,38 – 0,51)	0,40 (0,37 – 0,45)#
FE	0,90 (0,89 – 0,92)	0,88 (0,85 – 0,91)	0,92 (0,88 – 0,93)	0,90 (0,84 – 0,92)

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; FC: frequência cardíaca; % enc. endo e meso: porcentagem de encurtamento endo e mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; FE: fração de ejeção. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

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

	C-Sed (n=11)	C-Ex (n=11)	EA-Sed (n=15)	EA-Ex (n=13)
E mitral	78,0 (71,0 – 81,5)	80,0 (69,2 – 83,5)	124 (88,7 – 152) *	128 (99,0 – 145) #
A mitral	53,0 (47,2 – 56,7)	52,0 (43,5 – 56,7)	27,5 (19,0 – 53,0)	24,0 (16,0 – 60,5)
E/A	1,49 (1,30 – 1,61)	1,56 (1,43 – 1,61)	5,57 (1,66 – 6,79) *	6,85 (1,45 – 8,32)
TRIV	26,0 ± 3,58	25,3 ± 3,50	19,7 ± 5,04 *	19,2 ± 5,54 #
TDE	47,9 ± 6,24	44,7 ± 7,70	34,7 ± 10,0 *	29,5 ± 6,36 #
TRIVn	53,9 ± 6,55	53,3 ± 6,02	42,3 ± 11,2 *	41,2 ± 12,3 #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica inicial pelo Doppler tissular

	C-Sed (n=11)	C-Ex (n=11)	EA-Sed (n=15)	EA-Ex (n=13)
S lateral	3,35 ± 0,53	3,48 ± 0,61	2,92 ± 0,63	3,08 ± 0,64
S septal	3,27 ± 0,49	3,57 ± 0,60	2,76 ± 0,53	2,76 ± 0,69
S média	3,31 ± 0,40	3,53 ± 0,57	2,84 ± 0,51*	2,92 ± 0,48#
E' lateral	3,61 ± 0,63	4,05 ± 0,55	3,98 ± 1,15	4,35 ± 1,03
E' septal	4,10 (3,65 – 4,25)	4,20 (4,12 – 4,65)	3,50 (3,12 – 4,70)	3,70 (3,37 – 4,12)#
E' média	3,87 ± 0,61	4,24 ± 0,48	3,85 ± 0,91	4,12 ± 0,70
A' lateral	3,32 ± 0,60	3,73 ± 1,12	3,49 ± 0,99	3,78 ± 1,38
A' septal	2,90 (2,50 – 3,32)	2,90 (2,65 – 3,17)	3,20 (2,50 – 3,60)	3,20 (2,50 – 3,60)
A' média	3,10 (2,66 – 3,40)	3,15 (2,88 – 3,65)	3,00 (2,69 – 4,05)	3,05 (2,55 – 3,66)
E/E'	20,0 (17,8 – 22,6)	18,4 (17,8 – 19,1)	31,8 (27,6 – 39,7)*	31,7 (21,9 – 34,6)#

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	C-Sed (n=22)	C-Ex (n=19)	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=18)
DDVE (mm)	8,30 ± 0,55	8,50 ± 0,55	9,02 ± 0,85 *	9,17 ± 0,74 #
DSVE (mm)	4,05 ± 0,55	4,30 ± 0,60	4,81 ± 1,17 *	5,27 ± 0,98 #
DDVE/PC	16,6 ± 2,05	16,8 ± 1,91	18,9 ± 2,69 *	20,4 ± 3,09 #
EDPP (mm)	1,42 (1,38–1,46)	1,38 (1,31–1,44)	2,06 (1,84–2,12) *	1,99 (1,84–2,17) #
ESPP (mm)	3,01 (2,76–3,14)	2,69 (2,65–3,00) *	3,60 (2,86–3,79) *	3,49 (2,91–3,72) #
EDSIV (mm)	1,43 (1,40–1,46)	1,38 (1,34–1,46)	2,11 (1,84–2,16) *	2,01 (1,84–2,17) #
ESSIV (mm)	2,52 (2,42–2,65)	2,42 (2,33–2,59)	2,79 (2,59–3,16) *	2,93 (2,68–3,25) #
Esp.rel VE	0,34 (0,33–0,36)	0,33 (0,31–0,34)	0,44 (0,38–0,48) *	0,42 (0,40–0,50) #
AO (mm)	4,02 (3,83–4,16)	4,02 (3,83–4,16)	3,94 (3,80–4,16)	3,94 (3,80–4,09)
AE (mm)	5,29 (4,93–5,69)	5,66 (5,47–5,99)	8,54 (7,88–8,69) *	8,14 (6,79–8,54) #
AE/AO	1,32 (1,26–1,38)	1,43 (1,30–1,52)	2,17 (1,83–2,29) *	2,09 (1,67–2,24) #
AE/PC	10,3 (9,5–12,1)	10,9 (10,0–12,3)	17,3 (14,8–19,5) *	17,3 (15,7–18,9) #
Massa VE	0,82 (0,77–0,89)	0,83 (0,74–0,93)	1,62 (1,18–1,87) *	1,38 (1,32–1,93) #
Índice MVE	1,69 (1,44–1,88)	1,64 (1,47–1,85)	2,81 (2,69–3,67) *	3,40 (2,66–4,16) #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PC: peso corporal; EDPP e ESPP: espessura diastólica e sistólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp.rel.VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

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

	C-Sed (n=22)	C-Ex (n=19)	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=18)
FC (bpm)	282 (262–318)	312 (255–341)	294 (280–325)	312 (290–318)
%enc.endo	51,6 (46,6–55,8)	50,0 (46,2–51,5)	46,6 (38,9–54,8)	43,6 (38,3–47,4) #
% enc.meso	29,5 (27,6–32,4)	29,7 (28,4–31,7)	28,6 (21,1–32,7)	24,5 (21,6–26,6) #
VEPP	41,1 ± 5,27	41,4 ± 7,10	31,0 ± 7,14 *	29,1 ± 6,66 #
Tei	0,44 ± 0,08	0,43 ± 0,07	0,41 ± 0,08	0,42 ± 0,11
FE	0,89 (0,85–0,91)	0,87 (0,84–0,89)	0,85 (0,77–0,91)	0,82 (0,76–0,85) #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; FC: frequência cardíaca; % enc. endo e meso: porcentagem de encurtamento endo e mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; FE: fração de ejeção. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

Tabela 10. Avaliação ecocardiográfica final da função diastólica do ventrículo esquerdo.

	C-Sed (n=22)	C-Ex (n=19)	EA-Sed (n=18)	EA-Ex (n=18)
E mitral	79,5 (73,0–84,0)	81,5 (76,0–89,0)	142 (89,0–165) *	145 (85,0–159) #
A mitral	59,5 (51,0–67,0)	60,0 (51,0–76,0)	24,0 (22,0–47,5) *	22,5 (16,0–59,0) #
E/A	1,40 (1,22–1,53)	1,34 (1,17–1,60)	5,85 (1,73–7,15) *	7,50 (1,47–9,16) #
TRIV	24,0 (22,0–26,0)	22,0 (21,2–26,0)	18,0 (15,0–22,0) *	16,0 (15,0–22,0) #
TDE	45,0 (41,0–52,0)	47,0 (41,0–53,0)	28,0 (23,0–35,0) *	29,0 (24,5–33,0) #
TRIVn	53,0 ± 7,25	51,2 ± 8,37	42,6 ± 11,4 *	39,0 ± 10,2 #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado; E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

Tabela 11. Avaliação ecocardiográfica final pelo Doppler tissular

	Sham-Sed (n=22)	Sham-Ex (n=19)	EAo-Sed (n=18)	EAo-Ex (n=18)
S lateral	3,85 ± 0,83	3,76 ± 0,47	2,94 ± 0,60 *	3,03 ± 0,53 #
S septal	3,60 (3,00–4,00)	3,35 (3,10–3,60)	2,80 (2,37–3,47) *	3,05 (2,40–3,30) #
S média	3,76 ± 0,72	3,58 ± 0,35	2,96 ± 0,69 *	2,94 ± 0,49 #
E' lateral	4,30 (4,00–4,70)	4,70 (4,35–5,20)	4,00 (2,82–5,42)	3,50 (3,30–5,80)
E' septal	4,57 ± 1,02	4,51 ± 0,74	3,91 ± 1,34	4,34 ± 1,18
E' média	4,37 (3,95–4,95)	4,50 (4,35–4,92)	4,25 (3,04–4,90)	4,17 (3,50–5,25)
A' lateral	4,77 ± 1,51	4,66 ± 1,43	4,09 ± 1,46	4,54 ± 1,27
A' septal	4,00 (3,20–5,30)	3,75 (3,30–4,75)	3,10 (2,40–4,80)	4,05 (2,40–4,80)
A' média	4,50 ± 1,37	4,37 ± 1,21	3,79 ± 1,47	4,12 ± 1,07
E/E'	17,9 (15,8–20,0)	18,4 (15,7–20,2)	33,0 (25,7–41,3) *	32,1 (24,8–40,6) #

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney. P<0,05; * vs C-Sed; # vs C-Ex.

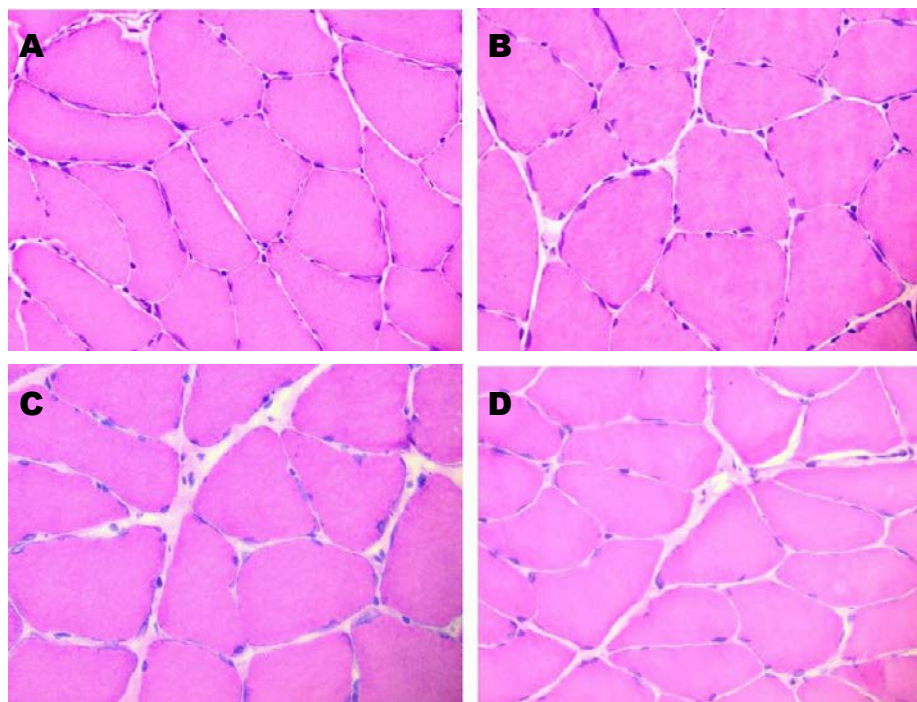


Figura 1. Cortes histológicos do músculo sóleo corados com hematoxilina-eosina. A: grupo controle sedentário; B: grupo controle exercitado; C: grupo estenose aórtica sedentário; D: grupo estenose aórtica exercitado; n=8 por grupo. Objetiva: 40X.

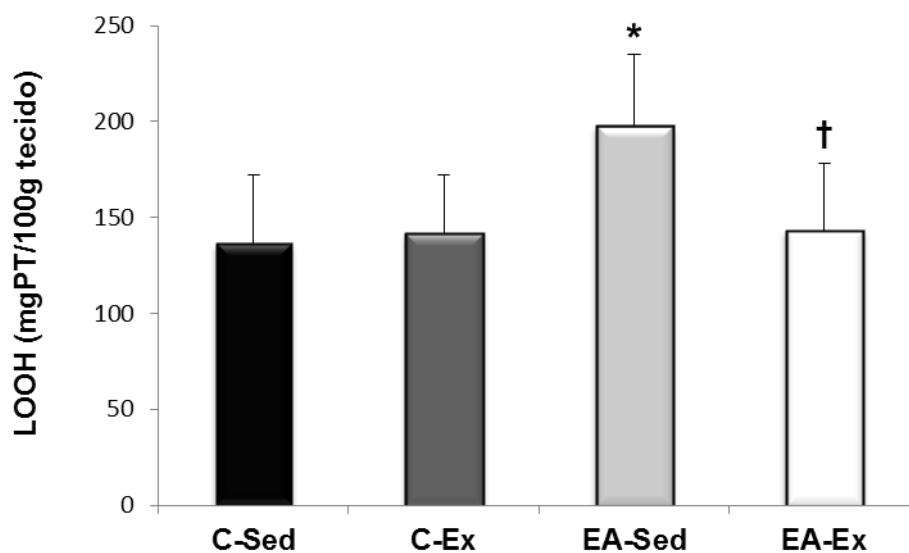


Figura 2. Concentração de marcador de estresse oxidativo no músculo sóleo. LOOH: hidroperóxido de lipídeo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey. $P < 0,05$: *vs C-Sed; † vs EA-Sed.

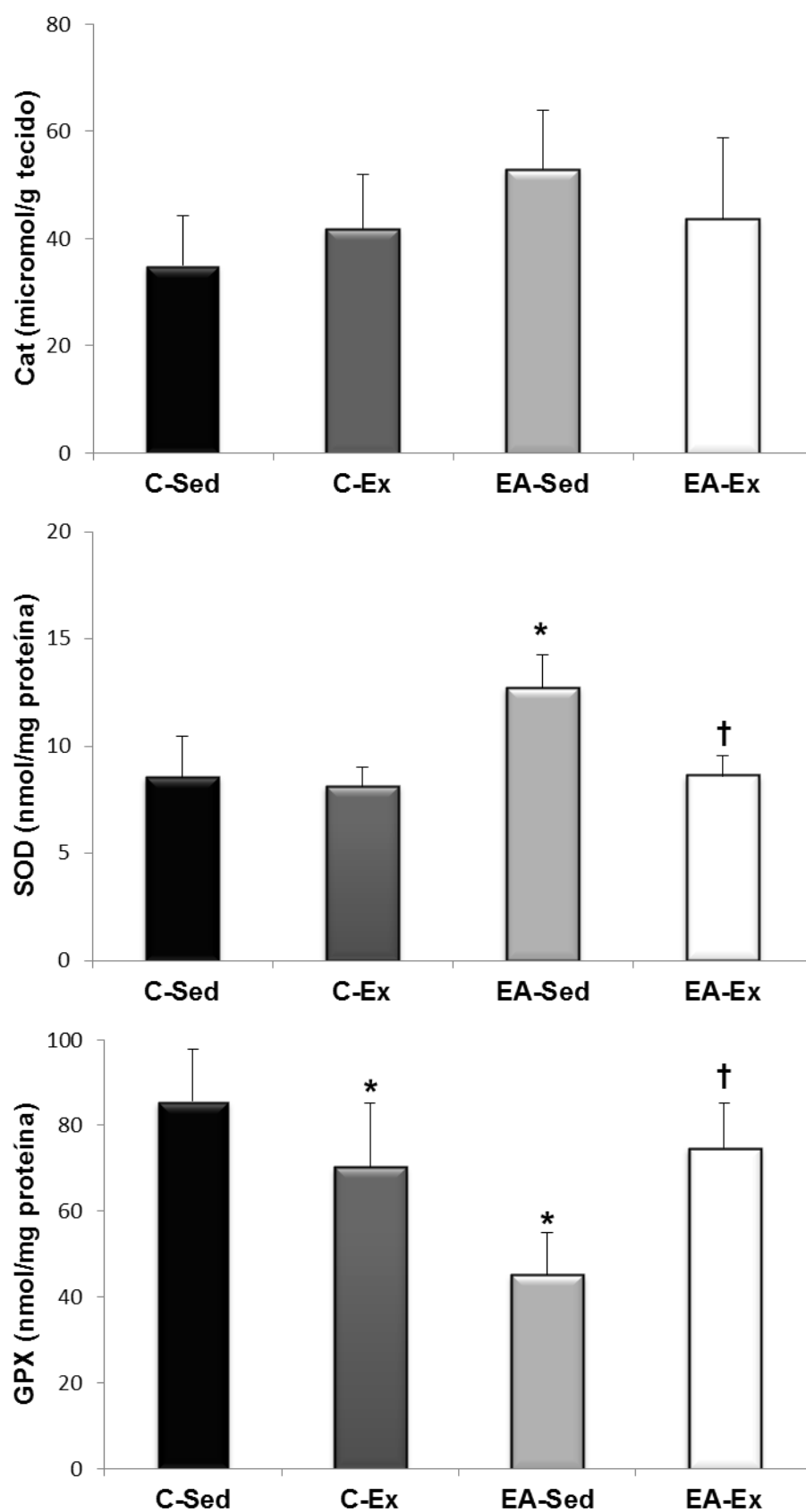


Figura 3. Atividade de enzimas antioxidantes no músculo sóleo. Cat: catalase; SOD: superóxido dismutase; GPX: glutathione peroxidase. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o esquema factorial 2x2 e Tukey. $P < 0,05$; *vs C-Sed; † vs EA-Sed.

Tabela 12. Expressão gênica das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase no músculo sóleo

	C-Sed (n=8)	C-Ex (n=8)	EA-Sed (n=8)	EA-Ex (n=8)
p22^{phox}	1,00 ± 0,40	0,44 ± 0,15	1,10 ± 0,66	1,17 ± 0,70 #
p47^{phox}	1,00 ± 0,53	1,52 ± 0,49	0,84 ± 0,48	1,21 ± 0,65
NOX 2	1,00 (0,37–1,39)	0,33 (0,26–0,75)	0,82 (0,53–2,16)	0,63 (0,42–1,07)
NOX 4	1,00 ± 0,52	0,70 ± 0,46	0,79 ± 0,22	0,98 ± 0,32

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann-Whitney. P <0,05: # vs C-Ex.

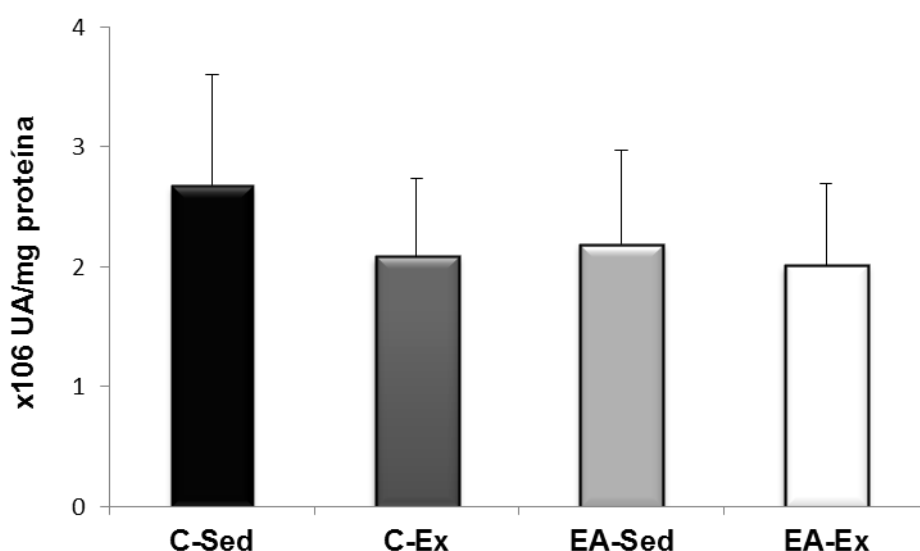


Figura 4. Atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo avaliada pela redução de lucigenina. C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey; P>0,05.

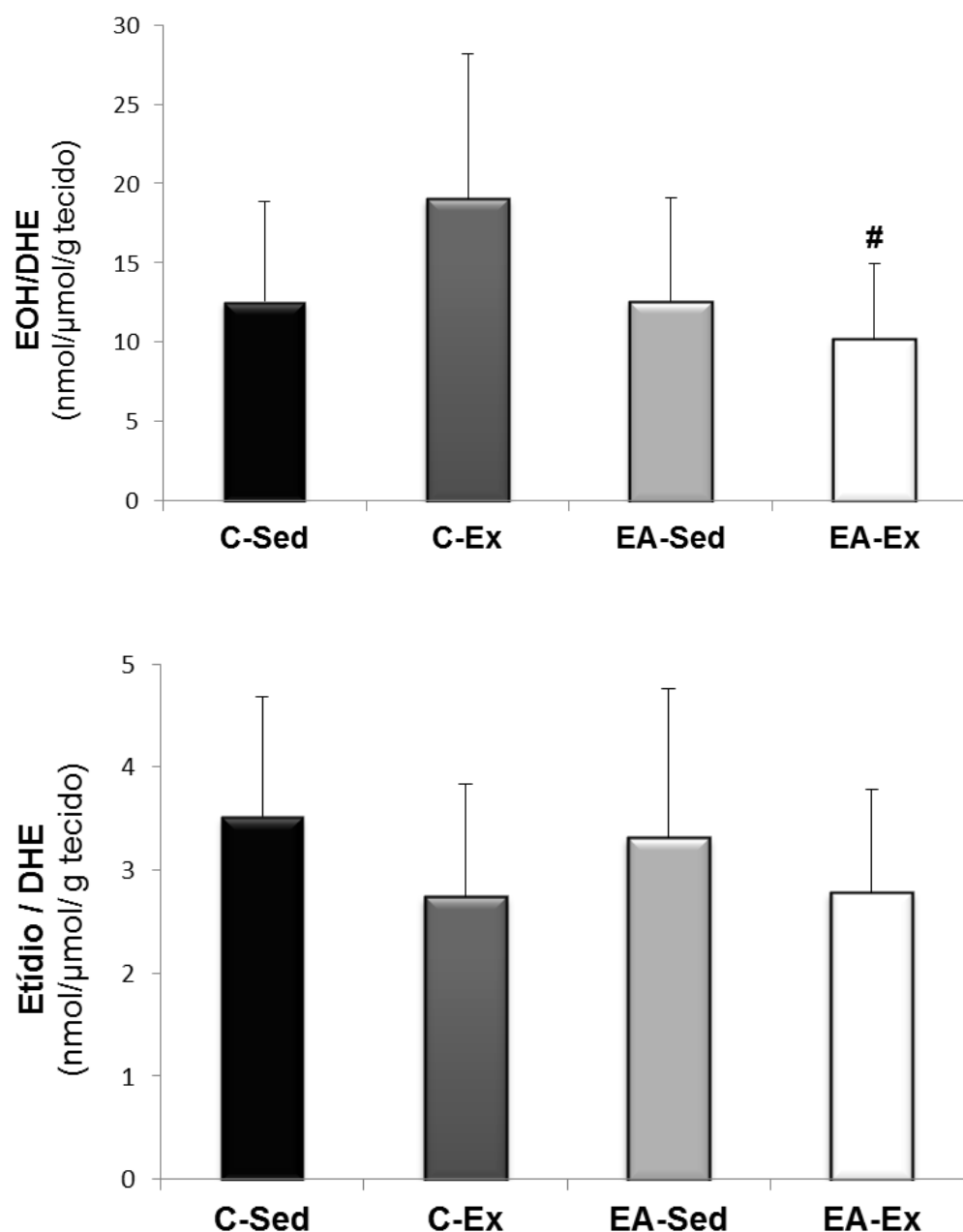


Figura 5. Geração total de espécies reativas de oxigênio no músculo sóleo avaliada pela quantificação de dois compostos fluorescentes derivados da oxidação de dihidroetídio (DHE) por HPLC: 2-hidroxi-etídio (EOH) e etídio (E). C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey. $P < 0,05$; # vs C-Ex.

Tabela 13. Expressão proteica da via das MAPK no músculo sóleo

		C-Sed (n=7)	C-Ex (n=7)	EA-Sed (n=7)	EA-Ex (n=7)
p38	Fosforilada	1,00 ± 0,58	0,57 ± 0,53	0,97 ± 0,58	0,45 ± 0,36
	Total	1,00 ± 0,16	0,73 ± 0,49	0,89 ± 0,57	0,81 ± 0,26
JNK	Fosforilada	1,00 ± 0,38	1,07 ± 0,26	1,16 ± 0,23	0,87 ± 0,43
	Total	1,00 ± 0,38	1,04 ± 0,42	1,28 ± 0,22	0,63 ± 0,21# †
ERK	Fosforilada	1,00 ± 0,22	0,67 ± 0,26	0,54 ± 0,47	1,28 ± 0,84 †
	Total	0,97 (0,77– 1,17)	0,92 (0,79–1,74)	1,64 (0,92–1,81)	0,96 (0,28– 2,11)

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney; P<0,05: *vs C-Sed; # vs C-Ex; † vs EA-Sed.

Tabela 14. Expressão proteica da via do NF-kB no músculo sóleo

		C-Sed (n=7)	C-Ex (n=7)	EA-Sed (n=7)	EA-Ex (n=7)
p65 NF-kB	Fosforilada	0,96 (0,87–1,06)	0,99 (0,67–1,16)	0,71 (0,49–1,44)	1,08 (0,76–1,17)
	Total	1,00 ± 0,42	1,05 ± 0,34	1,00 ± 0,65	0,83 ± 0,40
IκB	Fosforilada	1,00 ± 0,21	0,71± 0,17*	0,54 ± 0,24*	0,67 ± 0,39
	Total	0,97 (0,83–1,14)	0,79 (0,68–0,87)	1,32 (1,13–1,84)	1,53 (0,90–2,08)

C-Sed: grupo controle sedentário; C-Ex: grupo controle exercitado; EA-Sed: grupo estenose aórtica sedentário; EA-Ex: grupo estenose aórtica exercitado. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey ou Mann Whitney; P<0,05: *vs C-Sed.

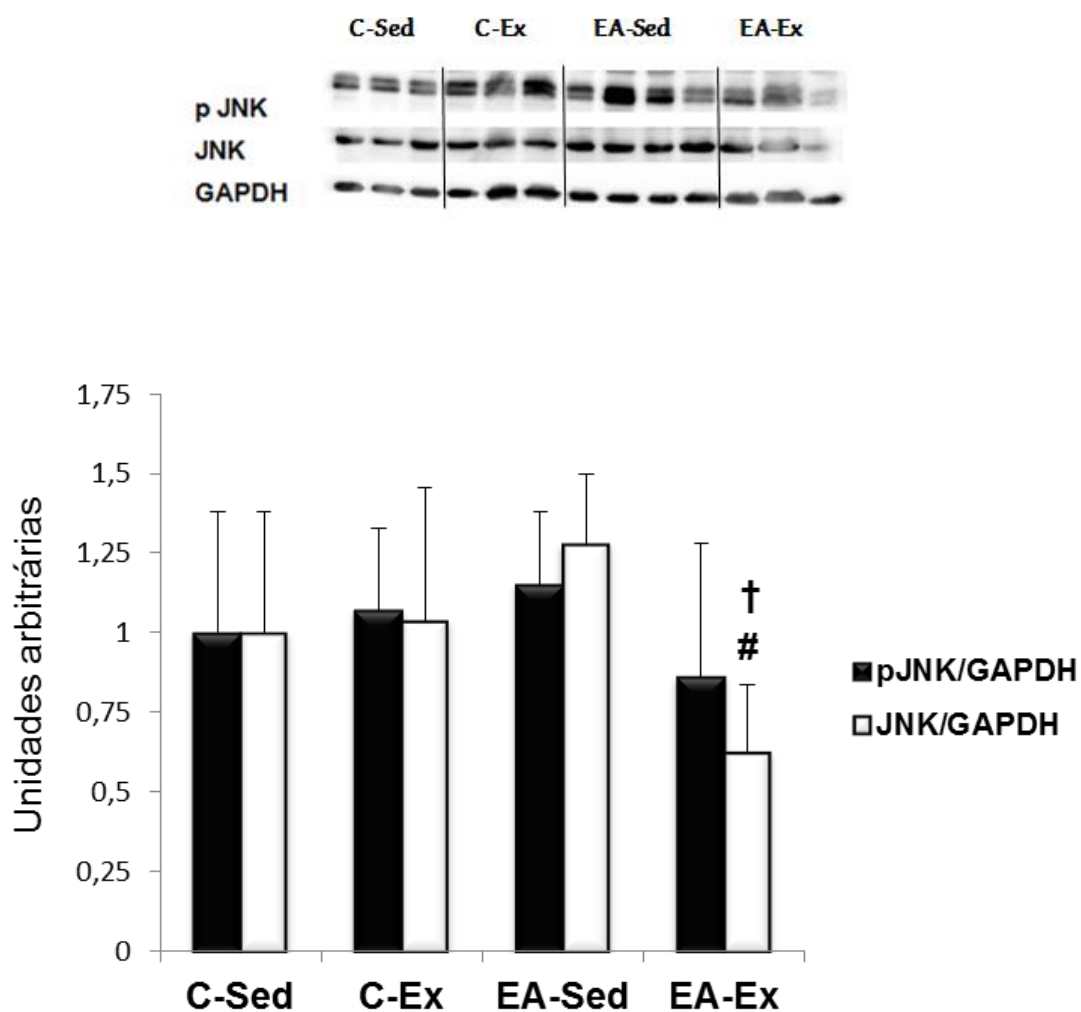


Figura 6. Expressão proteica da JNK em sua forma total e fosforilada no músculo sóleo avaliada pela técnica de Western blot e normalizada pela expressão proteica da GAPDH. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey. $P < 0,05$: #vs C-Ex; †vs EA-Sed.

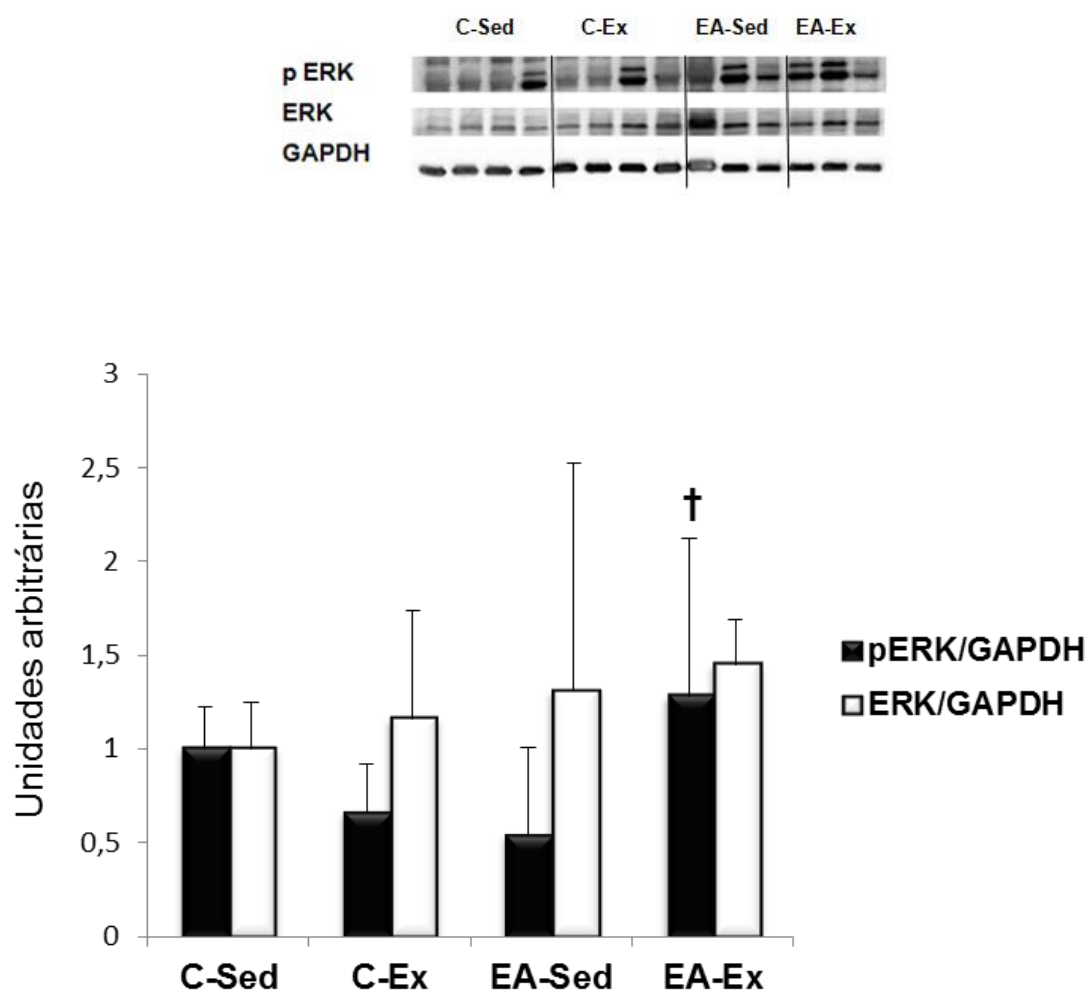


Figura 7. Expressão proteica da ERK em sua forma total e fosforilada no músculo sóleo avaliada pela técnica de Western blot e normalizada pela expressão proteica da GAPDH. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o esquema fatorial 2x2 e Tukey. $P < 0,05$: † vs EA-Sed.

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos do exercício físico aeróbio sobre a capacidade física, o coração e o músculo esquelético de sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica.

Neste modelo, três a quatro semanas após o nascimento, os ratos são submetidos a toracotomia para indução de estenose da aorta ascendente. Imediatamente após a colocação de clipe ao redor da aorta, o diâmetro do vaso mantém-se preservado. Com o crescimento do animal e a manutenção do diâmetro da aorta, ocorre o aparecimento progressivo da estenose. Precocemente, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda que está associada, inicialmente, com melhora da função sistólica do coração. A seguir, começam a apresentar disfunção diastólica, seguida de piora da função sistólica e quadro de insuficiência cardíaca congestiva. Geralmente, a insuficiência cardíaca manifesta-se 18 a 28 semanas após a indução da estenose aórtica ²⁹. A vantagem do modelo é o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca ^{30, 33, 35, 59}, à semelhança do que se observa em humanos com sobrecarga pressórica crônica.

Para a confirmação de insuficiência cardíaca, foram avaliados sinais clínicos e anátomo-patológicos, *in vivo* e *post mortem*, compatíveis com o diagnóstico ^{60, 61}. De acordo com estudos em ratos espontaneamente hipertensos, a hipertrofia do ventrículo direito é a melhor variável para selecionar, dentre animais com sobrecarga pressórica crônica, aqueles com insuficiência cardíaca ⁶². A hipertrofia ventricular direita é decorrente de hipertensão pulmonar resultante de aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo. O peso dos pulmões, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, também pode ser utilizado como índice preditor de insuficiência cardíaca em ratos ^{49, 63}. Entretanto, animais com doença avançada podem parar de ingerir alimentos e água e apresentarem-se desidratados no momento da eutanásia, situação na qual pode não haver congestão pulmonar. Neste estudo, a frequência de sinais de insuficiência cardíaca foi elevada em ambos os grupos com estenose aórtica e não diferiu entre EA-Ex e EA-Sed. Portanto, o protocolo de exercício físico não alterou o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Neste estudo, utilizamos protocolo de exercício físico de baixa a moderada intensidade, adaptado de estudos realizados com ratos infartados ⁶⁴, com hipertensão arterial ^{65, 66} ou com diabetes mellitus ⁶⁷. Essas condições são caracterizadas pela redução da tolerância a esforços físicos de moderada a elevada intensidade. Em ratos espontaneamente hipertensos, Schultz et al. ⁶⁸ observaram que longo período de exercício voluntário com roda giratória (de 6 a 22 meses de idade) foi associado a aumento da dilatação do ventrículo esquerdo, do conteúdo miocárdico de colágeno e da área seccional do miócito e a redução da função sistólica. Exercícios voluntários em roda giratória são caracterizados por séries de curtos períodos de atividade com alta intensidade ⁶⁹. O protocolo de exercício aeróbio utilizado foi efetivo em melhorar a capacidade funcional, tanto dos ratos controles como daqueles com estenose aórtica. Ao final do experimento, a distância percorrida e o tempo de permanência na esteira foram significativamente maiores nos ratos exercitados que nos sedentários.

A avaliação ecocardiográfica inicial teve por objetivo avaliar o grau de injúria cardíaca induzida pela estenose aórtica e assegurar a homogeneidade entre os grupos. Os ratos com estenose aórtica apresentaram hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo caracterizada por aumento da massa do ventrículo esquerdo, da espessura das paredes ventriculares, da espessura relativa do ventrículo esquerdo e do diâmetro do átrio esquerdo. Funcionalmente, os animais tiveram disfunção sistólica leve, definida pela redução da velocidade de encurtamento da parede posterior e da onda S média, e disfunção diastólica, caracterizada pela redução do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de desaceleração da onda E e aumento da relação E/E'. O padrão de remodelação cardíaca com hipertrofia concêntrica e disfunção leve é habitualmente observado em situações de sobrecarga pressórica crônica compensada.

Após o período de exercício físico, os grupos com estenose aórtica mantiveram o padrão de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, porém com leve dilatação ventricular. A disfunção sistólica leve foi mantida. A disfunção diastólica foi caracterizada por aumento da relação E/A, que define padrão restritivo, grave, de disfunção. Não detectamos diferenças significantes nas variáveis ecocardiográficas entre os grupos EA-Ex e EA-Sed. Portanto, podemos

concluir que o exercício físico não alterou parâmetros estruturais ou funcionais do coração de ratos com estenose aórtica grave. Os efeitos do exercício físico sobre o coração, em presença de estenose aórtica grave ainda não estão completamente esclarecidos. Em ratos com estenose aórtica leve ou severa, exercícios voluntários com roda giratória por oito semanas não alterou a função ventricular ⁷⁰. Por outro lado, exercício aeróbio contínuo de moderada intensidade resultou em atenuação da disfunção sistólica de ratos com estenose aórtica ^{33, 59}.

Uma vez que a função cardíaca não diferiu entre os grupos EA-Ex e EA-Sed, é provável que a melhora da capacidade funcional dos ratos exercitados tenha sido decorrente de melhora funcional da musculatura esquelética.

O peso corporal não diferiu entre os grupos. Redução significativa do peso do corpo, denominada caquexia cardíaca, é frequentemente observada em estágios avançados da doença. Em humanos, está associada a mau prognóstico, independentemente de variáveis importantes como idade, fração de ejeção, capacidade física ou classe funcional da insuficiência cardíaca ⁷¹. Em trabalho prévio, observamos redução do peso corporal de ratos com estenose aórtica e grau mais avançado de insuficiência cardíaca ^{35, 72}. A ausência de perda de peso sugere que os ratos sobreviventes ao final do estudo ainda não se encontravam em insuficiência cardíaca grave.

Os músculos esqueléticos são formados por tecido capaz de alterar suas características metabólicas, morfológicas e funcionais em situações de treinamento ou injúria ⁷³. A insuficiência cardíaca crônica induz adaptações estruturais e funcionais da musculatura esquelética ⁷⁴. Neste estudo, a avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo sóleo. Este músculo possui, preferencialmente, fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo. Estudos prévios de nosso laboratório e da literatura mostraram que o músculo sóleo é sensível às alterações induzidas pela insuficiência cardíaca aguda ou crônica ^{16, 36, 47, 48}. Além disso, músculos esqueléticos com fibras preferencialmente oxidativas são mais sensíveis aos efeitos do exercício aeróbio do que músculos constituídos por fibras preferencialmente glicolíticas ⁷⁵.

O peso do músculo sóleo, embora menor no grupo EA-Sed que no C-Sed, não diferiu entre os grupos EAo-Ex e EAo-Sed. Também a área seccional das fibras do sóleo, embora 11% menor no grupo EA-Sed que no C-Sed, não diferiu estatisticamente entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com a manutenção do peso corporal dos grupos com estenose aórtica e reforçam a suposição que, ao final do experimento, os ratos não se encontravam em grau avançado de insuficiência cardíaca. Habitualmente, o exercício físico aeróbio não induz aumento da massa muscular como se observa com exercícios resistivos. Entretanto, em ratos com caquexia cardíaca, o treinamento aeróbio está associado a aumento ou preservação da massa muscular ⁷⁶.

Estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os sistemas antioxidantes. Neste trabalho, o grau de estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem da concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo. Este marcador de lipoperoxidação foi maior no grupo EA-Sed que nos grupos C-Sed e EA-Ex, mostrando que o estresse oxidativo foi aumentado na insuficiência cardíaca e normalizado pelo exercício físico. A peroxidação lipídica é causada pela agressão de uma espécie reativa, geralmente radical hidroxil, que abstrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado e deixa um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação. A seguir, ocorre a fase de propagação, na qual há formação do radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que é capaz de retirar um átomo de H^+ do ácido graxo adjacente gerando, assim, o hidroperóxido de lipídeo. Nas células, a lipoperoxidação pode levar a degeneração e perda de função de proteínas da membrana, prejudicando funções essenciais como a atividade de enzimas intrínsecas e transportadores de ATP ⁷⁷.

As espécies reativas de oxigênio podem ser controladas por complexo sistema composto, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. A superóxido dismutase representa a primeira defesa contra ânion radical superóxido e catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em presença do íon H^+ . A catalase, por sua vez, catalisa a formação de água e oxigênio a partir de H_2O_2 formado pela reação da superóxido dismutase. Já a atividade da glutathione peroxidase é

dependente de sua capacidade de reagir com H_2O_2 e peróxidos orgânicos pela oxidação da glutathiona reduzida a glutathiona oxidada ⁷⁸.

A reação celular ao estresse oxidativo depende da intensidade de formação das espécies reativas de oxigênio. Em baixas concentrações, as espécies reativas de oxigênio têm efeito estimulante sobre receptores e enzimas anti-oxidantes; em elevadas concentrações, entretanto, inibem a atividade enzimática e induzem dano celular ⁷⁹. Os resultados deste estudo mostram que, no grupo EA-Sed, o aumento do estresse oxidativo foi acompanhado por aumento da atividade da superóxido dismutase e redução da atividade da glutathiona peroxidase. A atividade da catalase, embora tenha apresentado comportamento semelhante à da enzima superóxido dismutase, não diferiu estatisticamente entre os grupos. O exercício físico preveniu alterações das enzimas anti-oxidantes no grupo EA-Ex. Redução da atividade de enzimas anti-oxidantes tem sido descrita em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca ^{8, 15, 16, 64}. Adicionalmente, estudos clínicos ¹⁵ e experimentais ^{64, 80} mostraram que o exercício físico tem efeito anti-oxidante no músculo esquelético durante a insuficiência cardíaca. Entretanto, não identificamos na literatura outros estudos que tenham avaliado os efeitos do exercício físico no modelo experimental de ratos com insuficiência cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica causada por estenose aórtica. Os resultados do nosso estudo mostram, portanto, que o exercício físico aeróbico foi eficiente em impedir aumento do estresse oxidativo e alteração de enzimas antioxidantes.

Para determinar se o complexo NADPH oxidase participa do aumento do estresse oxidativo e se este pode ser modulado pelo exercício físico, avaliamos a atividade deste complexo e a expressão gênica de suas subunidades. O complexo NADPH oxidase constitui importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio. Primeiramente, analisamos, no músculo sóleo, a expressão gênica das subunidades transmembranais NOX2, NOX4 e p22^{phox}, além da subunidade citosólica p47^{phox}. Exceto por expressão maior da subunidade p22^{phox} no grupo EA-Ex em comparação ao C-Ex, as subunidades não diferiram entre os grupos. Da mesma forma, a atividade da NADPH oxidase não diferiu entre os grupos. Apesar da expressão gênica da p22^{phox} apresentar-se aumentada no grupo EA-Ex

comparada ao grupo C-Ex, tal alteração não culminou em maior atividade da NADPH oxidase. A atividade de NADPH oxidase foi avaliada pela mensuração da quantidade de luz emitida, resultante da reação entre a lucigenina reduzida com o ânion radical superóxido, produto da atividade da NADPH oxidase. O papel da NADPH oxidase no estresse oxidativo muscular durante a insuficiência cardíaca ainda não está esclarecido. No músculo plantar de ratos com infarto do miocárdio ²³ e em músculos esqueléticos de camundongos infartados ²⁴, a atividade da NADPH oxidase, avaliada por diferentes métodos, foi aumentada. Por outro lado, avaliamos previamente a atividade da NADPH oxidase utilizando dihidroetídio (DHE), molécula que é oxidada pelo ânion superóxido, no músculo sóleo de ratos infartados com insuficiência cardíaca e também não observamos alterações ¹⁶.

Neste estudo, a geração total de espécies reativas de oxigênio no sóleo foi avaliada pela quantificação de dois compostos fluorescentes derivados da oxidação de dihidroetídio (DHE), o 2-hidroetídio (EOH) e o etídio. Não observamos alteração de seus valores entre os grupos EA-Sed e C-Sed ou EA-Ex e EA-Sed. Entretanto, a relação EOH/DHE foi menor no grupo EA-Ex que no C-Ex. A detecção de EOH utilizando fluorescência de HPLC foi proposta para demonstrar de forma mais precisa a produção de superóxido em vasos sanguíneos e posteriormente adaptada para uso em tecido muscular ^{56, 57}. Previamente, observamos, em ratos infartados com insuficiência cardíaca avançada, aumento da relação etídio/DHE no músculo sóleo ¹⁶. No presente estudo, os resultados obtidos com esta técnica são compatíveis com a dosagem de hidroperóxido de lipídeo, mostrando que o exercício físico reduziu o estresse oxidativo dos ratos com estenose aórtica.

Habitualmente, aumento do estresse oxidativo ativa várias vias de sinalização intracelular, entre as quais se destacam as vias das MAPK e do NF-κB. As MAPKs são constituídas por quatro membros: extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) e ERK5. Neste estudo, não observamos diferenças na expressão das proteínas das MAPK entre os grupos EA-Sed e C-Sed. Apesar da expressão da ERK ser aproximadamente 46% menor no grupo EA-Sed que no C-Sed, a diferença não alcançou significância estatística. Nos ratos com estenose aórtica, o exercício físico reduziu a expressão proteica da JNK

total no grupo EA-Ex em comparação ao EA-Sed e aumentou a expressão da forma fosforilada da ERK no grupo EA-Ex em comparação aos grupos EA-Sed e C-Ex. Enquanto ativação da JNK e p38 está associada com a resposta celular ao estresse e perda muscular, a ativação da ERK1/2 está relacionada com processos anabólicos como divisão celular, crescimento e diferenciação ⁸¹. Portanto, podemos concluir que a modulação das proteínas JNK e pERK pelo exercício ocorreu no sentido de preservação da síntese proteica e prevenção de perda muscular. Em estudos prévios observamos, no diafragma e no sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, alterações na expressão das MAPK como redução da ERK com ou sem aumento da fosforilação da JNK ^{16, 82}. Não observamos alterações na expressão das proteínas da via do NF-κB, exceto redução de IκB nos grupos C-Ex e EA-Sed em relação ao C-Sed.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o exercício físico melhora a capacidade funcional de ratos com estenose aórtica independentemente de alteração das estruturas cardíacas ou função ventricular esquerda. No músculo sóleo, o exercício físico reduz o estresse oxidativo, preserva a atividade de enzimas antioxidantes e modula a expressão das MAPK JNK e pERK, sem alterar a atividade da enzima NADPH oxidase, a expressão gênica de suas subunidades ou a expressão de proteínas da via NF-kB.

REFERÊNCIAS

1. Lindenfeld J, Albert NM, Moser DK, Boehmer JP, Rogers JG, Collins SP, Starling RC, Ezekowitz JA, Stevenson WG, Givertz MM, Tang WHW, Katz SD, Teerlink JR, Klapholz M, Walsh MN. Executive summary: HFSA 2010 Comprehensive heart failure practice guideline. *J Cardiac Fail.* 2010;16:476-506
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, J.A. H, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics-2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129:e28-e292
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. IBGE. Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil. 2009
5. Albanesi Filho FM. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? *Arq Bras Cardiol.* 2005;85:155-156
6. Phillips SA, Vuckovic K, Cahalin LP, Baynard T. Defining the system: Contributors to exercise limitations in heart failure. *Heart Fail Clin.* 2015;11:1-16
7. 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
8. Bertaglia RS, Reissler J, Lopes FS, Cavalcante WL, Carani FR, Padovani CR, Rodrigues SA, Cigogna 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
9. Downing J, Balady GJ. The role of exercise training in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:561-569
 10. Mancini DM, Walter G, Reichek 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
 11. Lipkin DP, Jones DA, Round JM, Poole-Wilson PA. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 1988;8:187-195
 12. Clapier VR, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol*. 2004;555:1-13
 13. Kiilavuori K, Näveri H, Salmi T, Härkönen M. The effect of physical training on skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2000;2:53-63
 14. Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2009;5:561-577
 15. 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
 16. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Oliveira Jr SA, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Pagan LU, Seiva FR, Fernandes DC, Laurindo FRM, Novelli ELB, Matsubara LS, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Influence of N-acetylcysteine on oxidative stress in slow-twitch soleus muscle of heart failure rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:148-159

17. 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
18. Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:412-418
19. Sullivan-Gunn M, Campbell-O'Sullivan S, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2:181-188
20. Mofarrahi M, Brandes RP, Gorlach A, Hanze J, Terada LS, Quinn MT, Mayaki D, Petrof B, Hussain SN. Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:559-574
21. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245-313
22. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;71:216-225
23. 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
24. 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
25. Byun MS, Jeon KI, Choi JW, Shim JY, Jue DM. Dual effect of oxidative stress on NF-kappaB activation in HeLa cells. *Exp Mol Med*. 2002;34:332-339
26. Martinez PF. Estresse oxidativo e sinalização pelas vias MAPK e NF-kappaB no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2012:74 p

27. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, Lorell BH. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation*. 1994;90:1410-1422
28. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mrna expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 1990;86:1913-1920
29. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, Aragon FF, Jamas E, Okoshi MP. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supralvar. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81:562-568
30. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi MP, Castro AV. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:325-330
31. Moreira VO, Castro AVB, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, Aragon FF, Bruno MB, Padovani CR, Okoshi K. Echocardiographic criteria for definiton of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:432-438
32. Santos DP, Okoshi K, Moreira VO, Seiva FRF, Almeida FLA, Padovani CR, Carvalho RF, Okoshi MP, Cicogna AC, Castro AVB, Dal Pai-Silva M. Growth hormone attenuates skeletal muscle changes in experimental chronic heart failure. *Growth Horm IGF Res*. 2010;20:149-155
33. Pacagnelli F, Okoshi K, Campos DHS, de Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF, Aguiar AF, Dal Pai M, Cicogna AC. Physical training attenuates cardiac

remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20:3889-3905

34. De Sousa E, Lechene P, Fortin D, N'Guessan B, Belmadani S, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R. Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: Beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc Res*. 2002;56:260-268
35. 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 Pathol*. 2003;84:201-206
36. Carvalho RF, Dariolli R, L.A. JJ, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol*. 2006;87:437-443
37. 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, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL. 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
38. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society

of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:803-869

39. 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
40. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36:1751-1759
41. Lee IM, Sesso HD, Oguma Y, Paffenbarger RSJ. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2003;107:1110-1116
42. Ciolac EG. High-intensity interval training and hypertension: Maximizing the benefits of exercise? *Am J Cardiovasc Dis.* 2012;2:102-110
43. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. 10-year exercise training in chronic heart failure: A randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:1521-1528
44. Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111:555-562
45. 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
46. Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JB, Paixão NA, Campos JC, Ferreira JC, Leal ML, Negrão CE, Moriscot AS, Wisloff U, Brum PC. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS ONE.* 2012;7:e41701

47. 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
48. 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
49. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SAJ, Campos DH, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551
50. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:760-765
51. Cezar MD, Damatto RL, Martinez PF, Lima AR, Campos DH, Rosa CM, Guizoni DM, Bonomo C, Cicogna AC, Gimenes R, Pagan LU, Okoshi MP, Okoshi K. Aldosterone blockade reduces mortality without changing cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32:1275-1287
52. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the chamber quantification writing group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18:1440-1463

53. Rosa CM, Xavier NP, Campos DH, Fernandes AA, Cezar MD, Martinez PF, Cicogna AC, Gimenes C, Gimenes R, Okoshi MP, Okoshi K. Diabetes mellitus activated fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:152
54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ddct} method. *Methods*. 2001;25:402-408
55. Fernandes DC. Modulação do estado redox em células endoteliais por forças hemodinâmicas: Efeito do “shear stress” na expressão e atividade da dissulfeto isomerase protéica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP; 2007:137 p
56. Laurindo FRM, Fernandes DC, Santos CXC. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol*. 2008;441:237-260
57. Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, Santos CXC. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C413-C422
58. Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJT, Marchionni MA, Lorell BH. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity. Muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation*. 2004;110:713-717
59. 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

60. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:60-65
61. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91:161-170
62. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:383-396
63. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. 2001;103:155-160
64. Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, Wisløff U, Brum PC. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol*. 2013;114:1029-1041
65. Emter CA, McCune SA, Sparagna GC, Radin MJ, Moore RL. Low-intensity training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2030-H2038
66. Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, Marshall KD, Murphy RC, Moore RL. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension*. 2008;51:1096-1102
67. Gimenes C, Gimenes R, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, Cezar MDM, Guirado GN, Cicogna AC, Takamoto AHR, Okoshi MP, Okoshi K.

Low intensity physical exercise attenuates cardiac remodeling and myocardial oxidative stress and dysfunction in diabetic rats. *J Diabetes Res*. 2015: *in press*

68. Schultz RL, Swallow JG, Waters RP, Kuzman JA, Redetzke RA, Said S, Escobar GM, Gerdes AM. Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. *Hypertension*. 2007;50:410-416
69. Schultz RL, Kullman EL, Waters RP, Huang H, Kirwan JP, Gerdes AM, Swallow JG. Metabolic adaptations of skeletal muscle to voluntary wheel running exercise in hypertensive heart failure rats. *Physiol Res*. 2013;62:361-369
70. van Deel ED, Boer M, Kuster DW, Boontje NM, Holemans P, Sipido KR, van der Velden J, Duncker DJ. Exercise training does not improve cardiac function in compensated or decompensated left ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:1017-1025
71. Okoshi MP, Romeiro FG, Martinez PF, Oliveira Jr SA, Polegato BF, Okoshi K. Cardiac cachexia and muscle wasting: definition, physiopathology, and clinical consequences. *Res Report Clin Cardiol*. 2014;5:319-326
72. Lima ARR, Damatto RL, Pagan LU, Bonomo C, Gomes MJ, Okoshi K, Okoshi MP. Growth hormone administration alters protein expression in skeletal muscle of rats with aortic stenosis-induced heart failure. *FASEB J*. 2013;27:386.3
73. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013;6:25-39
74. Loncar G, Fulster S, von Haehling S, Popovic V. Metabolism and the heart: An overview of muscle, fat, and bone metabolism in heart failure. *Int J Cardiol*. 2013;162:77-85

75. Russel AP, Foletta VC, Snow RJ, Wadley GD. Skeletal muscle mitochondria: a major player in exercise, health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(4):1276-1284
76. Von Haehling S, Steinbeck L, Doehner W, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in heart failure: An overview. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:2257-2265
77. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88:1243-1276
78. Campos JC, Gomes KM, Ferreira JC. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol*. 2013;62C:107-119
79. Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*. 2005;6:71-75
80. Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bachara LR, Bueno CRJ, Alba-Loureiro TC, Negrão CE, Cesarini DE, Curi R, Ramires PR, Moriscot AS, Brum PC. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: Role of exercise training. *J Appl Physiol*. 2009;106:1631-1640
81. Shi H, Scheffler JM, Zeng C, Pleitner JM, Hannon KM, Grant AL. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296:C1040-C1048
82. Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Oliveira SAJ, Dal-Pai Silva M, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced diaphragm myopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:333-345