

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS E INFARTADAS**

SUELEN GUEDES DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, JANEIRO DE 2017

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA DE RATAS OVARIETOMIZADAS E INFARTADAS

SUELEN GUEDES DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 30/01/2017 por:

Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues de Abreu - Orientador, UFES

Prof. Dr^a. Sônia Alves Gouvêa, UFES

Prof. Dr. Hélder Mauad, UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, JANEIRO DE 2017

Oliveira, Suelen Guedes, 1991

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS E INFARTADAS**

XV, 86 p., 29,7 cm (UFES, M Sc., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

DEDICO ESTE TRABALHO

A minha grande amiga Janete, que mesmo sem saber foi grande incentivadora de conclusão desse trabalho nos momentos de dúvida e possível desistência. Além dos meus pais (Arnaldo e Delma), que sempre me apoiaram e incentivaram meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois todas as minhas graças alcançadas são permitidas pelo senhor. Gratidão!

Aos meu pais, meus irmãos e minha avó que me incentivaram em todo o processo, sonharam meus sonhos e permaneceram em constante oração por mim.

Ao meu namorado Alexandre que soube compreender minha rotina, minha ausência em alguns momentos, meus momentos de instabilidade emocional e permaneceu me incentivando com suas palavras de motivação.

A Janete e Clara por todas as orações nos momentos de maior necessidade.

A minha orientadora Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu pela confiança e oportunidade.

A minha amiga Simone que me oportunizou iniciar minha caminhada na pesquisa através da iniciação científica e muito me auxiliou em meus experimentos com suas habilidades práticas.

Ao meu amigo Erick pelos auxílios em todas as etapas do meu mestrado. Seus conhecimentos, seu caráter, humildade e compreensão com o próximo são características que eu muito admiro.

Aos meus amigos Vinícius e Girlândia que tiveram fundamental importância na finalização desse estudo com os últimos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica Demétrius e Larissa que estiveram presente me auxiliando no primeiro ano do mestrado. Além das alunas Clara, Katiane e Isabela que me auxiliaram no segundo ano do mestrado em todos os experimentos, inclusive os que ocorriam aos finais de semana. Obrigada pelo trabalho, dedicação e amizade. Sem vocês esse trabalho não seria concluído.

Ao Maycon, Jáfia e Renata que estiveram comigo em uma etapa deste estudo que não foi concluída mas que foi de suma importância para o ganho de conhecimento e experiência.

Ao professor Nyan e Lucienne pelos auxílios, paciência e dedicação nos dados histológicos desse estudo.

Aos demais amigos vinculados ou não ao laboratório Fabrício, Sandra, Laís, Raquel, Patrícia, Amanda, Renato, Mariana e Angelina. Todos contribuíram de alguma forma para a existência desse trabalho.

A professora Dr^a Sônia Alves Gouvêa por aceitar meu convite de avaliação da minha qualificação e dissertação, bem como por todos os conselhos e sugestões propostas.

Ao professor Dr. Helder Mauad por aceitar meu convite de avaliação da minha qualificação e dissertação. Além de me permitir fazer uso dos equipamentos de seu laboratório. Não existiria possibilidade de realização desse estudo se não fosse por sua gentileza.

As colegas Andréia e Angelita pelas boas energias transmitidas nos momentos de maior dificuldade.

A todos que acreditaram e torceram pela minha conquista!

“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Oclusão da da artéria descendente anterior esquerda com um fio mononylon 6.0. 40
- Figura 2.** Esquema representativo dos grupos que compõem o estudo.....41
- Figura 3.** Esquema de montagem dos anéis isolados de aorta para reatividade vascular . Biopac Systems utilizado para obtenção de dados..... 43
- Figura 4.** Área de extensão do infarto corado com picrossírius (A e B). Gráfico representativo da análise estatística da extensão do infarto (C).
..... 48
- Figura 5.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta..... 51
- Figura 6.** Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta..... 52
- Figura 7.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina mediante encubação de apocinina, SOD 2 e catalase em anéis isolados de aorta.....53
- Figura 8.** Expressão protéica das enzimas SOD-2, Catalase e gp91phox..... 55
- Figura 9.** Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) “in situ” por Imagens de micrografia representando a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de aorta..... 56
- Figura 10.** Estrutura da enzima NADPH oxidase sendo ativada.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ponderais oito semanas após o treinamento físico.....50

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP – Peptídeo atrial natriurético

ARC - Repressor de apoptose com o domínio de recrutamento de caspas

AT1 -Receptor de Angiotensina II tipo 1

AT2 - Receptor de Angiotensina II tipo 2

BAX – Protein bcl-2-like protein 4 (Proteína de ação apoptótica)

BLC2 – B-cell lymphoma 2 (Proteína de ação anti-apoptóticas)

CK-MB - Isoenzima da creatina fosfoquinase

DCV – Doenças cardiovasculares

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado de endotélio

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ET-1 – Endotelina tipo I

gp22phox – protein 22 phagocyte oxidase

gp91phox - glycoprotein 91 phagocyte oxidase

GPx - Glutathione Peroxidase

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IM – Infarto do miocárdio

IM ef – Animais submetidos ao Infarto do Miocárdio que realizaram o exercício físico.

IM sed - Animais submetidos ao Infarto do Miocárdio que não realizaram exercício físico

MMP – Metaloproteinases de matriz

MnSOD - Superóxido Dismutase Mitocondrial

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - Óxido nítrico

NOX 2- Isoforma da NADPH oxidase

O₂⁻ - Ânio Superóxido

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização mundial de Saúde

OVX – Ovariectomia

PGI₂ -Prostaciclina

Sham sed - Animais submetidos à operação fictícia que não realizam exercício físico

Sham ef - Animais submetidos à operação fictícia que realizaram exercício físico

SOD - Superóxido Dismutase

SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona

SUS – Sistema Único de Saúde

TGF-β – Fator de crescimento tumoral beta

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz

TNF-α – Fator de necrose tumoral

TXA₂ - Tromboxano A₂

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Epidemiologia</i>	<i>16</i>
1.2 <i>Remodelamento Ventricular</i>	<i>17</i>
1.2.1 Morte Celular	18
1.2.2 Síntese e Degradação de Colágeno.....	19
1.2.3 Hipertrofia Cardíaca.....	20
1.2.4 Estresse Oxidativo.....	21
1.3 <i>Influência do Gênero no Processo de Remodelamento Pós IAM.....</i>	<i>23</i>
1.4 <i>Efeitos do Processo de Remodelamento no Vaso Sanguíneo.....</i>	<i>25</i>
1.5 <i>Artéria Aorta.....</i>	<i>26</i>
1.6 <i>O Papel do Exercício Físico.....</i>	<i>27</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>34</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>34</i>
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 <i>Animais Experimentais.....</i>	<i>36</i>
4.2 <i>Procedimentos Experimentais.....</i>	<i>36</i>
4.2.1 Ovariectomia.....	37
4.2.2 Indução do Infarto do Miocárdio.....	37
4.2.3 Treinamento Físico.....	38
4.2.4 Reatividade Vascular em Anéis Isolados de Aorta Torácica.....	39
4.2.5 Coleta de Tecidos, Peso e Armazenamento.....	41
4.2.6 Western Blotting.....	41

4.2.7 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE).....	42
4.2.8. Análises da extensão do infarto.....	43
4.2.9. Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Área de infarto.....	46
5.2 Peso corporal dos tecidos.....	46
5.3 Reatividade Vasculare em Anéis de Aorta.....	48
5.4 Expressão Protéica das Enzimas Antioxidantes e gp91phox.....	51
5.5 Fluorescência Produzida pela Oxidação do Dihidroetídio (DHE).....	53
6 DISCUSSÃO.....	56
6.1 Peso dos Tecidos - Tabela 1.....	56
6.2 Reatividade Vasculare.....	57
6.3 Western Blot e Dihidroetideo.....	63
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

RESUMO

A principal característica da mulher no período pós menopausa é a deficiência dos hormônios ovarianos. Sabe-se que nesse período a mulher se encontra mais susceptível a incidência de doenças cardiovasculares e tem sido observado uma incidência elevada de casos de infarto agudo do miocárdio (IAM). Visando reduzir as taxas de hospitalização e mortalidade das mulheres, o treinamento aeróbico pode ser uma estratégia terapêutica utilizada para reduzir os efeitos deletérios da doença e melhorar a qualidade de vida. Diante disso o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratas ovariectomizadas e infartadas, sobre a perspectiva do sistema antioxidante. Os animais foram submetidos a ovariectomia (OVX) e 7 dias depois foi realizado a indução do IAM ou cirurgia fictícia e em seguida os animais foram divididos em grupos sedentários ou treinados (EF), que iniciaram o treino 15 dias após o IAM e realizaram os treinos por 8 semanas, resultando nos grupos: Controle, OVX+IM, OVX+IMsed, OVX+SHAM e OVX+SHAMef. Ao final do treinamento físico, os animais foram sacrificados e suas aortas foram utilizadas para análise de reatividade vascular, investigação da expressão protéica das enzimas antioxidantes e gp91phox, além das análises da presença do ânion superóxido pela técnica de DHE. Foi demonstrado que o infarto do miocárdio promoveu aumento da contratilidade do vaso e prejuízo no relaxamento. Já o grupo infartado treinado obteve um índice de relaxamento maior que os infartados sedentários, além de um índice menor de contratilidade. Além disso a expressão protéica da gp91phox e o índice de ERO avaliadas pela técnica de DHE, foi aumentada no grupo OVX+IMsed comparado ao OVX+SHAMsed. O resultado de ambos os experimentos foram reduzidos no grupo OVX+IMef comparado ao OVX+IMsed. O presente estudo destaca a importância do treinamento físico como uso terapêutico e com fortes evidências de ser um fator contribuinte no auxílio em proporcionar melhor qualidade de vida pós infarto e menopausa.

Palavras chaves: Menopausa; Infarto do miocárdio; Reatividade vascular ; Treinamento físico; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The main characteristic of women in the postmenopausal period is the ovarian hormones deficiency. It is known that it is the time when the woman is most susceptible to the incidence of cardiovascular diseases. Among the CVDs that most affect women during their lifetime, the acute myocardial infarction (AMI) is highly significant. In order to reduce hospitalization rates and population mortality, aerobic training may be an important therapeutic strategy aimed to reduce the side effects of disease and improving the patients' quality of life. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of exercise training on vascular reactivity in aorta rings of ovariectomized and infarcted rats, from a perspective of the antioxidant system. The animals were submitted to ovariectomy 7 days after induction of AMI or fictitious surgery. Then, the animals were divided into sedentary or trained groups, who started the training 15 days after AMI and performed the training for 8 weeks, resulting in the following groups: Control, OVX+SHAMsed, OVX+SHAMef, OVX+IMsed and OVX+IMef. After the exercise training period, animals were sacrificed and the vascular reactivity was assessed in aorta rings. Investigation of antioxidant protein expression and of gp91phox was made by the western blotting method and the superoxide anion production was evaluated by the dihydroethidium fluorescence (DHE). After AMI there was an increase in vessel contractility and an impairment in the endothelium-mediated relaxation. On the other hand, the group submitted to exercise training showed a higher relaxation compared with the sedentary infarcted rats, in addition to a lower contraction. Moreover, the protein expression of the pro-oxidant protein gp91phox and the superoxide production was higher in the OVX+IMsed group compared to OVX+Shamsed. In infarcted rats, exercise training was able to prevent these changes. The present study highlights the importance of exercise training as a therapy which helps to provide a better quality of life for postmenopausal women.

Key Words: Menopause; Myocardial infarction; Vascular reactivity; Physical training; Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) podem ser compreendidas como as afecções ocorridas no coração e vasos sanguíneos e ocasionam uma média de 17,3 milhões de óbitos por ano no mundo (Mendis et al., 2011). Na Europa os maiores investimentos e avanços da medicina nos últimos anos levaram a uma evolução no tratamento do infarto agudo do miocárdio (IAM), ocasionando uma redução da mortalidade de pacientes com essa patologia (Dégano et al., 2015).

No Brasil a prevaente causa de óbitos também são representadas pelas DCV (Murray et al., 1996). De acordo com o DATASUS, a cada 100.000 brasileiros, 442 morrem por doenças cardiovasculares (Mansur et al., 2002). O impacto dessa problemática na sociedade brasileira pode ser melhor compreendido perante as análises do índice de mortalidade dos últimos anos. Em 2002, a doença arterial coronariana ocasionou 7,2 milhões de óbito no país, representando 43% do índice total de mortalidade. Presume-se que em 2020 esses valores sejam 5 vezes maior, representando altos custos a saúde pública do país (Timerman et al., 2006).

As doenças cardiovasculares representam um percentual exorbitante no total de despesas do sistema único de saúde (SUS) e sistema suplementar de saúde (SSS). Tendo em vista que o número de hospitalizações por infarto agudo do miocárdio tem sido crescente nos últimos anos no Brasil, estima-se que em 2018 serão realizados 100.000 hospitalizações por IAM projetados pelo SUS. Além disso já se estimava que em 2011 os custos diretos do SUS e SSS associado ao IAM seria em torno de R\$ 844.153.164 (Teich et al., 2011).

Visando melhorar a qualidade de vida da população e minimizar o impacto das despesas hospitalares na economia do país, torna-se imprescindível maior adesão as políticas de saúde pública, bem como maiores investimentos na pesquisa, objetivando métodos alternativos que busquem alcançar as metas citadas.

1.2. Remodelamento Ventricular

Mediante alguma lesão cardíaca aguda e/ou crônica carga excessiva de trabalho, o coração pode passar por um processo denominado de remodelamento cardíaco. O remodelamento pode ser compreendido como modificações que ocorrem na estrutura e função do miocárdio, em que alterações moleculares, neuro-humorais e genéticas participam desse processo (Cohn et al., 2000).

O remodelamento cardíaco pode ser fisiológico ou patológico. As modificações cardíacas fisiológicas ocorrem naturalmente ou em resposta das novas necessidades do organismo provocados pelo exercício físico (Diffie et al., 2004). Já a patológica pode decorrer de alguma injúria cardíaca (infarto agudo do miocárdio por exemplo) ou por alguma alteração que possa refletir na função cardíaca, como a hipertensão arterial (Sutton et al., 2000).

No remodelamento cardíaco patológico as primeiras alterações são iniciadas algumas horas após a injúria, e assim diferentes eventos ocorrem ao longo de dias, semanas e meses, resultando em uma modificação estrutural e geométrica no coração em resposta da nova condição de trabalho. Não ocorrendo nenhuma intervenção terapêutica, a evolução do quadro pode culminar na insuficiência cardíaca (Pontes & Leães, 2004).

A etapa inicial é evidenciado pela ativação de mediadores que inclui principalmente a ativação de citosinas, aumento do estresse oxidativo e ativação neuro-humoral (Pontes & Leães, 2004). Nas primeiras horas após o miocárdio isquêmico já se observa morte dos miócitos e aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (Kitano et al., 2016). A produção de noradrenalina, angiotensina II, endotelina 1, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e Factor de necrose tumoral (TNF-alfa), são exemplos de neurohormônios e citosinas que também aumentam nessa fase inicial do remodelamento (Braunwald et al. 2000). Nas próximas horas a dias, perante sustentação dos mediadores citados anteriormente, a área infartada torna-se maior e mais afinada. Tal processo ocorre em aproximadamente metade dos pacientes com IAM, antes do desenvolvimento de uma cicatriz fibrótica (Weisman et al., 1988).

Sutton et al. (2000) descreve que o remodelamento cardíaco pode ser dividido em duas etapas, o remodelamento recente e o remodelamento tardio. As primeiras 72 horas após a incidência do infarto do miocárdio correspondem o período recente. Nessa fase ocorre aumento da área de infarto mediante decomposição de colágeno.

Maior ativação do sistema nervoso simpático, aumento dos níveis de angiotensina II, maior liberação de catecolaminas e aumento da frequência cardíaca também são características dessa fase. Além disso nesse período ocorre um aumento de ANP (peptídeo natriurético atrial) e BNP (peptídeo natriurético cerebral) na tentativa de melhorar o funcionamento da bomba cardíaca. Já o remodelamento tardio abrange mudanças na estrutura e geometria ventricular, visando melhor dispersão da tensão na parede cardíaca. Hipertrofia miocítica também é característica dessa fase de remodelamento, com um uma média de aumento de 70% do volume das células e hipertrofia pela multiplicação de sarcômeros em série, porém com ausência de modificação no comprimento do sarcômero. As principais alterações que ocorrem ao longo de todo o processo de remodelamento estão descritas a seguir.

1.2.1. Morte Celular

Na escassez de Oxigênio na fibra muscular cardíaca, ocorre necrose miocárdica. Com a ocorrência de um IAM, é observado que o pico plasmático daCK-MB (isoenzima da creatina fosfoquinase), que é um biomarcador de lesão cardíaca, ocorre em torno de 16 a 18 horas após a oclusão (Gamarski, 1999). Na isquemia cardíaca, além da necrose, a morte celular também pode ocorrer por apoptose. Todavia, vale ressaltar que a necrose é apontada em estudos como a prevalecte causa de morte celular na fase aguda do IAM (Konstantinidis et al., 2012).

A apoptose pode ser compreendida como morte celular programada e diferentemente da necrose, a apoptose não gera processo inflamatório. Nesse tipo de morte celular ocorre deteriorização do DNA nuclear perante ativação de determinadas moléculas por um planejamento genético (Colucci et al., 2005). O processo de morte celular entre necrose e apoptose são bem distintos. Na apoptose o citoesqueleto da célula é reestruturado e não fragmentado. A célula se retrai e há a produção de corpos apoptóticos que serão posteriormente recolhidos pelos fagócitos, com isso o material presente no interior das células não é eliminado. Já na necrose o conteúdo citoplasmático extravasa, gerando assim um processo inflamatório que atinge outras células. Além disso, a deteriorização de organelas, membrana celular e extermínio dos canais iônicos observados na necrose, não ocorre na apoptose (Bonini et al., 2000).

Algumas das fontes desencadeadoras da apoptose são o aumento de neuro-hormônios circulantes (como angiotensina II e adrenalina por exemplo), aumento das ERO, citocinas pró-inflamatórias (como TNF α), baixos níveis de oxigênio nos tecidos, lesão celular entre outros. Sabendo que todos esses fatores citados estão aumentados após a ocorrência do infarto do miocárdio, compreendemos a significância desse tipo de morte celular em situações de injúria cardíaca (Braunwald et al., 2000).

A inibição da apoptose por vias medicamentosas ainda tem sido questionada, uma vez que, a utilização de determinados fármacos que visam bloquear a ação apoptótica podem desencadear tumores em outros tecidos. A indústria farmacêutica vem estudando vias de sinalização que possam permitir a inibição da apoptose apenas nas células cardíacas, de forma a não afetar outros órgãos. Acredita-se que futuramente tal ação já seja possível e esteja disponível na forma de medicamentos. Betabloqueadores, inibidores da ECA e antagonistas de receptores da angiotensina tem sido utilizados em estudos experimentais mostrando significativa redução da apoptose (Sabbah et al., 2000; Clerk et al., 2003).

1.2.2. Síntese e Degradação de Colágeno

A matriz extracelular é constituída sobretudo por colágeno, cuja produção é controlada pelos fibroblastos. A matriz é responsável pela adesão das células cardíacas, que juntas compõem o miocárdio, além de preservar a estrutura conformacional do ventrículo (Cohn et al., 2002; Spinale et al., 2002). A deteriorização do colágeno constituinte da Matriz extracelular é controlada por um conjunto de enzimas denominadas Metaloproteinases de Matriz (MMP). Essa família proteica é constituída por mais de 20 variedades de MMP que se diferem de acordo com suas diferentes composições, como por exemplo as MMP-1 e MMP-13 que possuem colagenases em sua formação, enquanto MMP-2 e MMP-9 são constituídas sobretudo por gelatinases (Spinale, 2002). Sabendo que as MMP são controladas pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP), a razão TIMP/MMP modula a porção de colágeno da Matriz (Spinale et al., 1999).

O colágeno que inicialmente foi degradado, em seguida passa a ser sintetizado demasiadamente, sobretudo até o 14º dia após a incidência de IAM. A deposição de colágeno contém principalmente colágeno tipo I e tipo III e tal evento é considerado maléfico para o bom funcionamento cardíaco por tornar o coração mais rígido, prejudicando assim a eficiência do bombeamento cardíaco (Mill et al., 2001; Jensen et al., 1990)

Diante de tais conhecimentos é notório que a regulação no desbalanço da razão entre MMP/TIMP pode minimizar os efeitos deletérios do remodelamento cardíaco. Sabendo dos diversos efeitos benéficos que o exercício físico proporciona ao organismo, alguns autores tem investigado a ação da atividade física sobre os parâmetros moleculares que regulam a funcionalidade da função cardíaca. Xu et al. (2008) relatou que o treinamento físico aeróbico iniciado 7 dias após o IAM promoveu um aumento significativo dos níveis de TIMP. E o exercício realizado anteriormente ao insulto cardíaco, ou seja, como método preventivo também resultou na redução da deposição de colágeno, entretanto sem mensurar a influência de TIMP e MMP sobre o resultado (Bozi, 2010). Em seu estudo Chancey et al. (2002) mostrou que a redução de MMP bem como o aumento de TIMP podem ser medidas significativas de minimização dos efeitos deletérios do processo de remodelamento ventricular pós infarto do miocárdio, corroborando com os achados anteriores.

1.2.3. Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca também é um dos resultados que podem ocorrer pelo processo de remodelamento pós IAM. É compreendido pelo aumento do tamanho do coração por espessamento da parede ventricular. Tal evento pode ser acompanhado por aumento ou redução da cavidade cardíaca (Mill et al., 2001; Garcia et al., 2008). A hipertrofia pode ser classificada como hipertrofia concêntrica e excêntrica. A primeira é caracterizada pelo aumento da massa ventricular, deixando a largura da parede do ventrículo maior, porém a dimensão da câmara é reduzida. Esse tipo de modificação da estrutura cardíaca costuma ocorrer em situações de aumento da pós carga. Na hipertrofia excêntrica também existe um espaçamento da parede ventricular porém a cavidade cardíaca também é expandida. Tal condição ocorre sobretudo por aumento

de volume (Weber et al., 1987, Kempf et al., 2004). A classificação da hipertrofia cardíaca como reflexo do processo de remodelamento cardíaco pós IAMé sobretudo a hipertrofia excêntrica patológica, normalmente ocasionada por um sobrecarga volumétrica (Anversa et al., 1985).

O crescimento muscular nessas hipertrofias ocorre por aumento do tamanho do miócito e não por adição de novas células cardíacas. O crescimento do miócito se dá pelo acréscimo de novos sarcômeros dispostos em série, como na hipertrofia excêntrica, ou pela disposição dos sarcômeros em paralelo, representado na hipertrofia concêntrica (Russel et al., 2000).

Além das sobrecargas pressóricas e volumétricas serem grandes fatores para o desencadeamento da hipertrofia cardíaca, algumas substâncias podem contribuir para o desenvolvimento do crescimento cardíaco, como as catecolaminas, citocinas, endotelina-1, estresse oxidativo entre outros. Em contra partida o NO vem sendo apontado como inibidor das vias hipertróficas (Garcia et al., 2008; Matsuoka et al., 1996; Ozaki et al., 2002). Uma dos métodos para elevar os níveis de NO no organismo é através da prática de exercícios físicos, que já vem sendo ressaltada em diversos estudos como medida preventiva e terapêutica contra a hipertrofia cardíaca patológica, pois além da sua influência sobre o NO, o exercício físico proporciona diversos benefícios que podem auxiliar na intervenção da hipertrofia cardíaca. A melhora do sistema antioxidante, redução dos níveis de catecolaminas circulantes, redução da frequência cardíaca basal e melhor funcionamento da bomba cardíaca são alguns exemplos (Braga et al., 2015; Brum et al., 2004, Almeida et al., 2014).

1.2.4. Estresse Oxidativo

O radical livre pode ser compreendido como um átomo que contém o valor ímpar de elétrons em sua camada de valência e são formados mediante reações de óxido-redução, ou seja, doa ou recebe elétrons respectivamente. Podem ser melhor designados como "espécies reativas de oxigênio" por possuírem caráter altamente reativo. Embora sejam resultados de processos biológicos naturais, sua produção demasiada e/ou redução do sistema antioxidante, podem fazer com que esses agentes sejam favorecedores patológicos. Podemos citar como as principais ERO o

radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), Radical hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Oxigênio singlet (1O_2) entre outros (Ferreira & Matsubara, 1997).

Em situações de produção exacerbada das ERO, o programa de defesa busca contrabalancear, mediante ação do sistema antioxidante. Quando ocorre um desbalanço entre o sistema oxidante e antioxidante, em que o último não é suficiente para suprimir a geração das ERO, caracteriza-se o quadro de estresse oxidativo. O sistema antioxidante pode atuar mediante dois tipos de estratégias. Na primeira atuam os antioxidantes que visam desintoxicar o ambiente mediante ação aos agentes danosos e são constituídos pela superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione reduzida (GSH), vitamina E e glutathione-peroxidase (GSH-Px). Já o segundo tipo de estratégia destina-se a reparar os danos ocorridos e são constituídos pelo ácido ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx (Ross et al., 1991; Hebbel, 1986).

A família das superóxido dismutases atuam diretamente contra os efeitos danosos do ânion superóxido. Existem três classificações dessa enzima descritas como SOD 1, SOD 2 e SOD 3. A SOD 1 possui cobre e zinco em sua constituição e pode ser encontrada no componente citoplasmático das células e possui massa molecular de 32.000 Da (Keller et al., 1991). O terceiro tipo enzimático da família (SOD 3) foi a última a ser descoberta e sua massa molecular é 135.000 Da. Foi identificada em plasma sanguíneo de humanos e em líquido cefalorraquidiano (Marklund et al., 1982; Marklund et al., 1986). A SOD 2 é constituída por manganês em sua composição e se encontra presente nas mitocôndrias com peso molecular de 23.000 Da. SOD 2 é fortemente estimulada em diversos tecidos através do aumento de, TNF- α , lipopolisacarídeos (LPS), IFN- γ e interleucinas como IL-1, IL-4 e IL-6 (Masuda et al., 1988; Dougall et al., 1991; Wong et al., 1988; Visner et al., 1990; Harris et al., 1991). Sua ação é com o ânion superóxido, gerando assim H_2O_2 e O_2 (Barra et al., 1984, Weisiger et al., 1973). O H_2O_2 gerado pela ação da superóxido dismutase é então catalisado pela catalase gerando então H_2O e O_2 . Essa enzima pode ser encontrada no fígado, rim, medula óssea, sangue e mucosas e sua ação a NADPH (Scott et al., 1991; Mayes et al., 1990)

Sabe-se que um dos prejuízos que o IAM gera no organismo é o aumento do estresse oxidativo (Silva et al., 2005; Heymes et al., 2003; Keith et al., 1998) e que a insuficiência cardíaca gerada pela isquemia, tem sua gênese diretamente relacionada com o aumento do estresse oxidativo (Yücel et al., 1998; Nakamura et al., 2002). Além disso tem-se observado uma redução do sistema antioxidante em corações de animais submetidos ao infarto do miocárdio (Hill et al., 1997; Usal et al., 1996). Sabendo que o exercício físico modula positivamente o sistema antioxidante (Aguilar & Pinho et al., 2007) acredita-se que o exercício físico pós IAM possa minimizar os prejuízos cardiovasculares que a isquemia produz no processo de remodelamento, e que um dos principais mecanismos seja por uma melhora do sistema antioxidante proporcionada pelo treinamento físico.

1.3. Influência do Gênero no Processo de Remodelamento Pós IAM

As diferenças de gênero acarretam mudanças fisiológicas entre homens e mulheres, podendo promover diferentes alterações no processo de remodelamento. Na avaliação de corações infartados com insuficiência cardíaca nos diferentes gêneros, Guerra et al. (1999) encontrou maior número de células apoptóticas e necrosadas em corações masculinos e sugeriu que a regulação da via apoptótica é influenciada pelos gêneros. Estudo semelhante foi realizado por Biondi-Zoccai et al. (2005) que constatou que o índice apoptótico em área infartada de tecido cardíaco foi maior em homens que em mulheres. Os resultados foram associados a maior expressão da Bax (proteína pró-apoptótica).

Sabe-se que tanto a necrose quanto a apoptose são alguns dos elementos da isquemia cardíaca (Konstantinidis et al., 2012). Todavia o último fator tem sido abordado nos estudos com maior frequência, pois o mesmo parece desempenhar maiores contribuições no processo de remodelamento cardíaco (Eefting et al., 2004). Estudos relacionando a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em corações infartados tem sido mais evidenciado, buscando melhorar as investigações da influência da via apoptótica no processo de reestruturação cardíaca pós infarto do miocárdio nos diferentes gêneros. Ambas as proteínas são constituintes da via mitocondrial de morte celular programada. Entretanto as proteínas desempenham funções controversas,

sendo a Bax uma proteína pró-apoptótica e a Bcl-2 anti-apoptótica (Yin et al., 2003). Visando melhor compreensão dessa via apoptótica nos distintos gêneros, Bouma et al. (2010) analisou a isquemia em coração de coelhos machos e fêmeas em idade reprodutiva. Constatou que o tamanho da área de infarto foi menor em fêmeas na pré-menopausa comparada a machos. Todavia com a retirada dos hormônios ovarianos pela ovariectomia, tal diferença foi disseminada entre os gêneros. A hipótese de que os níveis de Bcl-2 e Bax fossem os principais responsáveis por esses resultados não foi constatada, divergindo-se de outros resultados na literatura. De acordo com o estudo, a expressão de ARC (Repressor de apoptose com o domínio de recrutamento de caspase) se encontrava significativamente aumentada em fêmeas com normalidade dos níveis hormonais. Sugerindo assim que o estrogênio endógeno possui efeito cardioprotetor, pois a expressão de ARC no miocárdio parece ser estrogênio dependente.

Um conjunto de evidências tem sugerido que o sexo masculino favoreça prejuízos mais severos na função cardíaca provocados pelo IM. Em seus achados Cavasin et al. (2003) mostrou que o índice de mortalidade pós IM em animais machos foi superior aos dados das fêmeas. Além disso, redução na fração de ejeção e aumento na deposição de colágeno contribuíram para esses dados. Algumas investigações sugerem que o esteróide masculino possa aumentar o risco de doenças cardiovasculares pela hipótese de que esse hormônio possa prejudicar os níveis de lipídio plasmático e o perfil de lipoproteínas (Adams et al., 1995; Melchert et al., 1995). Le et al. (2013) Relatou que a testosterona tem apresentado influencia positiva sobre a extensão da área de infarto em modelo animal, e já é bem estabelecido que com a redução da área de tecido necrosado pela isquemia, os impactos da lesão cardíaca são atenuados. Nessa perspectiva, os hormônios sexuais tem sido apontados como principal fator de influência nas diferenças do remodelamento cardíaco entre os gêneros. Porém, nesse mesmo estudo, os autores observaram que apesar do estrogênio em fêmeas reduzir a apoptose, em animais machos tratados com estradiol os resultados foram opostos das mesmas. Evidenciando que outros fatores, além dos diferentes níveis hormonais podem influenciar nas diferenças do processo de remodelamento entre os gêneros.

1.4. Efeitos do Processo de Remodelamento no Vaso Sanguíneo

Os vasos sanguíneos podem sofrer influências negativas de cardiopatias, bem como patologias no sistema circulatório podem refletir no funcionamento da bomba cardíaca. Dentre as afecções que podem atingir os vasos sanguíneos, induzida ou não por uma doença cardíaca pré-estabelecida, a disfunção endotelial é uma das mais investigadas e pode ser compreendida como uma síntese irregular dos fatores endoteliais, em que a escassez ou superprodução desses determinados fatores podem alterar a agregação de plaquetas, os efeitos coagulatórios e sobretudo a tonicidade do vasos sanguíneos. O óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF), endotelina 1 (ET-1), tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina 2 (PGL₂) são alguns exemplos das substâncias derivadas do endotélio. O aspecto mais estudado da disfunção endotelial é a redução na biodisponibilidade de NO que pode promover prejuízos no relaxamento derivado do endotélio (Mombouli et al., 1999, Carvalho et al., 2006).

Sabe-se que aumento do estresse oxidativo é um dos efeitos provocados pelo IAM. A NADPH oxidase é uma das principais fontes formadoras de ERO, sendo a subunidade NOX2 (ou gp91phox) a mais presente no miocárdio (Lassègue et al., 2012). Mas além do miocárdio a NOX2 também se encontra presente nas células endoteliais, que parece estar envolvida sobretudo com os efeitos de fibrose miocárdica no processo de remodelamento cardíaco (Murdoch et al., 2014). Em um estudo recente Sirker et al. (2016) mostrou que ambas as fontes estão envolvidas na regulação do remodelamento, porém a subunidade presente no miocárdio apresenta maior influência sobre o processo de remodelamento.

Em sua revisão Evora et al. (1996) já destacava que um dos efeitos mais danosos ocasionados pela isquemia-reperfusão são os prejuízos no relaxamento, sobretudo o relaxamento dependente de endotélio. O mesmo foi referenciado por McAfee et al. (1990), que destacou o endotélio vascular como tecido mais suscetível as injúrias da isquemia-reperfusão antes mesmo do músculo liso. A hipótese para o prejuízo no relaxamento dependente de endotélio advém da redução dos fatores de relaxamento derivado de endotélio (FRDE) e prostaciclina. Sabendo que ambos inibem a agregação plaquetária, a adesão de plaquetas aumentam com isquemia-reperfusão (Pearson et al., 1990; Pearson et al., 1990). As plaquetas aderidas liberam elementos

vasoconstritores no músculo liso, ocasionado em espasmo no vaso sanguíneo (Feinberg et al., 1982). Estudos apontam que o prejuízo no relaxamento derivado de endotélio em função da isquemia-reperfusão ocorra provavelmente por alteração da proteína G, que por sua vez se liga a receptores que promovem a produção de FRDE nas células endoteliais. A hipótese advém por contatar que o prejuízo do relaxamento é ocasionado por mediadores que atuam através de receptores e que o fluoreto de sódio atuante através da proteína G se encontra danificado. Em contrapartida o ionóforo de cálcio (A23187) consegue promover o relaxamento e o mesmo não é dependente de receptores (Seccombe et al., 1994; Evora et al., 1994). Sendo assim, os antiplaquetários já vem sendo indicado como medida de tratamento após a incidência de infarto do miocárdio. A aspirina é o fármaco dessa linha mais prescrito, sendo contra indicado apenas para pacientes que possuem hipersensibilidade a alguns dos componentes do mesmo e/ou pacientes acometidos por gastrite ou úlcera. Ticlopidina e Clopidogrel também são antiplaquetário indicados, porém em menor proporção. Além disso o triflusal e o trapidil vem sendo investigado como alternativas de substituição da Aspirina, entretanto ainda não se tem dados comprobatórios suficiente para a utilização dos mesmo (Avezum et al., 2004).

1.5. Artéria Aorta

A artéria aorta é maior que as demais artéria do corpo humano e seu papel principal é transportar o sangue arterial para os tecidos. É classificada como artéria elástica possuindo paredes com alta capacidade de se distender devido a significativa presença de elastina na túnica média, se expandido na sístole e retomando sua condição natural durante diástole. O colágeno também se encontra presente na artéria e evita que a mesma se expanda além dos limites de normalidade. Por ser uma vaso de condutância de pequena área de secção transversa total, a velocidade do fluxo sanguíneo é muito elevada (Aires, 2012; Constanzo et al., 2014)

Muitas patologias cardíacas podem resultar em processo de remodelamento vascular. Sabe-se por exemplo que a hipertensão arterial induz ao aumento de colágeno nas artérias aortas, resultando maior rigidez aos vasos (Kurjiaka et al., 2005; Aars, 1968). Já os efeitos do infarto do miocárdio sobre o remodelamento histológico

da artéria aorta ainda não são bem definidos mas podemos pressupor que alterações histológicas podem levar a uma mudança na característica do vaso podendo o mesmo se tornar mais distensível ou rígido. Tais modificações podem alterar o funcionamento adequado do fluxo sanguíneo, tendo em vista que a artéria aorta é um vaso de condutância.

1.6. O Papel do Exercício Físico

Sabe-se que um dos prejuízos que o IAM gera no organismo é o aumento do estresse oxidativo, como já foi citado (Silva et al., 2005; Heymes et al., 2003; Keith et al., 1998) e que a insuficiência cardíaca gerada pela isquemia, tem sua gênese diretamente relacionada com o aumento do estresse oxidativo (Yücel et al., 1998; Nakamura et al., 2002). Além disso tem-se observado uma redução do sistema antioxidante em corações de animais submetidos ao infarto do miocárdio (Hill et al., 1997; Usal et al., 1996). Sabendo que o exercício físico modula positivamente o sistema antioxidante (Aguilar & Pinho et al., 2007) acredita-se que o exercício físico pós IAM pode minimizar os prejuízos cardiovasculares que a isquemia produz no processo de remodelamento, e que um dos principais mecanismos seja por uma melhora do sistema antioxidante proporcionada pelo treinamento físico. Isso porque o exercício físico ocasiona aumento do consumo de oxigênio no decorrer da prática e algumas horas após o término, levando a um aumento da produção de radicais livres (Rowlands et al., 2000; Schneider et al., 2004). Entretanto, há um aumento na produção de enzimas antioxidantes como mecanismo compensatório, destacando a SOD e CAT como as principais envolvidas (Davies et al., 1982; Powers et al., 1999).

Ao investigarmos as técnicas de reabilitação cardíaca do passado (incluindo procedimentos pós operatórios, tratamento medicamentos e restrições em geral) verificamos que após a ocorrência de um IAM o repouso era procedimento fundamental, podendo chegar à 60 dias de inatividade. Mediante tais procedimentos o paciente encontrava-se impossibilitado de retornar as suas atividades rotineiras após a alta hospitalar. Visando beneficiar a qualidade de vida dos pacientes, foi introduzido o programa de reabilitação cardíaca, que visa não apenas melhorar a qualidade de vida dos pacientes com o retorno de suas atividades habituais mas

também com a introdução de prática sistematizada de exercícios físicos (Brown, 1964; Araújo et al., 2004).

Antes de uma apresentação sobre o modelo de exercícios sugerido neste estudo para a reabilitação cardíaca de IAM, faz-se necessário uma maior abordagem das alterações fisiológicas proporcionada pelo exercício físico e pelos diferentes modelos de atividade física. Em geral, a prática de atividade física (não especificando aqui uma única modalidade), provoca estresse no funcionamento do organismo com mais consumo e requisição de energia, que acarreta em aumento da temperatura corporal e outras alterações. Tal estado propicia mudanças nas características químicas dos componentes circulatórios e no músculo. Quando este estado é reincidido ao longo dos dias com a prática sistematizada de exercício físico, alterações morfofuncionais são presentes sobretudo no sistema cardiovascular, muscular esquelético e pulmonar. Uma vez estabelecido as alterações crônicas, o exercício necessita ser intensificado visando novas ou maiores alterações (Moraes et al., 2005).

As atividades físicas podem ser diferenciadas em três tipos de acordo com as exigências energéticas utilizada pelo músculo. A primeira pode ser descrita como anaeróbica alática ou sistema ATP-CP em que se utiliza a fonte de fosfagênios para produção de ATP. Atividades de característica explosiva e a fase inicial de exercícios de alta intensidade são representadas por essa fonte energética. O segundo é descrito como anaeróbica láctica, onde a obtenção de energia ocorre através da glicólise e há formação de ácido láctico. Exercícios resistidos como a musculação é um dos exemplos. E o último é descrito como atividade aeróbica em que necessita do oxigênio para a formação de energia e podemos citar como exemplo atividades de dança e corrida (Gastin, 2001).

Entre as adaptações fisiológicas que o exercício aeróbico proporciona ao indivíduo praticante, tanto a frequência cardíaca quanto a pressão arterial tem redução dos seus níveis basais e durante a prática de exercício. Além disso a um aumento do débito cardíaco, débito sistólico e melhora da tolerância à acidose no músculo. Esses aspectos em comunhão elevam o VO₂ máximo (Moraes et al., 2005).

Espera-se que os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico possam também melhorar os parâmetros cardiovasculares de indivíduos acometidos por alguma DCV. Um estudo de metanálise intitulado por ExTraMATCH, avaliou o efeito do exercício

aeróbico realizado por 8 semanas em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e conclui-se que o treinamento físico reduziu significativamente o número de óbitos e de internações em contrates ao grupo que não participou da intervenção (Piepoli et al., 2004). De acordo com o documento de Normatização dos equipamentos etécnicas da reabilitação cardíaca supervisionada , usualmente as prescrições do treinamento variam entre três a cinco vezes na semana, com duração de minutos até 2 horas de atividade por sessão. E em casos de eventos coronarianos agudos, indica-se que o treinamento físico seja iniciado nas primeiras sessões após a ocorrência do evento cardiovascular (Carvalho et al., 2004).

A literatura vem evidenciando que o treinamento físico aeróbico proporciona benefícios no funcionamento cardiovascular de pacientes saudáveis bem como os indivíduos acometidos por DCVs. Contudo é de suma importância destacar que os treinamentos aeróbicos podem variar muitos de uma prescrição para outra, tendo em vista que o início de treinamento, frequência semanal, intensidade do exercício, tempo de exercício, duração total do programa de treinamento e tipo de atividade física são variáveis que podem alterar significativamente os resultados dos efeitos ocasionados pelo treinamento físico. Por esta razão torna-se necessário a existência de diferentes acervos de treinamento aeróbico em diversas variações para melhor se compreender o grau de influência de cada variável no treinamento físico e assim realizar a prescrição de um programa de treinamento físico na reabilitação cardiovascular mais preciso de acordo com as necessidades. Diante dessa necessidade discorreremos a seguir diferentes variações de treinamento físico em sujeitos com patologias cardiovasculares que se encontram em maior volume na literatura.

Vona et al. (2004) avaliou o efeito do treinamento aeróbico por 3 meses sobre a disfunção endotelial em pacientes pós IAM. Iniciando o treinamento 3 semanas após o evento cardíaco, com frequência semanal de 3 vezes, duração de 1 hora por sessão e intensidade moderada, conclui-se que tal prescrição foi importante para reduzir a perda da vasodilatação dependente de endotélio proporcionada pelo IAM. Além disso com 1 mês de inatividade os benefícios proporcionados pelo programa de treinamento foram perdidos. Braith et al. (1999) manteve a intensidade do exercício aeróbico mais elevada em pacientes que realizaram treinamento após IAM, sendo classificada de moderada a alta intensidade (tendo em vista que foi realizado aumento progressivo da velocidade ao longo das semanas) e manteve o treino por 16 semana de duração

e frequência de 3 vezes/semana. Alcançando assim níveis reduzidos de Angiotensina II, aldosterona e vasopressina no plasma, o que pode acarretar em melhora na função vascular tendo em vista que todos possuem característica vasoconstrictora. Similramente, Myers et al. (2001) manteve a mesma intensidade e duração do exercício, aumentando apenas a frequência semanal para 5 vezes e finalizando o protocolo de treino em 2 meses e observou que tal modelo de treino não proporcionou melhor recuperação do débito de oxigênio como era esperado. Continuamente outros diversos autores realizaram a investigação do treinamento físico aeróbico de moderada a alta intensidade e obtiveram respostas positivas sobre os parâmetros funcionais cardíacos (de Waard et al., 2007; Hashimoto et al., 2004; Marchionni et al., 2003; Rovere et al., 2002; Xu et al., 2008; Yengo et al., 2012; Zheng et al., 2008).

Observamos que a literatura possui grandes evidências dos benefícios do treinamento físico aeróbico na função cardíaca de coração infartados mas pouco se sabe dos benefícios da atividade física sobre a função vascular pós IAM. Além disso a maior parte dos estudos realizaram atividade física de moderada a alta intensidade, mas ainda não é conhecido os efeitos do treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade, sobre a função vascular de ratas infartadas e ovariectomizadas.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A principal característica da mulher no período pós menopausa é a deficiência dos hormônios ovarianos. Sabe-se que nesse período a mulher se encontra mais susceptível a incidência de doenças cardiovasculares tendo em vista os efeitos cardioprotetores proporcionados pelo estrogênio (Fernandes et al., 2008).

Entre as DCVs que mais incidem nas mulheres nesse período da vida o IAM possui alta significância, Nesse contexto, a caracterização de fatores que propiciam o

IAM associado a redução dos hormônios ovarianos constituem mecanismos importantes na regulação da circulação.

Visando reduzir as taxas de hospitalização e mortalidade da população estudada, o treinamento aeróbico pode ser uma estratégia terapêutica que vise reduzir os efeitos deletérios da doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Além disso não há estudos que visem elucidar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a função vascular de seres acometidos pelo IAM em período de redução significativa dos hormônios estrogênicos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a reatividade vascular aórtica de ratas ovariectomizadas e infartadas.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar a reatividade vascular aórtica em resposta as concentrações crescentes de Fenilefrina e Acetilcolina
- ✓ Analisar a reatividade vascular aórtica em resposta as concentrações crescentes de fenilefrina mediante ação das enzimas Superóxido Dismutase 2, Catalase e Apocinina;
- ✓ Analisar a expressão da gp91phox (subunidade da NADPH oxidase) em aorta
- ✓ Analisar as respostas do treinamento físico sobre a expressão das enzimas do sistema antioxidantes, Superóxido Dismutase (SOD 2), Catalase (CAT)
- ✓ Analisar a produção de O_2 pela técnica de Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE)
- ✓ Avaliar tamanho da área de infarto e deposição de colágeno

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais Experimentais

Esse estudo utilizou ratas da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), entreito a dez semanas de idade, pesando entre 180-230 gramas. Os animais foram separados aleatoriamente em 5 grupos, que passaram por diferentes procedimentos que serão descritos detalhadamente nos tópicos seguintes. Os grupos são: OVX+SHAM, OVX+SHAMef, OVX+IM, OVX+IMef e Controle. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES), e foram dispostos em gaiolas coletivas contendo até cinco ratas por gaiola, com acesso livre à água e comida. A temperatura do ambiente foi mantida entre 22°C e 24°C e respeitou-se o ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas. O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Animais do Centro de ciências da saúde UFES (protocolo nº 059/2012), e todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, seguindo todos os padrões e procedimentos de biossegurança.

4.2. Procedimentos Experimentais

- Ovariectomia;
- Indução de infarto do miocárdio;
- Treinamento físico (oito semanas);
- Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta;
- Coleta de Tecidos, Peso e Armazenamento;
- Análise através da técnica de Western Blotting em anéis de aorta da expressão da gp91phox (subunidade da NADPH oxidase), bem como a expressão das enzimas do sistema antioxidante Superóxido Dismutase 2 e Catalase;
- Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)
- Análises da extensão do infarto

4.2.1. Ovariectomia

A ovariectomia foi efetivada conforme a técnica de Irigoyen et al., (2005). Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) e após confirmação da efetividade da anestesia pela ausência do reflexo da córnea, os mesmos foram colocado em decúbito lateral com fixação dos membros inferiores e superiores para maior estabilização do animal, facilitando assim a continuação dos procedimentos cirúrgicos. Foi realizado em seguida uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular. O ovário foi exteriorizado e removido mediante ligadura da tuba uterina. Em seguida, foi realizado uma sutura no músculo e na pele para uma cicatrização adequada. Todo o procedimento descrito foi realizado em ambos os lados.

4.2.2. Indução do Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio foi realizado sete dias após a ovariectomia por oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, conforme a técnica descrita por Baldo et al.(2012). Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de ketamina (50mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10mg/kg, BAYER, BRASIL) e a efetividade da anestesia foi confirmada por reflexo da córnea. Os animais foram colocados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal e tiveram seus membros superiores e inferiores fixados a mesa para maior estabilização do animal durante o procedimento cirúrgico. Foi realizado uma tricotomia na região do tórax e após assepsia foi feito uma incisão na pele e dissecação dos músculos intercostais. Uma sutura em forma de uma bolsa foi preparada visando o rápido fechamento da incisão cirúrgica após a ligadura da coronária. Após os procedimentos iniciais, uma incisão lateral no nível do quarto espaço intercostal foi realizada para exposição do coração. O coração foi exteriorizado e a artéria coronária descendente anterior esquerda foi permanentemente ocluída, usando um fio de mononylon 6.0 montado em agulha não traumática (Medical Line). Após a oclusão, o tórax foi imediatamente fechado com a sutura em bolsa previamente preparada. Os animais que necessitaram, receberam ventilação mecânica feita com máscara de borracha aplicada diretamente sobre os orifícios nasais. Os grupos de

animais (OVX+Sham ef e OVX+Sham sed) foram submetidos ao procedimento de cirurgia fictícia, que consiste na aplicação de todos os passos descritos anteriormente, exceto a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. Após o procedimento cirúrgico os animais recebem uma injeção de antibiótico Enrofloxacina – 2,5% (10 mg/Kg, Vencofarma, Brasil) por via intramuscular.



Figura 1: Oclusão da artéria descendente anterior esquerda com um fio mononylon 6.0. Fonte: Almeida et al. (2014).

4.2.3. Treinamento Físico

O treinamento de corrida foi realizado em uma esteira elétrica (EP 131, Insight equipment, Research and teaching, BRASIL), com início duas semanas após a indução do infarto do miocárdio. Os grupos OVX+IMef e OVX+Shamef realizaram 8 semanas de treinamento físico, com 60 minutos de duração e frequência de 5 vezes na semana. A primeira semana consistiu em um período de adaptação onde os animais iniciaram a corrida com intensidade de 3 metros/segundos e duração de 10 minutos. A duração do treinamento foi aumentado progressivamente ao longo dos dias até que no 5º dia os animais alcançaram a duração de 60 minutos na mesma velocidade inicial. A velocidade foi aumentada a cada 2 semanas e consistiu em uma escala de velocidade de 3m/s, 6m/s, 9 m/s e 12m/s respectivamente.

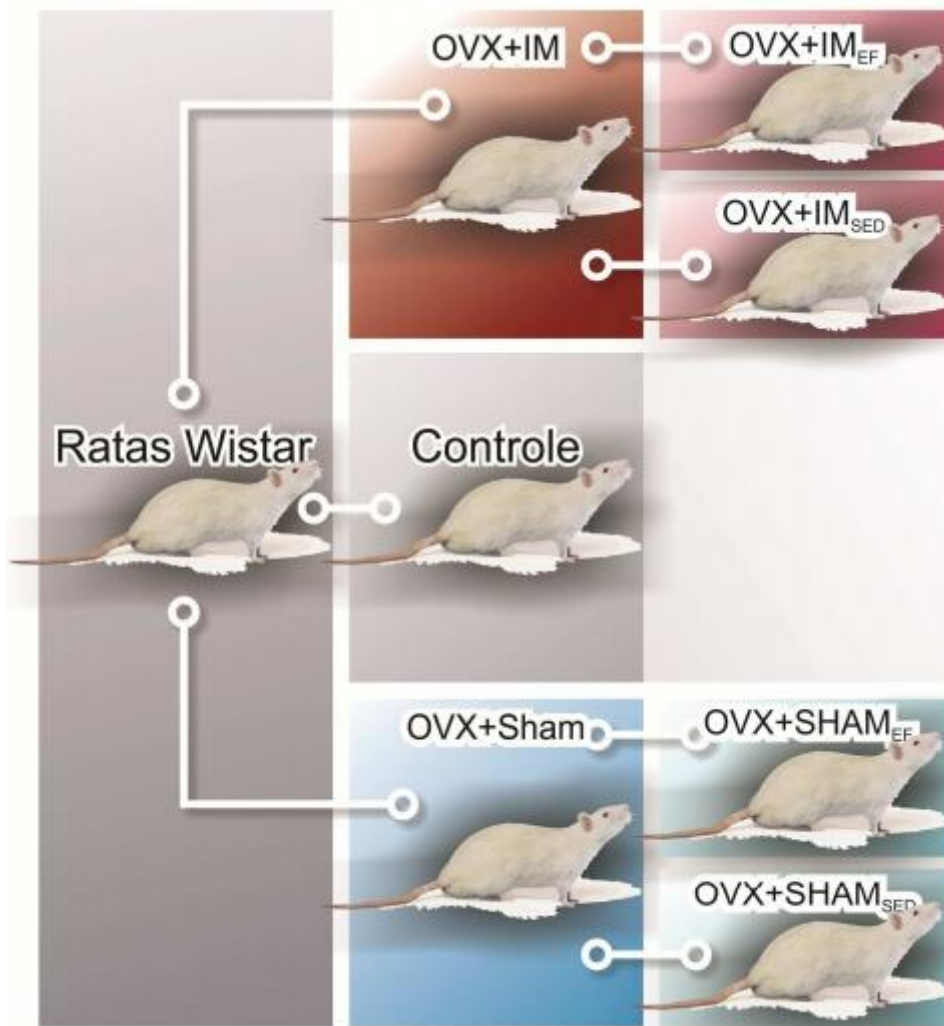


Figura 2: Esquema representativo dos grupos que compõem o estudo. Fonte: Almeida et al. (2014).

4.2.4.Reatividade Vascular em Anéis Isolados de Aorta Torácica

Os animais foram sacrificados pela técnica de decapitação pelo uso da guilhotina. Em seguida, o tórax dos animais foram abertos, removendo a aorta torácica descendente que foi colocada imersa em solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; K₂HPO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; glicose 5,5 aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. O tecido conectivo e adiposo foi retirado cuidadosamente e a artéria foi dividida em quatro segmentos cilíndricos de aproximadamente 3,5 a 4 mm de comprimento. Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica. Dois fios de aço

inoxidável em forma de triângulos foram passados através do lúmen dos segmentos posicionando-se paralelamente na luz do vaso. Um dos triângulos foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. As modificações no diâmetro do vaso foram registrados pelo transdutor de força conectado a um sistema de aquisição de dados e a um computador. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 grama, reajustada, quando necessário, durante o período de 45 minutos de estabilização. Os anéis foram então contraídos com Cloreto de Potássio - KCl (concentração de 100 mM) até a obtenção de respostas reproduzíveis. Após lavar e obter novamente os valores basais estáveis os anéis foram contraídos com fenilefrina 10^{-4} M e relaxados com uma concentração de acetilcolina de 10^{-2} M para testar a integridade endotelial. Nesse momento, depois de retornar ao valor basal, foi iniciado o protocolo de reatividade, onde foi realizado uma curva dose-resposta de relaxamento com a acetilcolina em dosagens crescentes (mediante pré-constricção com fenilefrina 10^{-4} M) e curva dose-resposta de contração com Fenilefrina em doses crescentes. O sistema antioxidante foi avaliado repetindo a contração com fenilefrina citada anteriormente porém em vasos diferentes que receberam 30 minutos antes as enzimas superóxido dismutase, catalase e apocinina.

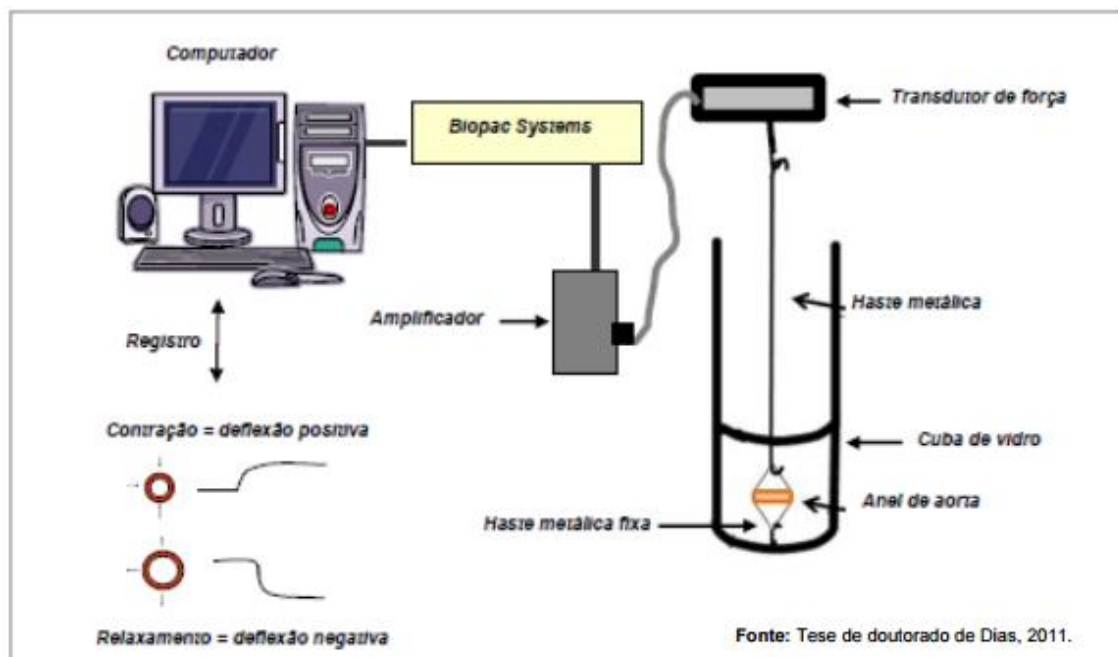


Figura 3:Esquema de montagem dos anéis isolados de aorta para reatividade vascular .Biopac Systems utilizado para obtenção de dados. Modificado de Dias, 2007.

4.2.5. Coleta de Tecidos, Peso e Armazenamento

Após o sacrifício os respectivos tecidos foram coletados e pesados: Gordura retro peritoneal, Gordura parametrial, gordura mesentérica, glândula adrenal, útero e pulmão, sendo que o último realizou peso úmido e seco. Para o peso seco o pulmão permaneceu 24 horas em uma estufa em temperatura de 98°C.

Também foram coletados corações e armazenado em formol. Além da coleta de artéria aorta e músculo sóleo que serão armazenados em freezer -80°C.

4.2.6. Western Blotting

A análise da expressão protéica foi determinada pelo método de Western Blotting. As amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise contendo (em mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCL, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ mais inibidor de protease (Sigma Fast: Sigma). A concentração proteica foi determinada pelo método de (Lowry & Rosebrough, 1951) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Quantidades iguais de proteína (50 µg), foram submetidas à eletroforese (2:30 h a 80V) em gel de 40 poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) durante período de 1:40 - 2:30h a 60V em um sistema de blotting úmido. Após a transferência, foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T + leite 5% (molico desnatado) por 2:30 horas e em seguida lavada por 3 vezes com TBS-T por 5 minutos seis vezes. As membranas foram incubadas por 4 horas com anticorpos monoclonais de rato para a catalase (CAT; 1:2000; Sigma fast, EUA), os anticorpos policlonais de coelho para superóxido dismutase (SOD-2; 1:500; Sigma rápidos, USA) e gp91phox (1:1000; BD, New Jersey, EUA) e anticorpos policlonais de coelho para AT1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Após a lavagem das membranas com TBS-T, as mesmas foram incubadas com anti-mouse IgG (1:3000, Inc. Abcam, Cambridge, MA, EUA) ou um anti-rabbit (1:7000; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). As bandas foram visualizadas usando um sistema de NBT / BCIP (Invitrogen Corporation, CA, EUA) e

quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Health, NIH). As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão β -actina utilizando um anticorpo monoclonal de mouse para β -actina (1:5000; Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (β -actina).

4.2.7. Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)

Para verificar a influência dos tratamentos sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$, a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE) foi utilizada como ensaio. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\bullet-}$, oxida-se e, posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência detectada pelo filtro vermelho. Este método permite uma análise da produção “in situ” tecidual. Os segmentos de aorta foram isolados, e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento, Tissue Tek-OCT). As amostras foram mantidas a $-80^\circ C$ até o dia do experimento.

Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com $8 \mu m$ de espessura. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de $CaCl_2$, 759 mg de $NaCl$, 41,7 mg de KCl , 4,9 mg de $MgCl_2$, 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida a $37^\circ C$. Decorridos os 30 minutos, o Krebs será escoado e o excesso seco. Em seguida, será realizada incubação com DHE por duas horas na estufa com câmara fechada a $37^\circ C$.

A luminescência emitida foi visualizada com microscópio de fluorescência confocal (Leica 2500 DM) e câmera fotográfica (NIKON digital sigth DS-U2) com filtro de fluorescência para DHE (vermelho). O etídeo unido ao núcleo das células será visualizado com $\lambda_{exc} = 585 \text{ nm}$ e detectado com $\lambda_{em} = 600-700 \text{ nm}$. As imagens serão quantificadas pelo programa NISS Element - BR. A intensidade do sinal no interior da camada média foi analisada em toda a circunferência das três seções do vaso por um mesmo investigador.

4.2.8. Análises da extensão do infarto

Após o sacrifício dos animais os corações foram lavados em água destilada e armazenados em formol. Para as análises histológicas, os corações foram divididos em 3 cortes transversais: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. Em seguida o anel mediano foi armazenado em cassete histológico e a imersão do material foi realizada em xilou e etanol. Após os banhos foi realizado a inclusão das amostras em parafina histológica a 60° C.

Na microtomia, foram feitos cortes transversais de 6 µm de espessura. Uma média de 5 secções foram obtidos e montados em lâminas de vidro para coloração.

A determinação da área de infarto foi realizada mediante coloração com Picrosiriusred nos cortes histológicos. As medidas foram realizadas após digitalização das imagens por scanner e avaliação pelo programa Image J. O tecido cicatrizado no ventrículo esquerdo, observado mediante diferença de coloração foi selecionado para determinar a área de infarto

O cálculo da região infartada foi feito pela média do infarto interno e externo. O infarto interno foi obtido pela razão entre a região infartada no endocárdio e área total do endocárdio. O infarto externo foi obtido pela razão entre a área infartada do epicárdio e a área total de tecido epicárdico. Para uma melhor padronização dos dados, a área de infarto foi calculada pela média da avaliação morfométrica de 5 cortes histológicos de cada animal, com um intervalo mínimo de quatro cortes entre cada leitura.

4.2.9. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Para o estudo da reatividade vascular de anéis de aorta foi realizado a ANOVA de duas vias. Para os demais experimentos, foi feito análise de variância (ANOVA) de uma via. Seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey O índice de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Área de Infarto

Como descrito nos relatos procedimentais a indução de infarto do miocárdio foi realizada de maneira manual pela oclusão da artéria. Para confirmar a efetividade cirúrgica, os corações passaram por procedimentos histológicos que avaliaram o percentual da área infartada do coração. As figuras 4 A e 4 B apresentam mediante coloração com tricrossírius a extensão de infarto. Como observado na figura os animais de ambos os grupos indicaram área de infarto acima de 40% do tecido cardíaco.

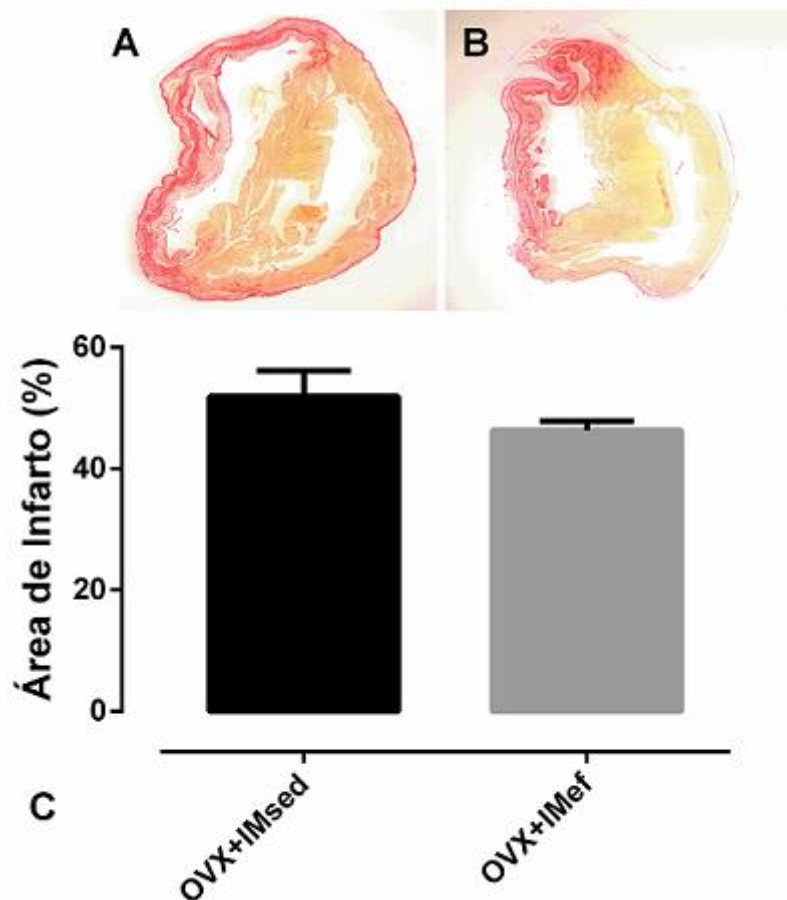


Figura 4. Área de extensão do infarto corado com picosírius (A e B). Gráfico representativo da análise estatística da extensão do infarto (C) . Dados são expressos como média \pm EPM (n = 5 e 4) respectivamente. Teste t de student para amostras independentes.

5.2. Peso Corporal dos Tecidos

Conforme apresentado na tabela 1, os grupos OVX+SHAMsed, OVX+shamef, OVX+IMsed e OVX+IMef apresentaram peso do útero significativamente menor que o grupo controle. Tal resultado já era esperado, uma vez que todos os grupo exceto o grupo Controle passaram pelo procedimento cirúrgico de ovariectomia que ocasiona atrofia do útero e conseqüentemente redução de peso do mesmo. Tal resultado reflete a efetividade da cirurgia e da condição estrogênica intencionada no estudo. Diversos autores corroboram com os resultados (Almeida et al., 2014; Claudio et al., 2013;). Os mesmos grupos que tiveram redução do peso do útero (animais ovariectomizados) apresentaram aumento de peso corporal final comparados ao grupo controle. Além do peso corporal final, as gorduras retroperitoneal, parametrial e mesentérica foram pesadas separadamente. O infarto do miocárdio promoveu redução do

armazenamento de gordura retroperitoneal, uma vez que todos os grupo não infartados se diferenciaram do grupo OVX+IMSed. Já a gordura parametrial no grupo OVX+IMSed mostrou-se reduzida apenas comparada aos animais controle. Em contra partida ambos os grupo apresentaram pesos semelhantes da gordura mesentérica, sendo significativamente reduzidos em comparação ao grupo OVX+SHAMsed. Ao somar os três tipos de gordura contatamos que os animais Controle e OVX+SHAMsed acumularam mais gordura que os animais OVX+IMSed.

Os pulmões foram pesados úmidos (imediatamente após o sacrifício do animal) e seco (após 24 horas na estufa). O peso úmido foi significativamente aumentado no grupo OVX+IMSed comparado aos animais não infartados. Entretanto o peso seco não se diferenciou entre os grupos. Por fim, os rins e adrenais tiveram seus pesos inalterados entre os grupo.

Tabela 1. Parâmetros ponderais oito semanas após o treinamento físico

	Controle	OVX+SHAM sed	OVX+SHAM ef	OVX+IM sed	OVX+IM ef
Peso corporal final (g)	276 ± 9,36	322 ± 16,59 *	311 ± 10,44 *	306 ± 11,08 *	305 ± 6,00 *
Útero (g)	0,794 ± 0,076	0,149 ± 0,036 *	0,159 ± 0,037 *	0,090 ± 0,008 *	0,110 ± 0,013 *
Pulmão úmido (g)	1,318 ± 0,071 #	1,426 ± 0,113 #	1,346 ± 0,060 #	1,716 ± 0,166	1,851 ± 0,180
Pulmão seco (g)	0,309 ± 0,026	0,311 ± 0,017	0,314 ± 0,018	0,406 ± 0,041	0,414 ± 0,030
%água no pulmão	75 ± 2,00	76 ± 0,719 #	76 ± 0,963 #	74 ± 1,491 *	76 ± 0,720 *
Gordura retroperitoneal(g)	7,62 ± 1,05 #	10,30 ± 1,90 #	7,30 ± 1,51 #	5,85 ± 0,66	4,60 ± 0,51
Gordura parametrial (g)	7,72 ± 0,63	7,92 ± 1,16	6,89 ± 0,83	7,52 ± 1,28	5,52 ± 0,53 *
Gordura mesentérica (g)	3,79 ± 0,31 \$	5,42 ± 0,76	4,27 ± 0,58	4,48 ± 0,46	3,78 ± 0,32 \$
Gordura total (g)	19,12 ± 1,54 #	23,66 ± 3,53 #	18,48 ± 2,40	17,86 ± 1,81	13,74 ± 1,22
Rim esquerdo (g)	0,8176 ± 0,033	0,8851 ± 0,015	0,8341 ± 0,033	0,8074 ± 0,025	0,8178 ± 0,026
Adrenal (g)	0,0364 ± 0,004	0,0255 ± 0,002	0,0310 ± 0,003	0,0340 ± 0,005	0,0349 ± 0,003

são expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs OVX+ IM ef; \$ $p < 0,05$ vs OVX+SHAMsed

5.3. Reatividade Vascular em Anéis de Aorta

A função contrátil do vaso estudado foi observado mediante curva de concentração-resposta da Fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) nos diferentes grupos (Figura 5). Foi demonstrado que o infarto do miocárdio promoveu aumento da contratilidade do vaso. Em contrapartida, a ovariectomia inalterou a função contrátil. Tal resultado pôde ser constatado pela hipercontratilidade ocorrida no grupo OVX+IMsed comparado ao grupo Controle e OVX+SHAMsed. Por sua vez o grupo OVX+SHAMsed não demonstrou diferenças significativas dos níveis contráteis comparado ao grupo Controle. Além disso o exercício físico promoveu benefícios a reatividade vascular, observado pela redução dos níveis contráteis do grupo OVX+IMef comparado ao grupo OVX+IMsed.

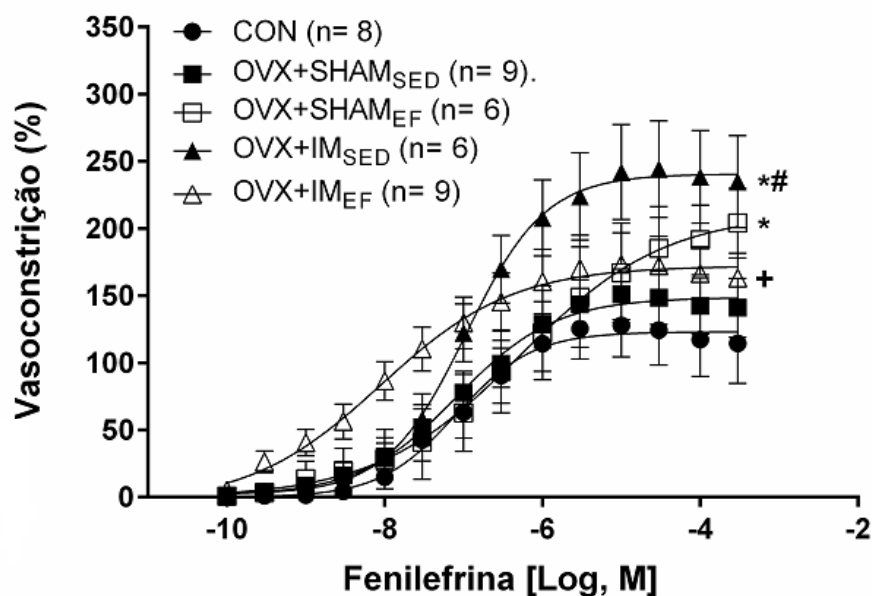


Figura 5: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar.;Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós-hoc de fisher para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs controle; # $P < 0.05$ vs OVX+SHAMsed; + $p < 0.05$ vs OVX+IMef

Curvas de concentração-resposta à acetilcolina foram realizadas para averiguar o relaxamento dos vasos aórticos nos diferentes grupos (figura 6). Corroborando com o dado anterior, foi constatado que o prejuízo no relaxamento do grupo OVX+IMsed foi promovido pelo infarto do miocárdio e não pela ovariectomia. Tendo em vista que o grupo infartado sem treinamento físico teve um percentual de relaxamento significativamente inferior ao grupo Controle, OVX+SHAMsed e OVX+SHAMEf. Já os grupos Controle e OVX+SHAMsed não dispõem de diferenças estatísticas. O benefício da prática do exercício foi mais evidenciado com o aumento no percentual de relaxamento do grupo infartado que realizou treinamento comparado ao grupo OVX+IMsed.

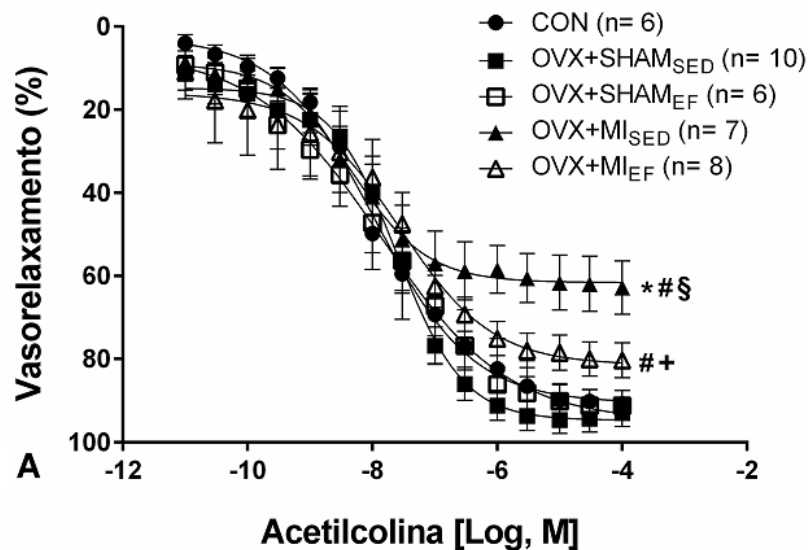


Figura 6: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta; Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM); Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós-hoc de fisher para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs OVX+SHAMsed; § $p < 0,005$ OVX+SHAMEf + $p < 0,005$ vs OVX+IMef

Para avaliar o papel do sistema antioxidante, os anéis aórticos foram incubados com três diferentes tipos de enzimas: Superóxido Dismutase, Catalase e Apocinina nos diferentes grupos e realizado a concentração-resposta com a fenilefrina como relatado

anteriormente. A apocinina promoveu efeitos de maior magnitude na contração dos vasos de animais do grupo controle e as demais enzimas inalteraram o percentual de contração no grupo (figura 7A). A catalase produziu maior sensibilidade aos efeitos da fenilefrina entre os animais do grupo OVX+SHAM_{SED}. O mesmo não foi observado com as outras enzimas estudadas (Figura 7B). Já no grupo OVX+SHAM_{EF} foram encontrados diferentes resultados em relação ao anterior citado. Nenhuma das enzimas promoveram diferenças no percentual contrátil desse grupo (Figura 7C). No grupo OVX+IM_{SED} as enzimas não promoveram diferenças no percentual de contração (Figura 7 D). Já os animais OVX+IM_{EF}, tiveram uma maior sensibilidade a contração da fenilefrina nos vasos que continham a enzima Catalase.

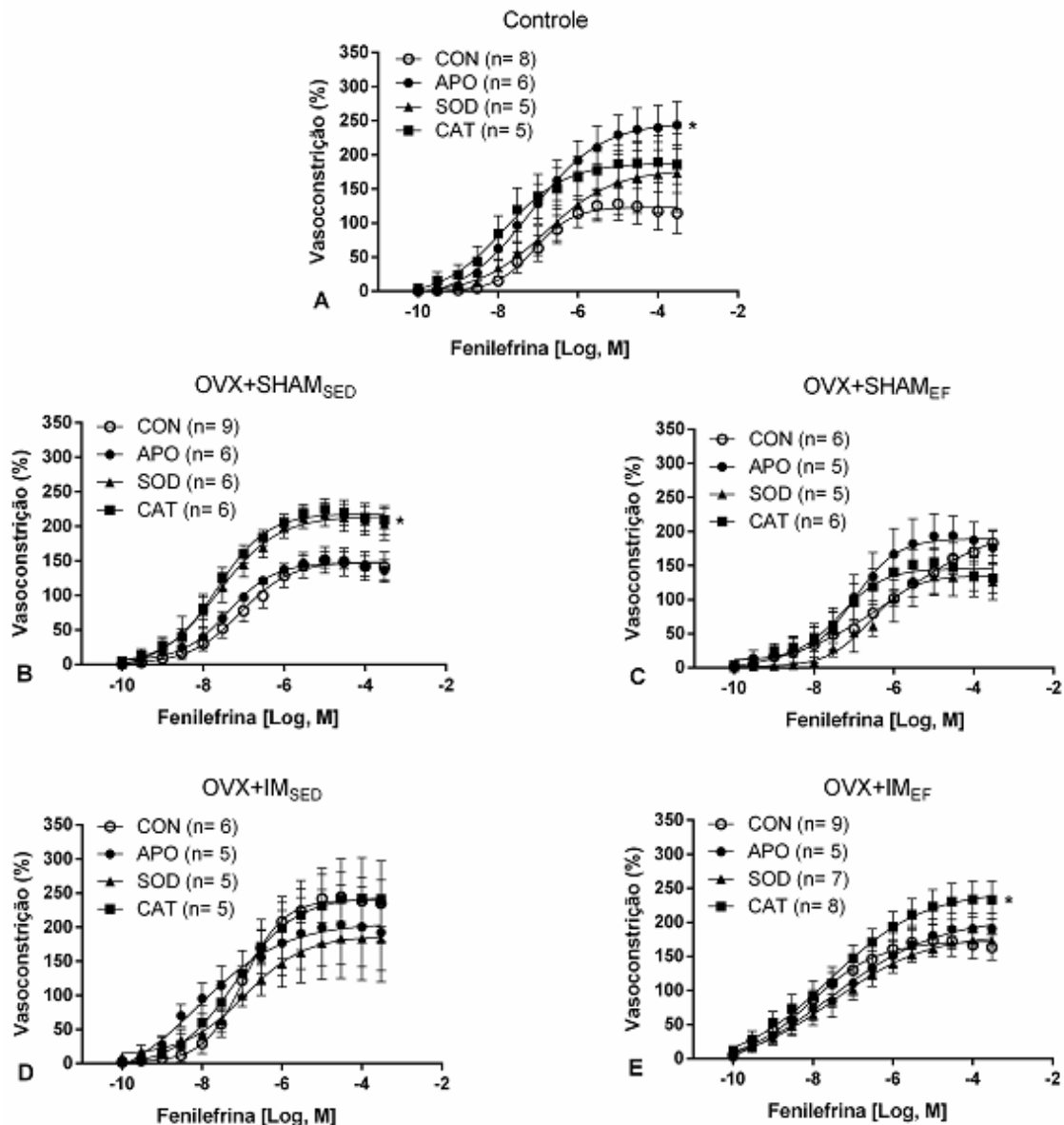


Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina mediante encubação de apocinina, SOD 2e catalase em anéis isolados de aorta. * $p < 0,005$ vs controle. Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM); Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós-hoc de Dunnet para comparações com a curva controle do grupo * $p < 0,005$ vs controle

5.4. Expressão Protéica das Enzimas Antioxidantes e gp91phox

Utilizamos a análise da expressão protéica da gp91phox como parâmetro de análise da expressão da enzima NADPH oxidase. Como observado na figura 8a expressão da gp91phox foi significativamente aumentada no grupo OVX+IMsed em relação aos demais grupos, sugerindo que o infarto do miocárdio tenha proporcionado maior ativação da enzima NADPH oxidase mediante aumento da subunidade no grupo infartado em relação ao OVX+SHAMsed. As análises também evidenciam que a redução dos hormônios ovarianos não interferiram na ativação da enzima, haja visto que a expressão do grupo controle não se diferenciou dos animais OVX+ SHAMsed. Mas nosso dado mais expressivo nessas análises é a redução da expressão da gp91phox no grupo OVX+IMef em relação ao grupo OVX+IMsed, evidenciando que o treinamento físico foi um fator importante nos animais infartos para reduzir a ativação da enzima NADPH oxidase.

As análises da expressão da SOD revelam que a ovariectomia reduziu a expressão da enzima e que o treinamento físico mostrou-se capaz de normalizar a expressão da mesma. No entanto não houve diferença nos grupos infartados. Além disso foi observado que o treinamento físico na ausência de cardiopatias promove aumento na expressão da catalase, uma vez que o grupo OVX+SHAMef foi significativamente mais expressivo nas análises dessa enzima em relação aos demais grupos.

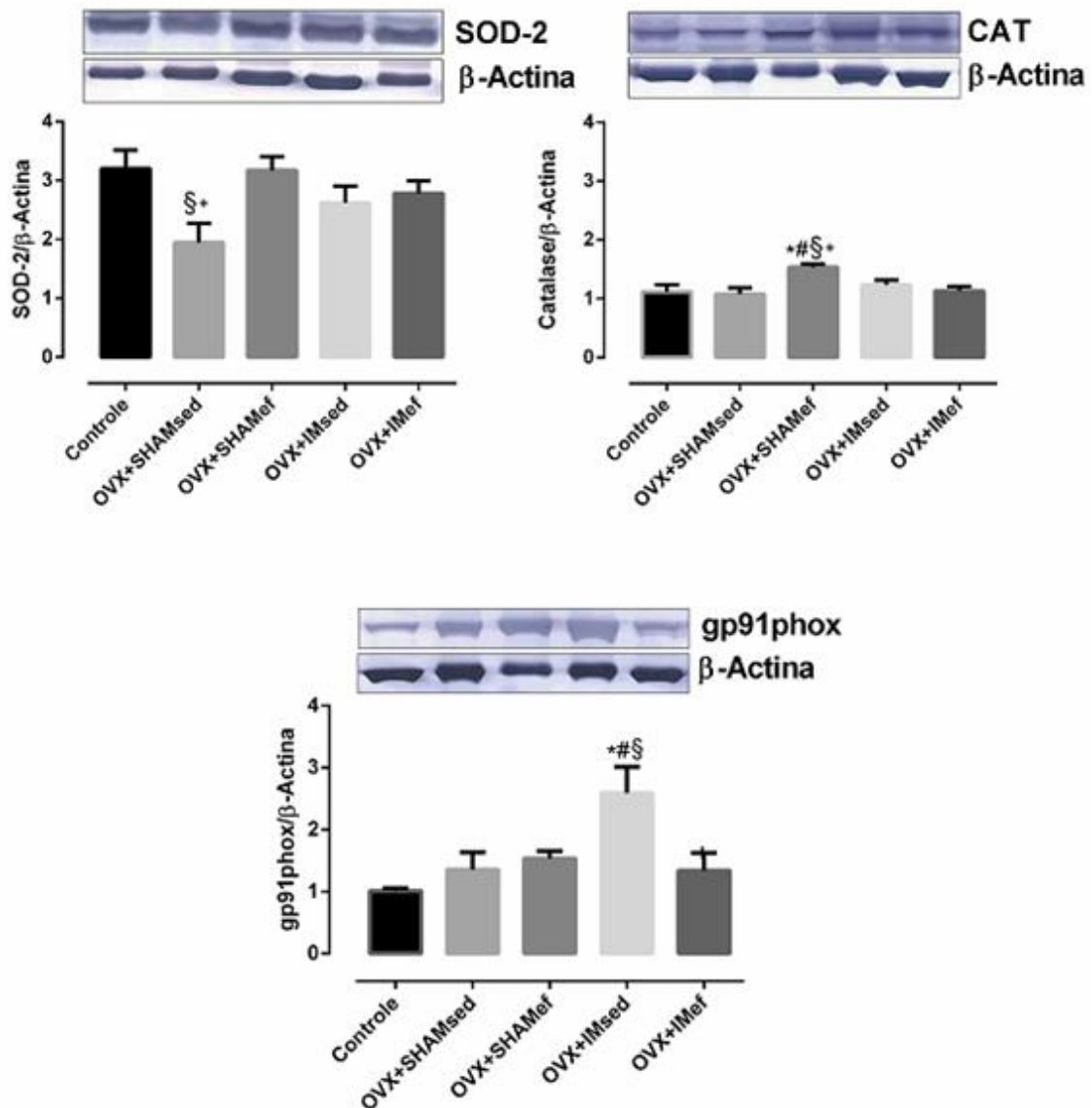


Figura 8: Expressão protéica das enzimas SOD-2, Catalase e gp91phox nos diferentes grupos. Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de teste *post-hoc* de Tukey. # $p < 0,005$ vs OVX+SHAMsed; * $p < 0,005$ vs ovx+IMef; § $p < 0,005$ vs Controle.

5.5. Fluorescência Produzida pela Oxidação do Dihidroetídio (DHE)

Para avaliarmos a influência do Infarto do miocárdio sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ e a importância da atividade física nesse contexto, utilizamos a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE (Figura 9). A produção de $O_2^{\bullet-}$ foi significativamente aumentada nos animais OVX+IMsed comparado aos demais grupos. Entretanto o

treinamento físico realizado em animais infartados foi capaz de reduzir a produção excessiva de radicais livres, haja visto que o grupo OVX+IMef foi significativamente menor em relação aos OVX+IMsed. Além disso tendo em vista que o grupo OVX+IMef não teve variância significativa em relação aos animais controle, OVX+SHAMsed e OVX+SHAMef, sugerimos que o treinamento físico não foi meramente um fator de redução da produção de $O_2^{\bullet-}$. Destacamos que o mesmo foi capaz de restabelecer a produção de radicais livres a níveis basais

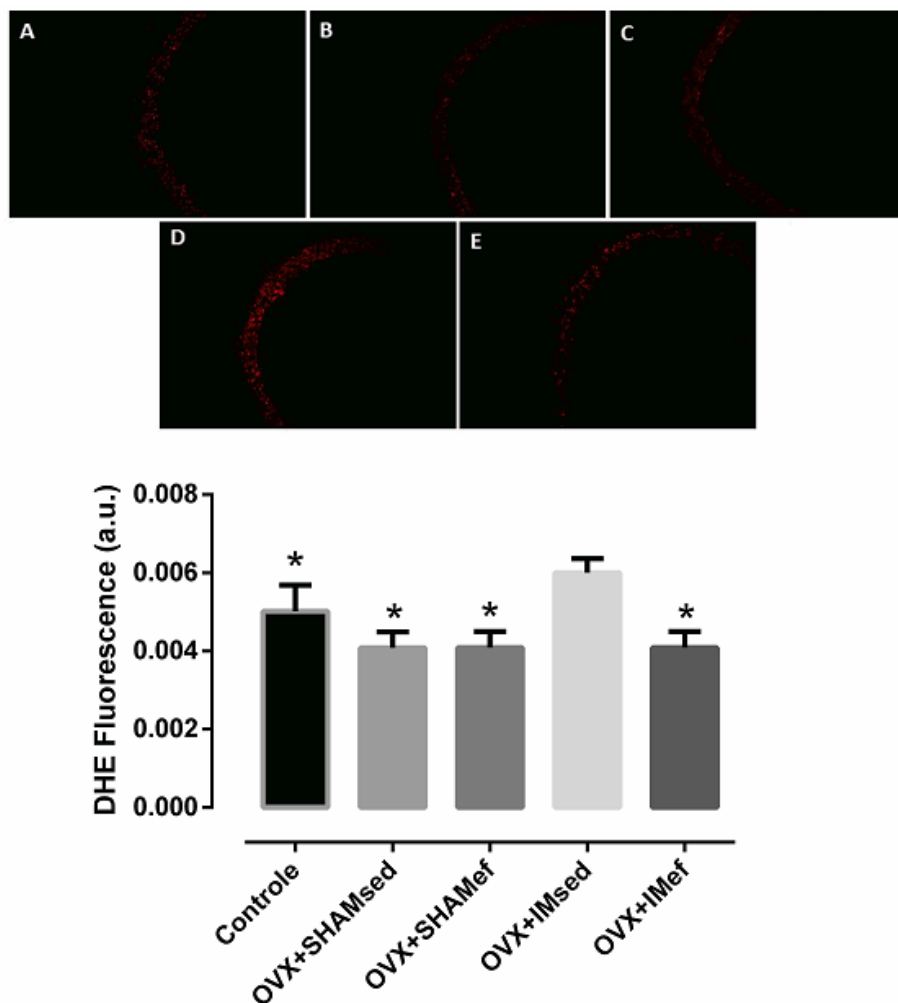


Figura 9: Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) "in situ" por Imagens de micrografia representando a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de aorta em todos os grupos. Dados expressos como média±erro padrão da média (EPM). Foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de teste *post-hoc* de Tukey. * $P < 0,005$ vs OVX+IMsed

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Peso dos Tecidos - tabela 1

O peso do útero dos animais ovariectomizados foi inferior ao peso uterino do grupo Controle, que por sua vez manteve a presença do ovário. Como relatado anteriormente a atrofia do útero é apontada em muitos estudos como dado comprobatório da efetividade da cirurgia e redução significativa dos níveis estrogênicos. Além disso a redução dos hormônios ovarianos foram concomitantemente visualizados ao aumento do peso corporal final, tendo em vista que os mesmo animais que foram submetidos a cirurgia de retirada do útero, obtiveram aumento de peso ao fim do estudo, comparado ao grupo Controle.

O envolvimento do estrogênio com o desempenho metabólico vem sendo discutido em diversos estudos. Heine et al. (2000) constatou que camundongos Knockout de receptores de estrogênio α apresentaram aumento de tecido adiposo em machos e fêmeas. Muitos estudos corroboram com os achados, evidenciando aumento de peso corporal na ausência de estrogênio (Jones et al., 2000; Madak-Erdogan et., 2016). Entretanto os mecanismos pelo qual o estrogênio interfere no funcionamento metabólico ainda não estão bem esclarecidos. Nesse contexto diferentes hipóteses tem sido investigadas. Kimura et al. (2002) observou que ratas ovariectomizadas apresentaram redução da expressão de receptores de leptina, que poderiam ocasionar maior ingestão alimentar pela dificuldade de saciedade, resultando em aumento de peso corporal. Contudo esses e outros resultados precisam ser mais investigados para se constatar a via de atuação do estrogênio nesse âmbito.

Nosso estudo expôs que o peso do útero dos animais não infartados foi significativamente reduzido em comparação aos animais controles. A retirada dos ovários causa atrofia no útero. Torrezan et al. (2008) obteve o mesmo resultado em seu estudo e realizou tratamento com isoflavonas após ovariectomia visando investigar se as mesmas poderiam evitar tão resultado morfológico. Entretanto o tratamento não impediu a atrofia do endométrio. Resultados semelhantes foram obtidos com o peso corporal final dos animais, em que todos os integrantes dos grupos ovariectomizados se diferenciaram do controle. Entretanto contrapondo-se da

redução do peso uterino, os animais sem ovário tiveram o peso corporal final aumentados

Nas análises de peso úmido fica claro que os animais infartados apresentam pulmões mais pesados em relação ao grupo controle. Sabe-se que a insuficiência cardíaca gerada pelo infarto pode ocasionar o quadro de congestão pulmonar, que é caracterizado pelo aumento de líquido nos pulmões, que por sua vez gera dificuldades respiratórias (Mesquita et al., 2004). Apesar do treinamento físico ter mostrado influencia positiva em outros parâmetros nesse estudo, o mesmo não conseguiu reverter o aumento de líquido nos pulmões ocasionado pelo IM. Alguns estudos apontam que a atividade física aeróbica de alta intensidade afetam mais o funcionamento pulmonar em detrimento aos exercícios de baixa intensidade (Normandim et al., 2002; Silva et al., 2008)

As gorduras retroperitoneal, mesentérica e parametrial foram pesadas separadamente e somadas ao final. O treinamento físico não promoveu redução de peso significativa entre os grupos treinados em relação aos sedentários, tanto de animais Sham quanto dos IM. Somando os valores de peso das gorduras retroperitoneal, parametrial e mesentérica, observamos que os pesos maiores são exibidos nos grupos controle e OVX+SHAMsed em relação ao OVX+IMef. A própria patologia pode ter ocasionado a redução do peso que somado aos efeitos do exercício físico tenha promovido tal resultado. Entretanto são diversos os fatores que podem influenciar o peso e a composição corporal desses animais, incluindo a insuficiência cardíaca que pode estar instalada ou não nesses animais em resposta ao infarto

6.2. REATIVIDADE VASCULAR

Em nossas análises de reatividade vascular constatamos que o percentual contrátil do grupo OVX+IMsed foi mais significativo, mostrando-se mais expressivo sobretudo ao grupo Controle e OVX+SHAMsed. Tal resultado ressalta que os prejuízos proporcionados pela injúria cardíaca afetam não apenas a função cardíaca mas também a função vascular. Sabe-se que o IAM desencadeia a ativação de mecanismos neurohumorais como SRAA, sistema nervoso simpático, ANP, CNP entre outros, e que os mesmo podem proporcionar modificações na reatividade dos

vasos (Furchgott e Zawadzki, 1980; Zdanowicz, 2002; Ledoux et al., 2003). Além disso, em condições normais o endotélio vascular libera substâncias com funções vasoconstrictoras e vasodilatadoras. Endotelina-1, prostaglandinas H₂ (PGH₂) Tromboxano A₂ (TXA₂) são exemplos de substâncias vasoconstrictoras. Já o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) são substâncias vasodilatadoras. Em circunstâncias patológicas os níveis de liberação das substâncias citadas podem ser alterados, desequilibrando o padrão entre os elementos vasoconstrictores/vasodilatadores gerando modificações na reatividade do vaso (Fang e Marwick, 2002). Por fim o IAM gera um processo inflamatório, no qual a citocina é apontada como um dos mediadores pró-inflamatórios mais relevante (Ledoux et al., 2003). A sustentação de níveis elevados de citocinas podem desencadear a disfunção endotelial (Aldhahi e Hamdy, 2003).

Quin et al., (2014) também obteve prejuízos na reatividade vascular ocasionados pelo IAM, entretanto suas análises foram observadas em artéria mesentérica. Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, porém a disfunção endotelial ocasionada pela isquemia foi avaliada em vasos coronarianos (Obata et al., 2009; Kim et al., 2009). Corroborando com os dados, Lee et al., (2009) também observou prejuízos na funcionalidade reativa de vasos aórticos mediante contração induzida por fenilefrina, em animais submetidos a isquemia. Dessa forma constatamos perante análises de estudos prévios, que os efeitos danosos da reatividade vascular ocasionados pelo IAM já vem sendo discutidos na literatura. Entretanto é necessário destacar que embora o conteúdo já tenha sido explorado nas pesquisas, ainda não há um consenso que destaque com clareza os efeitos de tal patologia na disfunção vascular pois, fatores como o tipo de vaso avaliado, idade e gênero podem influenciar na variabilidade dos resultados obtidos. Com isso torna-se necessário maior volume de pesquisas que avaliem o tema proposto mediante um mesmo fator. Além disso é notório que os estudos que analisaram a reatividade vascular em função da isquemia, foram realizados sobretudo com gênero masculino, tornando escasso os resultados em fêmeas.

Nossos resultados sugerem que as modificações no padrão de contratilidade no grupo Infartado com treinamento físico, foi promovido sobretudo pelo infarto e não pela ovariectomia, haja visto que o grupo sham, (que também foi submetido a retirada dos

ovários entretanto a artéria coronária não foi ocluída), não se diferenciou dos resultados do grupo controle.

Um dos dados mais relevantes deste estudo foi a redução significativa da contratilidade do grupo infarto treinado comparado ao grupo infartado sem treinamento físico. Tal resultado evidencia que o treinamento físico de baixa a moderada intensidade promoveu uma melhora na funcionalidade do vaso da aorta. Corroborando com os dados, observamos que o grupo infartado treinado obteve uma maior resposta no percentual de relaxamento comparado ao grupo infartado que não realizou atividade física. Sabe-se que o treinamento físico pode promover alterações agudas e crônicas na reatividade vascular. O aumento da força pulsátil e o estresse de cisalhamento são mencionados como as principais energias mecânicas responsáveis pelas alterações agudas. O shear stress incitado pelo exercício por exemplo, ocasiona vasodilatação (Hilton, 1959; Lie et al., 1970). Por sua vez, muitos autores já citaram que o principal efeito crônico do treinamento físico observado na reatividade vascular é a minimização do efeito vasoconstrictor pelos influentes vasoativos (Laughlin e McAllister, 1992; Parker et al., 1994). O principal mecanismo de ação pelo qual o exercício físico promove vasodilatação vem sendo citado pelo aumento do shear stress ocasionado pela prática do exercício. Tal atuação mecânica induz a formação de eNOS (Busconi et al., 1993) que por sua vez produz óxido nítrico mediante conversão de L -arginina a L-citrulina (Konturek, 1995). NO então difundiu-se para o músculo liso e se liga a guanilato ciclase ativando-a. GCa gera GMPc a partir da molécula de GTP (Souza Junior et al., 2012). GMPc por sua vez vai promover a saída de cálcio da célula, dificultando o processo de contração muscular que acarreta então em vasodilatação. O influxo de Ca^{2+} acarretando redução da resposta contrátil já tem sido relatado como um dos efeitos do treinamento crônico (Jen et al., 2002; Chu et al., 2000). Em seu estudo Sessa et al. (1992) relatou que o estresse de cisalhamento leva a uma ativação de RNAm da sintetase NO. Para tal ativação é necessário solicitação de elementos responsivos ao estresse de cisalhamento (SSRE) no gene NOs3. A ativação da sintetase NO, por sua vez leva a maior liberação do vasodilatador NO, podendo ser um dos mecanismos que ocasione redução na contratilidade e/ou um maior relaxamento do vaso mediante doses de fenilefrina e acetilcolina respectivamente.

Alguns fatores podem influenciar os resultados como a frequência do exercício e o tipo de exercício. Em vasos coronarianos já foi constatado que em cães exercícios de curto e longo prazo elevam os níveis da expressão de RNAm da NOS, ocasionando aumento de NO e melhora no padrão de relaxamento do vaso (Sessa et al., 1994; Koller et al., 1995; Wang et al., 1993). Entretanto ao se analisar a reatividade vascular em artéria aorta de ratos submetidos a diferentes intensidades de treinamento de natação, constatou-se que os animais que treinaram nas maiores intensidades (acima do limiar anaeróbica) tiveram maiores níveis de contração com fenilefrina em baixas concentrações, além disso o percentual de relaxamento foi reduzido, mostrando prejuízos mediante treinamento de altas intensidades. (Brito et al., 2015). Corroborando com os dados Bergholm et al. (1999) mostrou que o treinamento de corrida intenso promoveu um prejuízo no relaxamento depende de endotélio além da redução das enzimas antioxidantes. Contudo o exercício não promoveu mudanças no relaxamento independente de endotélio. Já Clarkson et al. (1999) avaliou a combinação de exercícios aeróbicos e anaeróbicos sobre a função reativa da artéria braquial e observou que o grupo treinado obteve resultados positivos em contraste com o grupo sedentário. Como no relato anterior, o relaxamento independente de endotélio não foi alterado. Por sua vez, Kingwell et al. (1997) observou em seus resultados de pesquisa que 4 semanas de treinamento aeróbico em homens refletiu em uma vasodilatação mais expressiva (Kingwell et al., 1997). Mediante essa pequena amostra de revisão literária bem como análises de estudos de metanálise, compreendemos que a investigação dos efeitos do exercício físico sobre o funcionamento do organismo, sobretudo sobre a função vascular é bastante heterogênea e abrange muitos fatores que possam promover diferentes resultados de um estudo para outro. Com base no que já foi descoberto há uma propensão global da atividade física em promover benefícios a saúde corporal. Entretanto faz-se necessário ressaltar que para melhores esclarecimentos é preciso avaliar as situações e vertentes dos estudos de maneira individualizada analisando os fatores do exercício físico (como tipo de atividade física, intensidade, frequência e duração) bem como o alvo analisado (como o gênero, a idade e o sistema fisiológico avaliado). Até o presente momento a literatura não dispõe de estudos que avaliem a atividade física de baixa a moderada intensidade sobre a reatividade vascular de artérias aorta em modelo de ratas fêmeas ovariectomizadas e infartadas, impossibilitando a revisão e discussão de trabalhos mais similares ao aqui descrito. A sociedade atual vem

ressaltando cada vez mais a importância da prática regular de atividade física para os benefícios da saúde, o que tem promovido um aumento do número de pesquisas que investiguem tal tema. Entretanto como o exercício físico possui muitas variações, muitas vezes o número de publicações em uma vertente específica ainda é escasso.

O infarto do miocárdio pode ocasionar múltiplas modificações no funcionamento do organismo, que podem ser agravadas pela ausência dos hormônios ovarianos. Tais modificações podem ser analisadas desde de alterações gênicas, moleculares até a próprio prejuízo na funcionalidade de órgãos específicos. Avaliamos a contratilidade dos vasos nos diferentes grupos mediante ação de algumas enzimas antioxidantes, tendo em vista que nossas investigações visaram sobretudo analisar o perfil do estresse oxidativo mediante o modelo proposto. O grupo Controle apresentou maior responsividade a fenilefrina nos vasos que receberam apocinina (um inibidor do complexo enzimático NADPH oxidase). Sabe-se que o ânion superóxido é descrito como um "varredor" de NO, uma vez que ambos se unem formando peróxido nitrito (ONOO⁻), reduzindo assim a biodisponibilidade de NO (Kelvin et al., 2005). Tendo que vista que o NO possui propriedades vasodilatadoras como já fora citado anteriormente, esperava-se que inibindo a fonte de O₂⁻ a resposta contrátil fosse reduzida. Entretanto uma resposta controversa foi observada em um grupo que não foi submetido à procedimentos cirúrgicos e atividade física. Tendo em vista que os animais estavam sendo armazenados em locais apropriados, com temperatura ideal, água e comida disponível, respeitando a luminosidade adequada e que os mesmos não foram submetidos a nenhuma situações de estresse, consideramos que os animais não estavam em condições significativas de estresse oxidativo, mas sim de produção das ERO a níveis basais, importante para manter a homeostasia. A produção normal de anion superóxido pela via NADPH oxidase observada em condições fisiológicas de normalidade é importante para as funções de sinalização celular no organismo, tendo em vista que é função também desempenhadas pelas ERO. Seu papel mais específico nesse contexto é atuar como segundo - mensageiro transportando a informação adquirida na superfície da célula até local onde se realizará a transcrição gênica (Finkel, 1999). A formação desses radicais livres influenciam a transdução de sinal sobre vários aspectos, mas principalmente na ação no NF-KB (factor nuclear kappa B). Tal complexo proteico está envolvido no funcionamento do sistema imune e regula ativação de genes específicos. A ativação inapropriada no NF-KB pode

causar efeitos deletérios (Flohé et al., 1997). Ou seja, a produção exarcebada das ERO são prejudiciais para a saúde e desencadeadora de inúmeras doenças. Entretanto sua produção a níveis fisiológicos é importante para organismo, exibindo funções específicas na sinalização celular. Tendo em vista que esses animais provavelmente não se encontravam em situações de estresse oxidativo, mas sim de nível normal da produção de radicais livres, o bloqueio da produção de O_2^- mostrou-se prejudicial para a reatividade do vaso.

Os vasos que receberam a catalase foram mais responsivos a contratilidade da fenilefrina, em contrastes com as demais enzimas antioxidantes também avaliadas. Como já foi mencionado anteriormente, o mecanismo de ação da catalase é atuar com H_2O_2 promovendo a formação de $H_2O + O_2$. Em seu livro Aires (2012) explica que a maior presença de O_2 no vaso resulta em constrição do mesmo, assim como o aumento de CO_2 por sua vez promove efeito oposto. Exemplo prático pode ser observado pelo estudo de Silva et al. (2014) que entre seus dados demonstrou a vasoconstrição resultante de hiperóxia em humanos. Sendo assim, acreditamos que o maior efeito contrátil observado no gráfico é resultado do aumento de oxigênio que foi promovido por sua vez pela ação da catalase ao peróxido de hidrogênio. Apesar dos animais desse grupo não terem sido submetido a oclusão da artéria coronária caracterizando a isquemia, os mesmos foram submetidos a toracotomia e externalização do coração. Tal procedimento é bastante invasivo e pode ter acarretado estresse aos animais, tendo em vista que muitos necessitaram de ventilação mecânica e evidenciaram curtos períodos de parada cardiorrespiratória. Esses efeitos podem ter auxiliado para o aumento de H_2O_2 nesses animais. Em comparação com esse resultado o gráfico C da figura 7 mostra que animais SHAM que foram submetidos ao treinamento físico não resultaram em aumento do percentual contrátil mediante ação da catalase bem como as demais enzimas antioxidantes aqui estudadas. O estresse provocado pela toracotomia e externalização do coração pode ter sido revertidos pela ação benéfica do exercício físico. Logo não ocasionando aumento nos valores H_2O_2 , que nesse grupo possivelmente estejam a níveis basais. Com isso, a ação da catalase gerou O_2 proporcional aos níveis de H_2O_2 , não sendo significativos para ocasionar constrição vascular.

Realizando uma comparação visual do percentual de contração dos vasos Controles dos animais OVX+IMsedi (gráfico D figura 7) com o grupo OVX+SHAMsed (gráfico B figura 7), observamos que o infarto do miocárdio promoveu quase o dobro do percentil contrátil. Mediante altos níveis de EROs e a ação das enzimas antioxidantes não foram suficientes para promover redução significativa da vasoconstrição, apesar de uma tendência na diminuição da contração vascular notado na ação da SOD e apocinina. Ao realizarmos a mesma comparação visual na contração dos vasos controle, porém entre o grupo infarto e infarto com exercício físico (gráfico E figura 7), constatamos mais uma vez o benefício da prática do treinamento físico, uma vez que os animais treinados reduziram os níveis de contração vascular comparados aos sedentários, se assemelhando ainda as proporções do grupo OVX+SHAMsed. As enzimas SOD e apocinina não promoveram diferenças na reatividade vascular, todavia ainda similar ao grupo OVX+SHAMsed, os vasos que receberam catalase tiveram um aumento na resposta contrátil comparado ao vaso controle. Provavelmente esse grupo resultou em um perfil vasoativo parecido com o grupo sham sem treinamento físico, em que há um aumento nos níveis de EROs comparado ao grupo controle, entretanto menor que o grupo infartado.

6.3. Western Blot e Dihidroetídeo

Sabe-se que a NADPH oxidase é um complexo enzimático constituída por diferentes subunidades e que quando ativada é uma das fontes responsáveis pela geração de ânion superóxido através do deslocamento de elétrons da própria enzima para a molécula de oxigênio (Bedard & Krause, 2007). As subunidades dessa enzima são proteínas que se encontram na membrana plasmática ou no citosol da célula. A gp91phox e p22phox são as subunidades membranares enquanto a rac, p40phox, p47phox, p67phox e RhoGDI constituem as proteínas citoplasmáticas. Para que a enzima torne-se ativada é necessário um deslocamento das subunidades citosólicas para a membrana, agregando-se as demais ali existentes, como mostrado na figura 10 a seguir (Bedard & Krause, 2007; Babior, 2004; Heyworth et al., 2003).

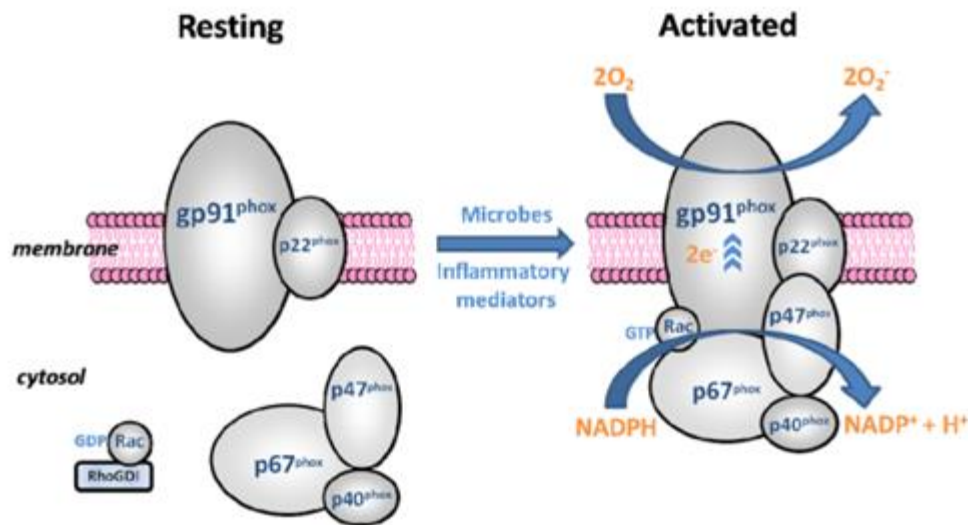


Figura 10: Estrutura da enzima NADPH oxidase sendo ativada. **Fonte:**McCann, 2013

A subunidade gp91phox pode ser ativada pela PKC (proteína quinase C) e fosforilada nesse decurso. Tal ocorrência resulta em uma interatividade mais vigorosa com as outras subunidades da enzima, o que leva a uma produção de superóxido mais acentuada (Raad et al., 2009). Por esse motivo avaliamos a expressão da NADPH oxidase pela expressão da gp91phox pela técnica de western blot.

Nossos dados mostram que o infarto do miocárdio ocasionou um aumento na expressão da gp91phox, tendo em vista que o grupo OVX+IMsed foi significativamente maior em relação ao OVX+SHAMsed e ao grupo Controle. Em sua revisão Weseler & Bast (2010) descrevem que a ativação dos receptores AT1 ocasiona migração das subunidades citoplasmáticas da enzima NADPH para a membrana, conectando-se as subunidades ali já existentes, resultando em produção de ânion superóxido, e que os receptores AT1 por sua vez são ativados pela presença de angiotensina II. Já é bem estabelecido que a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), é um dos efeitos proporcionados pelo infarto do miocárdio no processo de remodelamento cardíaco (Meggs et al. 1993; El-Sabban et al. 2000). A ativação dessa via é iniciada por uma redução da pressão arterial, como consequência do próprio evento cardíaco. Na tentativa de reverter esse quadro os rins passam a secretar mais renina, cuja função é fragmentar o angiotensinogênio, gerando angiotensina-I. Esse peptídeo é então transformado em angiotensina-II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ação desse hormônio pode

ocorrer pela interação com os receptores AT1e AT2 (Paul et al. 2006). Receptores AT1 ativados por sua vez acarretam a ativação de NADPH oxidase como já fora descrito.

A maior expressão da gp91phox foi acompanhada pela maior presença de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos do grupo OVX+IMsed, como observado pela técnica de DHE em que a fluorescência obtida nesse grupo foi superior a todos os demais. Tais dados sugerem que a maior presença de ROS, por uma maior ativação da NADPH oxidase pode ser um dos mecanismos que estejam ocasionando o prejuízo na reatividade vascular dos animais infartos, observados por um aumento significativo no percentil contrátil bem como redução significativa dos valores percentuais de relaxamento.

Tal prejuízo da reatividade vascular entretanto, foi revertido pelo treinamento físico como já fora discursado anteriormente, uma vez que o treinamento físico promoveu nos vasos aórticos do grupo OVX+IMef aumento do percentual de relaxamento e redução dos valores contráteis, quando comparado aos animais infartados que não foram submetidos ao treinamento físico. Os dados do W.B acompanham esses resultados uma vez que a expressão da gp91phox também foi reduzida no grupo OVX+IMef comparado aos animais OVX+IMsed. Por fim os dados do DHE mostram que o treinamento físico em animais infartados foi importante para reduzir a presença das ROS, como observado no gráfico 9 pela técnica de DHE.

Estudos anteriores do nosso laboratório mostrou que o treinamento físico iniciado 15 dias depois do IM também foi benéfico para o funcionamento cardíaco, e que também foi capaz de reduzir a expressão da gp91phox porém em análises de tecido cardíaco (Almeida et al., 2014). Acreditamos que o principal mecanismo envolvido nessa melhora do funcionamento cardíaco e vascular proporcionada pelo treinamento físico seja a redução da ativação do SRAA, haja visto que o treinamento também reduziu a deposição de colágeno nos corações infartados e que já é demonstrado por distintas vias de sinalizações que a ativação dos receptores AT1 pela interação com seu principal hormônio ligante, a angiotensina II, aumenta a deposição de colágeno (Tziakas et al., 2003). Estudos já evidenciaram que o exercício físico agudo ocasiona maior ativação do SRAA (Staessen et al., 1985; Wade et al., 1980). Entretanto o exercício físico crônico proporciona efeito oposto, reduzindo a ativação desse sistema,

que por sua vez acarretam em níveis de angiotensina II reduzidos (Braith et al., 1999). Além dos diversos estudos com modelo animal, há também pesquisas que comprovam a eficiência da prática de exercícios físicos na regulação da angiotensina II, como por exemplo Braith et al., (1999) que observou uma redução de 26% da angiotensina II plasmática em indivíduos que participaram de um programa de treinamento físico por um período de 4 meses após a incidência do evento cardíaco.

Nosso estudo foi realizado com o objetivo de investigar a influência do treinamento físico sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de animais infartados, tendo em vista os diversos benefícios que a prática regular de exercícios físicos proporciona ao sistema cardiovascular como já é bem definido na literatura. Na hipótese do treinamento físico proporcionar uma melhora na função vascular, pressupomos que o sistema antioxidante poderia ser uma das principais vias influenciadoras na resposta benéfica, haja visto que o treinamento físico proporciona um aumento das enzimas antioxidantes. Nosso estudo indicou que o treinamento físico foi eficaz em proporcionar maior ativação do sistema antioxidante, uma vez que os animais OVX+SHAMef evidenciaram aumento na expressão das enzimas SOD e Catalase em relação ao grupo OVX+SHAMsed. Entretanto, para o modelo de animais infartados o treinamento físico realizado não foi suficiente para ocasionar aumento na expressão dessas enzimas. Acreditamos que a intensidade do treinamento pode ter sido a principal influência para ocasionar tal resultado, em que o exercício físico de baixa intensidade é eficiente para aumentar a produção das enzimas antioxidantes em animais com o funcionamento cardiovascular normalizado, mas não para animais submetidos ao infarto do miocárdio.

Sabe-se que o infarto do miocárdio acarreta o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, atingindo muitas vezes o estado de estresse oxidativo, como observado em nossos resultados em que a técnica de Dihidroetídio nos evidencia que os animais infartados possuem os níveis de ROS significativamente aumentados em relação aos demais grupos. Em situações em que os níveis de ERO não estão intensificados, o treinamento físico de baixa intensidade pode ser importante na promoção significativa do sistema antioxidante. Entretanto em circunstâncias de produção exacerbada das ROS, como por exemplo no infarto do miocárdio, o aumento da produção das enzimas antioxidantes mediante o treinamento físico de baixa intensidade pode não ser suficiente para reverter o quadro de desbalanço entre

os sistemas oxidante/antioxidante. Em seu estudo Xu et al., (2010) constatou que o treinamento físico promoveu aumento da expressão das enzimas antioxidantes em animais infartado. Entretanto os animais foram submetidos a exercícios de alta intensidade e os dados foram observados no ventrículo esquerdo e não em vasos como proposto em nosso trabalho.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Concluimos com o estudo vigente que o infarto do miocárdio prejudica a funcionalidade vascular de vasos aórticos em ratas ovariectomizadas e que o aumento do estresse oxidativo mediante maior ativação da NADPH oxidase contribui para os danos citados. Além disso, o treinamento físico crônico aeróbico de baixa a moderada intensidade melhora a reatividade vascular por intermédio da expressão reduzida da NADPH oxidase, resultando em diminuição das espécies reativas de oxigênio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aars H. Static Load-Length Characteristics of Aortic Strips from Hypertensive Rabbits. *Acta Physiol Scand* 1968; 73: 101-110, doi: 10.1111/j.1748-1716.1968.tb04087.x

Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 562–570, doi: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.15.5.562>

Aguiar AS, Pinho RA. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. *Rev Bras Med Esporte* 2007; 13: 335-360, doi: 10.1590/S1517-86922007000500014

Aires MDM. *Fisiologia*. 4rd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* 2003;3 :293-8, PMID: 12866991.

Almeida SA., Claudio ERG, Mengal VF, de Oliveira SG, Merlo E, Podratz PL, Abreu GR. Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction. *PloS one* 2014; 9: e115970, doi: 10.1371/journal.pone.0115970. eCollection 2014.

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 1985; 248: H876- H882, doi: H876-H882.

Araújo CGS, Carvalho T, Castro CLB, et al. Normatização dos equipamentos e técnicas da reabilitação cardiovascular supervisionada. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83: 448-52, doi: 10.1590/S0066-782X2004001700012.

Avezum Á, Carvalho ACC, Mansur ADP, Timerman A, Guimarães AC, Bozza AEZ, Alves CMR. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras de Cardiol* 2004; 83: 1-86, doi: 10.1590/S0066-782X2004002200001.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 42-47, PMID: 14734109.

Baldo MP, Teixeira AKG, Rodrigues SL, Mill JG. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. *Food Chem. Toxicol* 2012; 50: 3-4, doi: 10.1016/j.fct.2011.11.033.

Barra D, Schinina ME, Simmaco M, Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G, Bossa F. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1984; 259: 12595–12601, PMID: 6386798.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313, doi: 10.1152/physrev.00044.2005.

BergholmRS, Makimattila M, Valkonen et al. Intense physical training decreases circulating antioxidants and endothelium-dependent vasodilatation in vivo. *Atherosclerosis* 1999; 145:341-49, PMID: 10488962.

Biondi-Zoccai GGL, Abbate A, Bussani R, Camilot D, Giorgio FD, Marino MPD, Silvestri F, Baldi F, Biasucci LM, Baldi A. Reduced post-infarction myocardial apoptosis in women: a clue to their different clinical course? *Heart* 2005; 91:99-101, doi: 10.1136/hrt.2003.018754.

Bonini AL, Moura LAR, Franco M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. *J Bras Nefrol* 2000; 22: 70-77.

Bouma W, Noma M, Kanemoto S, Matsubara M, Leshnower BG, Hinmon R, Gorman RC. Sex-related resistance to myocardial ischemia-reperfusion injury is associated with high constitutive ARC expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H1510-H1517, doi:10.1152/ajpheart.01021.2009.

Bozi LHM. Efeitos de um programa de exercício físico prévio ao infarto do miocárdio sobre a morfologia e a função contrátil do ventrículo esquerdo de ratos [dissertation]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2010.

Braga VA, Couto GK, Lazzarin MC, Rossoni LV, Medeiros A. Aerobic exercise training prevents the onset of endothelial dysfunction via increased nitric oxide bioavailability and reduced reactive oxygen species in an experimental model of menopause. *PLoS one* 2015; 10: e0125388, doi: 10.1371/journal.pone.0125388.

Braith RW, Welsch MA, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1170-1175, doi: 10.1016/S0735-1097(99)00339-3.

Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000;102:IV.14-IV.23, PMID: 11080127.

Brito AF, Silva AS, Pereira JC, da Silva BA. Intensity of swimming exercise influences aortic reactivity in rats. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48: 996-1003, doi: 10.1590/1414-431X20154397.

Brown RA. Rehabilitation of patients with cardiovascular diseases. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1964; 270: 3-46, PMID: 14128604.

Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993; 268: 8410-8413, PMID: 7682550.

Carvalho MHCD, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50: 304-312, doi: 10.1590/S0004-27302006000200016.

Carvalho TD, Castro CLBD, Costa RV, Moraes RS, Oliveira Filho JA, Guimarães JI. Normatização dos equipamentos e técnicas da reabilitação cardiovascular supervisionada. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83: 448-452, doi: 10.1590/S0066-782X2004001700012.

Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1560 –H1569, doi: 10.1152/ajpheart.01087.2002.

Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation* 2002;105:1983-1988, doi: 10.1161/01.CIR.0000014686.73212.DA.

Chu TR, Huang TY, Jen CJ et al. Effects of chronic exercise on calcium signaling in rat vascular endothelium. *Am J Physiol* 2000; 279:H1441-46, PMID: 11009427.

Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 :1379-85, doi: 10.1016/S0735-1097(99)00036-4.

Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa AS, Abreu GR. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS one* 2013; 8: e64806, doi: 10.1371/journal.pone.0064806.

Clerk A, Cole SM, Cullingford TE et al. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther* 2003; 97: 223-261, doi: 10.1016/S0163-7258(02)00339-X.

UpToDate. Cohn JN: Cardiac remodeling: basic aspects [update 2002 July 29]. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/cardiac-remodeling-basic-aspects>.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569-82, doi: 10.1016/S0735-1097(99)00630-0.

Colucci WS, Braunwald E. *A textbook of cardiovascular medicine*. 7th edn. Philadelphia (PA), Elsevier Saunders; 2005.

Costanzo, L. (2014). *Fisiologia*. Elsevier Brasil.

Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1198-205

Dégano IR, Salomaa V, Veronesi G, Ferrières J, Kirchberger I, Laks T, Havulinna AS, Ruidavets JB, Ferrario MM, Meisinger C, Elosua R, Marrugat J; Acute Myocardial Infarction Trends in Europe (AMITIE) Study Investigators. Twenty-five year trends in myocardial infarction attack and mortality rates, and case-fatality, in six European populations. *Heart* 2015; 101:1413-21. doi: 10.1136/heartjnl-2014-307310.

De Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbijs HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers

JM, Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007; 100:1079-1088, PMID: 17347478 DOI: 10.1161/01.RES.0000262655.16373.37.

Diffie GM. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. *Exerc Sport Sci Rev* 2004; 32:112-9, PMID: 15243207.

Dougall WC, Nick HS. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 1991; 129:2376–2384, doi: 10.1210/endo-129-5-2376.

Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:414–426, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.023.

El-Sabban ME, Hassan KA, Birbari AE, Bitar KM, Bikhazi AB. Angiotensin II binding and extracellular matrix remodelling in a rat model of myocardial infarction. *Journal of the reninangiotensin-aldosterone system. JRAAS* 2000; 1:369–378, doi: 10.3317/jraas.2000.069.

Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV - Impaired endothelium-dependent relaxation to sodium fluoride following coronary reperfusion injury: Evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:1550-1556.

Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão: aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol* 1996; 66:239-245.

Fang ZY, Marwick, TH. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *Am. Heart J* 2002; 143: 383-90, PMID: 11868041.

Feinberg H, Rosenbaum DS, Levitsky S, Silverman NA, Kohler J, LeBreton G - Platelet deposition after surgically induced myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 84: 815-22, PMID: 7144215.

Fernandes CE, Pinho-Neto JSL, Gebara OCE, Santos Filho RD, Pinto Neto AM, Pereira Filho AS, Silva CR. I Diretriz Brasileira sobre prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres climatéricas e a influência da terapia de reposição hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). *Arq Bras Cardiol* 2008; 9: 1-23.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd Bras* 1997; 43:61-68, doi: 10.1590/S0104-42301997000100014.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukc Biol* 1999; 65:337-340, PMID: 10080536.

Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1115-1126, doi: 10.1016/S0891-5849(96)00501-1.

Forechi L, Baldo MP, Meyerfreund D, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor improves early remodeling in isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Pharmacol Rep* 2012; 64:643–649, ISSN 1734-1140.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, Kneitz S, Rooijen N, Ertl G, Bauersachs J. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 2008; 51:905–14, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100941.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376, PMID: 6253831.

Gamarski, Roberto. Marcadores de Necrose Miocardica. *Rev SOCERJ* 1999; 12: 397-400.

Garcia JAD, Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90: 443-450, DOI: 10.1590/S0066-782X2008000600010

Gastin, PB. Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports med* 2001; 31:725-741, PMID:11547894

Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J. Immunol.* 1991;147:149–154; PMID:1904900

Hashimoto T, Kambara N, Nohara R, Yazawa M, Taguchi S. Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. *J Appl Physiol* 2004; 97:843-85, doi: 10.1152/jappphysiol.01193.2003

Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 1986; 107:401-4.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 23:12729-34. doi:10.1073/pnas.97.23.12729.

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2164-2171, doi: 10.1016/S0735-1097(03)00471-6] 84

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 2003, 15: 578-584.

Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96:2414-2420, PMID: 9337218 DOI: 10.1161/01. CIR.96.7.2414.

Hilton, S.M. A peripheral arterial conduction mechanism underlying dilation of the femoral artery and concerned in function vasodilation in the skeletal muscle. *J Physiol* 1959; 149:93-111.

Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005;46:998-1003, doi:10.1161/01.HYP.0000176238.90688.6b.

Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. *Am J Physiol* 2002; 282:H977-82, doi:10.1152/ajpheart.00693.2001.

Jensen LT, Hørslev-Petersen K, Toft P, Bentsen KD, Grande P, Simonsen EE, Lorenzen I. Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation* 1990; 81: 52-57, PMID: 2297848.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 23:12735-40, doi:10.1073/pnas.97.23.12735.

Kim JW, Seo HS, Park JH, Na JO, Choi CU, Lim HE, Kim EJ, Rha SW, Park CG, Oh DJ. A prospective, randomized, 6-month comparison of the coronary vasomotor response associated with a zotarolimus-versus a sirolimus-eluting stent: Differential recovery of coronary endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1653–9, doi:10.1016/j.jacc.2009.01.051.

Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1352-1356, doi: 10.1016/S0735-1097(98)00101-6.

Keller G.-A, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:7381–7385; PMID:1651504.

Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 2005; 101:1275-87, doi:10.1213/01.ANE.0000180999.81013.D0.

Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays* 2004; 6:608-15, doi:10.1002/bies.20049.

Kim JW, Seo HS, Park JH et al. A prospective, randomized, 6-month comparison of the coronary vasomotor response associated with a zotarolimus-versus a sirolimus-eluting stent: Differential recovery of coronary endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1653–9.

Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 4:1349-53, doi:10.1006/bbrc.2002.6355.

Kingwell, BA, Sherrard B, Jennings G, Dart AM. Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol* 1997;. 272:H1070-77, PMID:9087577.

Kitano D, Takayama T, Nagashima K, Akabane M, Okubo K, Hiro T, Hirayama A. A comparative study of time-specific oxidative stress after acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *BMC cardiovascular disorders* 2016; 1:1-16, doi:10.1186/s12872-016-0259-6.

Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. *Circ Res* 1996; 76:544-50, PMID 7534658.

Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:1552-1562, doi:10.1161/ATVBAHA.111.224915.

Konturek SK, Konturek PC. Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion* 1995; 53:1-13, PMID:7895925.

Kurjiaka DT, Bender SB, Nye DD, Wiehler WB, Welsh DG. Hypertension attenuates cell-to-cell communication in hamster retractor muscle feed arteries. *Am J Physiol Heart Circ* 2005; 288:H861-H870, doi:10.1152/ajpheart.00729.2004.

Lassègue B, San Martín, A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012; 110:1364-1390, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243972.

Laughlin MH, McAllister RM. Exercise training-induced coronary vascular adaptation. *J Appl Physiol* 1992;73:2209-25, PMID:1490929.

Lee S, Roh WS, Jang JS, Bae CH, Park KS, Lee JT. The change of vascular reactivity in rat thoracic aorta 3 days after acute myocardial infarction. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 42:576-87, doi:10.4097/kjae.2014.66.2.143.

Lie M, Sejersted OM, Kiil F. Local regulation of vascular cross section during changes in femoral arterial blood flow in dogs. *Circ. Res* 1970; 27:727-37, PMID:5486244.

Lowry O, Rosebrough N. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275

Madak-Erdogan Z, Gong P, Zhao Y, Xu, L, Wrobel KU, Hartman JA, Twaddle NC. Dietary licorice root supplementation reduces diet-induced weight gain, lipid deposition, and hepatic steatosis in ovariectomized mice without stimulating reproductive tissues and mammary gland. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60:369-380, doi:10.1002/mnfr.201500445.

Mansur AP, Souza MFM, Timerman A, Ramires JAF. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias, cerebrovasculares e isquêmicas do coração em 11 capitais do Brasil, de 1980 a 1998. *Arq Bras Cardiol* 2002; 79: 269-76.

Marchionni N, Fattirolli F, Fumagalli S, Oldridge N, Del Lungo F, Morosi L, Burgisser C, Masotti G. Improved exercise tolerance and quality of life with cardiac rehabilitation of older patients after myocardial infarction: results of a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003; 107: 2201-2206 doi: 10.1161/01.CIR.0000066322.21016.4A.

Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appela E, Oppenheim JJ, Matsushima K. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J* 1988; 2:3087– 3091; PMID:3263930.

Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin.Chim. Acta* 1982; 126:41–51.

Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann. Rheum. Dis* 1986; 45:847– 851, PMID:3789819.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27:14-8, PMID:8591877.

Mayes PA. Biologic oxidation. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): Harper's biochemistry. San Mateo, Appleton & Lange 1990; 105-11.

McAfee M, Hashimoto H, Pearson PJ, Schaff HV. Endothelial dysfunction following global cardiac ischemia and reperfusion. *Surg. forum* 1990; 41: 301-11

Meggs LG, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ, Anversa P. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1993; 72:1149–1162, PMID:8495545.

McCann SK, Roulston CL. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sci.* 2013; 3:561-98.

Melchert RB and Welder AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27:1252–1262.

Mendis S, Puska P, Norvving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organ 2011;

Mesquita ET, Socrates J, Rassi S, Villacorta H, Mady C. Insuficiência cardíaca com função sistólica preservada. *Arq Bras Cardiol* 2004, 82:494-500, ISSN 1678-4170.

Mill, JG & Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens* 2001, 8:18-29.

Mombouli J, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:61-74.

Moraes RS, NóbREGA AD, Castro RD, Negrão CE, Stein R, Serra, SM. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz de reabilitação cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2005, 84(5), 431-40.

Murdoch CE, Chaubey S, Zeng L, Yu B, Ivetic A, Walker SJ, Brewer AC. Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction

through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 2734-2741, doi:10.1016/j.jacc.2014.02.572

Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. *Harvard University Press* 1996.

Myers J, Gianrossi R, Schwitzer J, Wagner D, Dubach P. Effect of exercise training on postexercise oxygen uptake kinetics in patients with reduced ventricular function. *Chest* 2001; 120:1206-1211, doi: 10.1378/chest.120.4.1206.

Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, Yamamoto M, Miyaji K, Saito H, Morita H, Emori T, Matsubara H, Toyokuni S, Ohe T. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation* 2002; 105:2867-2871, doi: 10.1161/01.CIR.0000018605.14470.DD.

Normandim EA, McCusker C, Connors M, Vale F, Gerardi D, ZuWallack RL. An evaluation of two approaches to exercise conditioning in pulmonary rehabilitation. *Chest* 2002; 121: 1085-91.

Obata JE, Nakamura T, Kitta Y et al. Treatment of acute myocardial infarction with sirolimus-eluting stents results in chronic endothelial dysfunction in the infarct-related coronary artery. *Circ Cardiovas Interv* 2009; 2: 384–91, doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.821371

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ J* 2002; 66: 851-6, PMID:12224825.

Parker JL, Oltman, JM, Muller Myers PR, Adams HR, Laughlin MH. Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26:1252-61, PMID:7799768.

Paul M, Mehr ALIP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 2006; 86:747–803, doi:10.1152/physrev.00036.2005.

Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res* 1990; 67: 385-93, PMID:2115821.

Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990; 81: 1921-27.

Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ; ExTraMATCH Collaborative. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *Br Med J* 2004. 24; 328: 189. doi:10.1136/bmj.37938.645220.EE.

Pontes MRN & Leães PE. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento." *Rev Soc Cardiol* 2004; 13:1-7.

Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31: 987-97.

Qin, F, Lu Y, He X, Zhao M, Bi X, Yu X, Liu J, Zang W. Pyridostigmine prevents peripheral vascular endothelial dysfunction in rats with myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014; 41: 202-209, doi:10.1111/1440-1681.12198.

Raad, H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El-Benna J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J* 2009; 23:1011-1022, doi:10.1096/fj.08-114553.

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

Rovere MT, Bersano C, Gnemmi M, Specchia G, Schwartz PJ. Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: 945-949, doi: 10.1161/01.CIR.0000027565.12764.E1.

Rowlands DS, Downey B. Physiology of triathlon. In: Garrett WE Jr, Kirkendall DT, editors. Exercise and sport science. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 921-2

Russell B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1127-32, PMID:10710412.

Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45:704-712.

Schneider, C. D., & Oliveira, A. R. D. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10: 308-313.

Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 7-16, PMID:2066646.

Seccombe JF, Schaff HV. Reperfusion injury. In: Vasoactive Factors Produced By The Endothelium: Physiology and Surgical Implications. Austin: R.G. Landes 1994; 27-41

Sessa, WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem* 1992; 267:15274-76, PMID:1379225.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* 1994; 74:34953, PMID:7507417.

Silva EGD, Dourado VZ. Treinamento de força para pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev Bras Med Esporte* 2008; 231-238, ISSN 1806-9940.

Silva FL, Mazzotti NG, Picoral M, Nascimento DM, Martins MIM, Klein AB. Infarto do miocárdio experimental e aumento do estresse oxidativo em diafragma de ratos. *J Bras Pneumol* 2005; 31:506-10.

Silva H, Rosado C, Antunes J, Rodrigues LM. Exploring human in vivo microcirculation with methyl nicotinate in different perfusion conditions. *Biomed Biopharm Res.* 2014; 2: 207-214.

Sirker A, Murdoch CE, Protti A, Sawyer GJ, Santos CX, Martin D, Zhang X, Brewer AC, Zhang M, Shah AM. Cell-specific effects of Nox2 on the acute and chronic response to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; ;98:11-7, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.07.003.

Souza Junio TPD, Asano RY, Prestes J, Sales MPMD, Coelho JMDO, Simões HG. Nitric oxide and exercise: a short review. *Rev Educ Fís/UEM* 2012; 23:469-481.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-530, PMID:11909815.

Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR.. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimension and function. *Circ Res* 1999;85:364-376, PMID:10455065.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90:520– 530, PMID:11909815

Staessen J, Fagard R, Hespel P, Lijnen P, Vanhees L, Amery A. Plasma renin system during exercise in normal men. *J Appl Physiol* 1987; 63: 188-194 PMID: 3305466.

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981- 88, PMID:10869273

Teich V, Araujo DV. "Estimativa de custo da síndrome coronariana aguda no Brasil." *Rev Bras Cardiol* 2011; 24:85-94.

Timerman A, Mansur AP. Epidemiologia das doenças cardiovasculares. *Rev da soc cardiol do Estado de São Paulo* 2006; 1:16.

Torrezan R, Gomes RM, Ferrarese ML, Melo FBHD, Ramos A, Mathias P C, Scomparin DX. Treatment with isoflavones replaces estradiol effect on the tissue fat accumulation from ovariectomized rats. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008, 52:1489-1496, PMID:19197458.

Tziakas DN, Chalikias GK, Xatseras DI. Neurohormonal Hypothesis in Heart Failure. *Hellenic J Cardiol* 2003;44:195–205.

Usal A, Acartürk E, Yüregir GT, Unlükurt I, Demirci C, Kurt HI, Birand A. Decreased glutathione levels in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J* 1996; 37: 177-182 PMID: 8676544.

Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1990; 265:2856–2864; PMID:2406241.

Vona M, Rossi A, Capodaglio P, Rizzo S, Servi P, De Marchi M, Cobelli F. Impact of physical training and detraining on endothelium-dependent vasodilation in patients with recent acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 147:1039-1046, doi:10.1016/j.ahj.2003.12.023.

Wade CE, Claybaugh JR. Plasma renin activity, vasopressin concentration, and urinary excretory responses to exercise in men. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1980; 49: 930-936 PMID: 7002889.

Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ. Res.* 1993; 73:829-38, PMID:8403254.

Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 6:37-50, PMID:2485029.

Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, et al. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78:186, PMID:2968197.

Weisiger, R. A.; Fridovich, I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248:4793–4796; PMID:4578091.

Weseler, AR, Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Current hypertension reports* 2010; 12:154-161, doi:10.1007/s11906-010-0103-9.

Wong GHW, Goeddel DV. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988; 242:941–944, PMID:3263703.

Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, Wilson B, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 114-122 doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.10.004.

Xu X, Zhao W, Wan W, Ji LL, Powers AS, Erikson JM, Zhang JQ. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Exp physiol* 2010; 95:1008-15, doi:10.1113/expphysiol.2010.054221.

Yengo CM, Zimmerman SD, McCormick RJ, Thomas DP. Exercise training post-mi favorably modifies heart extracellular matrix in the rat. *Med Sci Sport Exerc* 2012; 44:1005-1012, doi:10.1249/MSS.0b013e318244bc8a.

Yücel D, Aydoğdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Seneş M, Ciğdem Topkaya B, Nebioğlu S. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998; 44: 148-154, PMID: 9550572.

Zdanowicz MM. Congestive Heart failure. *Am J Pharm Educ* 2002; 66: 180-5.

Zheng A, Moritani T. Influence of CoQ10 on autonomic nervous activity and energy metabolism during exercise in healthy subjects. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54: 286-290, PMID: 18797149.