

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DESPORTOS – CEFID
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

CLEBER AURINO DE PINHO

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE METABOLISMO OXIDATIVO VENTRICULAR EM RATOS
SUBMETIDOS AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2011**

CLEBER AURINO DE PINHO

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE METABOLISMO OXIDATIVO VENTRICULAR EM RATOS
SUBMETIDOS AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Comitê Científico do Curso de Pós-Graduação – Mestrado em Ciência do Movimento Humano, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Movimento Humano.

Orientador: Prof. Dr. Magnus Benetti

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

**FLORIANÓPOLIS – SC
2011**

CLEBER AURINO DE PINHO

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE METABOLISMO OXIDATIVO VENTRICULAR EM RATOS
SUBMETIDOS AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA A PROVA ESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO.

Florianópolis, 28 de Março de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Magnus Benetti (Orientador)
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Fabrizio Caputo
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dra. Deborah de Camargo Hizume
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Dedico este trabalho a meu pai Aurino e
minha mãe Maria Conceição, pessoas
que me ensinaram à razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre presente nos momentos de alegrias e tristezas.

Ao meu orientador Dr. Magnus Benetti, pessoa que me deu a oportunidade de concretizar esse sonho profissional.

Agradecer a meu pai Aurino e minha mãe Maria Conceição, que de onde estiverem, sei que estarão olhando por mim. Devo a eles um muito obrigado, por ter me dado educação e muito amor. AMO VOCÊS!

A todos meus irmãos, Aurino, Luis, Ricardo e Humberto, esses caras são simplesmente sem palavras. Foram pessoas de fundamental importância após a perda de nossos pais para que eu pudesse concluir essa etapa de minha vida.

A minha namorada Sylvia, que esteve ao meu lado em toda construção desse trabalho por dias, tardes e noites. Com muito carinho me incentivou em todos os momentos.

Aos colegas do Lafibe, Douglas, Guilherme, Débora e Camila, sem vocês esse trabalho não seria realizado. Foram tardes, noites e até madrugadas para que tudo ocorresse da melhor forma possível. GALERA, VOCÊS SÃO DEMAIS!

Aos grandes companheiros, Paulo e Luciano, dois caras que são verdadeiros amigos. Pessoas que sempre estão prontas para ajudar. Foram muitos dias de trabalho, encontros, futebol, festas e tantos outros, tudo isso serviu para que hoje sejamos grandes amigos.

Aos meus amigos do Ribeirão da Ilha, Junior, Sara, Fernanda, Gilberto, Cris, Diego e Regi. Essas pessoas foram muito importantes nesses dois anos de mestrado, pois estavam sempre a minha espera nos finais de semana de braços abertos, agradeço por ter vocês como se fossem meus irmãos. VALEU GALERA!

Por último, agradecer ao meu Co-orientador, amigo e irmão, Ricardo Pinho. Pessoa que me ajudou nesses dois anos de mestrado com muito afinco, mostrando-me o verdadeiro caminho do sucesso. Mano, só posso-te dizer que tenho enorme respeito e admiração por você, te desejo toda felicidade e sucesso do mundo. OBRIGADO!

“Quando você tem uma meta, o que era obstáculo passa a ser uma das etapas do seu plano.”

Gerhard Erich Boehme

RESUMO

As doenças cardiovasculares se destacam como a principal causa de morte no Brasil e o exercício físico é considerado como um importante agente tanto na prevenção quanto no tratamento dessas doenças. Entretanto, os estudos ainda são controversos quanto ao tipo e à intensidade de esforço necessária para provocar alterações bioquímicas protetoras significativas. Verificar os efeitos de dois protocolos de exercício sobre parâmetros do metabolismo oxidativo ventricular em ratos pós-infarto. Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos, dois meses de idade, pesando entre 200-250g e divididos randomicamente em 2 grupos (n=18): Sham e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Os animais foram anestesiados e induzidos ao IM por oclusão da coronária. Trinta dias após a indução do IAM os animais foram divididos em 6 subgrupos (n=6): Sham, Sham + treinamento contínuo (60 minutos), Sham + treinamento fracionado (10 x 5 minutos com 1 minuto de intervalo), IAM, IAM + treinamento contínuo e IAM + treinamento fracionado. As sessões de exercício foram realizadas na água (30-32°C), 5 vezes por semana, durante 6 semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais foram mortos por decapitação, o ventrículo esquerdo foi cirurgicamente removido e armazenado em freezer -80°C para análises de estresse oxidativo (atividade e expressão de enzimas antioxidantes e danos oxidativos em lipídeos e proteínas) e metabolismo oxidativo (complexos da cadeia respiratória). Após o infarto do miocárdio, a produção de superóxido reduziu significativamente em ambos os modelos de treinamento. A atividade e a expressão da SOD não foram alteradas pelos treinamentos, mas a CAT aumentou sua expressão com o treinamento contínuo e a expressão da GPX reduziu em ambos os grupos treinados coincidindo com o aumento de sua atividade. Os danos em lipídeos reduziram apenas no grupo submetido ao treinamento contínuo enquanto que os danos em proteínas somente no grupo com treinamento fracionado. Citocromo C aumentou em ambos os grupos enquanto PGC1-alfa teve sua expressão aumentada no grupo submetido ao treinamento contínuo. HIF-1 reduziu significativamente com ambos os protocolos de treinamento. Esses resultados sugerem uma melhora significativa no estado redox do miocárdio de ratos submetidos ao IAM e expostos a diferentes modelos de treinamento.

Palavras-chave: Coração. Exercício. Estresse oxidativo. Infarto. Metabolismo oxidativo. Radicais livres.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a major cause of death in Brazil and physical exercise is considered an important agent in the prevention and treatment of these conditions. Studies related to the type, intensity and volume of physical training required to trigger biochemical protective material are still controversial. This study investigated the effects of two exercise protocols on parameters of ventricular oxidative metabolism in rats after myocardial infarction. Thirty-six male Wistar rats of two months were divided randomly into two groups (n = 18): Sham and Acute Myocardial Infarction (AMI). The rats were anesthetized and the AMI was induced by coronary artery occlusion. Thirty days after AMI induction, the rats were subdivided into six groups (n = 6): Sham, Sham + continuous training (SCT, 60 minutes), Sham + fractionated training (10x5 min with 1 minute interval), AMI, AMI + continuous training and AMI + fractionated training. The exercise sessions were conducted in water (30-32 ° C), 5 times/wk for six-wk. Forty-eight hours after the last exercise session, the rats were killed and the left ventricle was surgically removed and stored at -80 ° C for analysis of oxidative stress (activity and expression of antioxidant enzymes and oxidative damage to lipids and proteins) and oxidative metabolism (respiratory chain proteins). After AMI, superoxide production decreased significantly in both training models. The activity and expression of superoxide dismutase didn't change by training, but there was an increase on catalase levels in the continuous training group. Glutathione peroxidase decreased in both groups. The damage in lipids decreased only in the continuous training group while the protein damage was reduced in the fractionated training group. Cytochrome C increased in both groups, and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator increased in the group under continuous training. The hypoxia-inducible factor was significantly reduced with both training protocols. These results suggest a significant improvement in the redox state of the myocardium of AMI-induced rats exposed to different training models, but the continuous training seems to be more efficient for the evaluated parameters.

Key-words: Free radicals. Heart. Myocardial infarction. Oxidative metabolism. Oxidative stress. Physical exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS

$1O_2$: oxigênio singlete

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: adenina triposfato

CAT: catalase

NF- κ B :factor nuclear kappa B

IC: Insuficiência Cardíaca

DAC: doença arterial coronariana

DNA: ácido desoxirribonucléico

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

LOO \cdot : radical peroxila

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

GPX: glutathiona peroxidase

GSH: glutathiona reduzida

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada

NO: óxido nítrico

NOS:óxido nítrico sintase

NOx: nitrito/nitrato

O₂ \cdot^- : ânion superóxido

O₂: oxigênio

OH \cdot : radical hidroxil

RL: radical livre

RLO: radical livre de oxigênio

ROOH: hidroperóxido orgânico

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa
VO₂máx: volume máximo de Oxigênio
XO: xantina oxidase
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
IL1: Interleucina 1
GMPC: Guanosina monofosfato cíclico
IAM: Infarto Agudo do Miocárdio
Ca⁺: Cálcio
Fe⁺²: Ferro II
Cu: Cobre
MDA: Malondialdeído
LOOH: hidroperóxido de lipídeo
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
OMS: Organização Mundial da Saúde
8-OhdG: 8-hidroxideoxiguanosina
HO•: Radical hidroxil
H₂O: Água
HIF-1-alfa: Fator Indutor de Hipóxia-1-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DESORDENS CARDIOVASCULARES	13
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.3 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E PRODUÇÃO DE ERO	16
1.3.1 Aumento na produção radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial:.....	17
1.3.2 Ativação da xantina oxidase (XO):	17
1.3.3 Ativação da NADPH oxidase:.....	18
1.4 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	19
1.5 EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE OXIDATIVO E INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MÉTODOS	24
3.1 AMOSTRA	24
3.2 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	25
3.3 INDUÇÃO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM).....	25
3.4 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO.....	25
3.5 CONTROLE DO TREINAMENTO	26
3.6 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	26
3.7 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	24
3.8 PROCEDIMENTOS PARA MINIMIZAR, ELIMINAR OU PROTEGER O DESCONFORTO OU RISCO CAUSAL DO ANIMAL	26
3.9 PREPARAÇÃO DO TECIDO WESTERBLOTING	27
4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	27
4.1. PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO:	27
4.2. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES:.....	27
4.3. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS:	28
4.4. MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS:.....	29
4.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS:	29
5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	30
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSSÃO	35
8. CONCLUSÕES	40
9. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo a Síntese de Indicadores Sociais de 2002, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as doenças cardiovasculares se destacam como a principal causa de mortes no país (28,8% para homens e 36,9% para mulheres), em todas as regiões e estados (IBGE, 2002). A região Sul e o estado do Rio Grande do Sul, em particular, registram as maiores proporções, sendo responsáveis por 40% das mortes de mulheres (IBGE, 2002). Num total de 1.006.375 de óbitos por qualquer causa, 6,4% foram por infarto agudo do miocárdio (IAM), somente no ano de 2005. O número de internações hospitalares por insuficiência cardíaca (IC) foi de 293.473, cerca de 2,6% de todas as internações hospitalares, ocorridas somente no ano de 2007 (Data SUS, 2008).

De acordo com Franco & Matos (2005), o fumo, a obesidade, o *diabetes mellitus*, a hipertensão, os níveis elevados de colesterol, a história familiar de doenças cardiovasculares e a falta de exercícios aumentam o risco da doença. Adicionalmente, a presença desses fatores de risco para a Insuficiência Cardíaca (IC) induz a um grande número de mudanças prejudiciais à biologia vascular e muscular cardíaca, incluindo a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), aumento da formação de radicais livres de oxigênio (RLO) e aumento da atividade endotelial (Steinberg, 1991; Lerman et al., 1993; Tsao et al., 1998).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), pelo menos 20 milhões de pessoas sobrevivem a infartos e a acidentes vasculares encefálicos a cada ano, porém, requerem cuidados clínicos contínuos tendo com isto, alto custo para os sistemas de saúde segundo a Organização Mundial da Saúde (*WHO. Cardiovascular Disease: Prevention and Control, 2006*). Nos Estados Unidos o custo final da morbidade e perda de produtividade gerado, a partir das doenças cardiovasculares, em média foi de 33,6 bilhões de dólares, dados levantados pela *American Heart Association*¹.

Embora o objetivo principal dos tratamentos para pós-infartados seja o prolongamento da vida através da redução de sintomas, tem sido observado que, com o agravamento do quadro clínico, sintomas físicos como fadiga e dispnéia tem papel limitante com prejuízo progressivo da capacidade funcional de pacientes pós-infartados.

Os efeitos benéficos do exercício físico regular sobre a função cardiovascular vêm sendo demonstrados em experimentos com animais e humanos (Goto et al., 2003, Silva et al., 2011 e Wisløff et al., 2007). Entretanto, a literatura ainda é controversa quanto ao tipo e à intensidade de esforço necessário para provocar alterações bioquímicas protetoras significativas.

Sendo assim, o entendimento dos processos bioquímicos que ocorrem são altamente relevantes na escolha de uma abordagem terapêutica mais global e efetiva.

1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DESORDENS CARDIOVASCULARES

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das espécies reativas de oxigênio (ERO) é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, pela qual de 95% a 98% do oxigênio consumido é reduzido à água e o restante forma ânion superóxido, um importante Radical Livre (RL) em sistemas biológicos. Entretanto, as ERO podem ser geradas em outros eventos bioquímicos na célula, por exemplo, em processos inflamatórios, na grande quantidade de metabolização de gordura pela beta-oxidação, degradação da xantina a ácido úrico e auto-oxidação de catecolaminas. Embora esses processos sejam normais para a atividade de regulação celular, a produção excessiva de ERO, mais especificamente de RL, pode induzir alterações biomoleculares, entre elas ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos que, em grande extensão, podem levar à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A geração de RL nem sempre é prejudicial ao organismo, pelo contrário, é necessária em vários processos biológicos, como na sinalização celular, contração muscular e sistema imune (Matsuo & Kaneko, 2001). Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser RL), elas acabam produzindo RL para combater esses agentes. O grande problema é que, quando os níveis totais gerados de RL forem maiores que a capacidade de defesa, podem ocorrer danos celulares significativos, processo conhecido como estresse oxidativo que resulta na oxidação de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, induzindo doenças como, por exemplo, aterosclerose e câncer (Halliwell & Guteridge, 2007).

As principais fontes de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) com aceitável relevância fisiológica nas doenças cardiovasculares são: aumento na atividade da NADPH oxidase, NOS (eNOS desacoplada e iNOS), mieloperoxidase, xantina oxidase, lipoxigenase/ciclooxigenase, e aumento na cadeia respiratória (Singh & Jialal, 2006). Adicionalmente, a modificação oxidativa de lipoproteínas circulatórias por ERO, particularmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), parece ser bastante importante para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, principalmente a oxidação em particular de ácidos graxos poliinsaturados na LDL que parece ocorrer dentro das lesões ateroscleróticas. (Antoniades et al., 2003; Singh & Jialal, 2006). A oxidação de LDL leva a uma citotoxicidade endotelial que estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-1, inibe a atividade da eNOS, promove vasoconstrição e adesão celular, e aumenta a agregação plaquetária (Sánchez-Quesada et al., 1997; Singh & Jialal, 2006).

A inativação de óxido nítrico leva à perda dos efeitos protetores do NO, como regulação do tônus arterial, inibição da inflamação local e coagulação, e da proliferação celular (Antoniades et al., 2003). O mecanismo pelo qual o NO impede a formação da molécula de LDL-ox se dá por meio de sua ação antioxidante, impedindo a formação de ânions superóxidos, que promovem a oxidação da molécula de LDL colesterol. A ação antiagregante do NO é devida a sua ligação com a molécula de guanilatociclase, a qual induz a formação de guanilato monofosfato cíclico (GMPc), que promove a redução da concentração de íons cálcio dentro da plaqueta, inibindo sua ativação e agregação (Zago & Zanescio, 2006).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo está relacionado a situações onde os mecanismos celulares pró-oxidantes (produção de ERO e ERN) superam os mecanismos de defesa, incluindo os sistemas enzimáticos e outros antioxidantes. É um estado em que há uma elevada produção de espécies reativas. Este estado está comumente ligado a fisiopatologia de diversas doenças dado os danos celulares como, por exemplo, peroxidação de lipídios, fragmentação de proteínas e ácidos nucléicos (Valko et al., 2007). A regulação

adaptativa dos sistemas de defesa pode proteger, parcialmente ou totalmente, a célula contra os danos oxidativos, mas pode também levar a danos teciduais e eventualmente a morte celular por necrose ou apoptose (Dalle-Donne et al., 2003). Portanto, caso não haja nenhum mecanismo de defesa eficiente, esse estado pode trazer prejuízos significativos à saúde.

Já se reconhece que o aumento do estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de doenças cardiovasculares, e estudos clínicos e ou experimentais têm sugerido que essas doenças estão associadas com os danos oxidativos na célula cardíaca decorrente do aumento da formação de RL e/ou da redução das defesas antioxidantes (Lorgeril et al., 2001).

Um alvo clássico da ação dos RL em situação de estresse oxidativo são os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas. A oxidação desses ácidos graxos e a lipoperoxidação geram intermediários que podem sofrer quebras formando hidrocarbonetos de cadeia curta (etano, pentano), aldeídos (como o malonaldeído, 4-hidroxinonenal), epóxidos e outros produtos altamente citotóxicos. Como resultado da lipoperoxidação as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostase e morte celular (Matsuo & Kaneko, 2001).

Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), a lipoperoxidação consiste em 3 fases: iniciação, propagação e término. Na fase de iniciação (1), o radical RL remove hidrogênio do ácido graxo insaturado produzindo um radical de lipídeo (\dot{L}), que ao reagir com o oxigênio molecular forma o radical peroxila ($LOO\dot{}$). Na propagação (2) o $LOO\dot{}$ retira hidrogênio de outro lipídeo, formando o hidroperóxido de lipídeo ($LOOH$) e assim sucessivamente. Na fase terminal (3), os radicais produzidos se combinam formando um não-radical. O $LOOH$ pode sofrer outras reações produzindo aldeídos e alcanos.

As proteínas também são alvos de ataque dos RL. A oxidação dos aminoácidos resulta na formação de grupos carbonilas, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína. Especificamente, os grupos carbonila são formados principalmente a partir da oxidação de alguns aminoácidos mediados por ERO, como lisina, argenina, prolina e treonina. Porém, reações secundárias de cadeias

laterais de alguns aminoácidos (cisteína, lisina e histidina) com sub-produtos da lipoperoxidação e da oxidação de carboidratos, também formam grupos carbonil (Dalle-Donne et al., 2003).

Está bem estabelecido que a oxidação de proteínas depende dos níveis de proteossomas intracelulares. De acordo com Dalle-Donne et al.,(2003), os danos em proteínas mediados por RL e o acúmulo de proteínas oxidadas levam a um concomitante aumento na oxidação de proteínas, reduzindo a degradação de proteínas oxidadas. Proteases intracelulares são responsáveis por 70% a 80% da degradação de proteínas após a oxidação e esse mecanismo é essencial para os sistemas de reparo e antioxidante. Assim, o proteossoma constitui uma parte importante do sistema de defesa antioxidante.

Outro alvo muito importante dos RL é o DNA. A formação de RL próximo ao DNA pode resultar na oxidação de bases de pirimidina e purina, e quebras na fita. Dentre as bases, a guanina é altamente sensível à oxidação (formação de 8-hidroxideoxiguanosina, 8-OhdG) mediado por RL. Essas alterações no DNA têm sido associadas com processos mutagênicos e carcinogênicos (Matsuo & Kaneko, 2001).

1.3 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E PRODUÇÃO DE ERO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca (Leonardo et al, 1998). De acordo com Grieve et al., (2004), o IAM é frequentemente seguido por vários semanas ou até mesmo meses de uma série de alterações na estrutura cardíaca, na função, na geometria e volume, coletivamente conhecido como remodelamento cardíaco. Nesse processo, é evidente o papel do estresse oxidativo tanto em modelos animais (Hill et al., 1996; Powers et al., 2008, Tavares et al., 2010) quanto em humanos (Fan et al., 2010).

As mudanças estruturais no ventrículo esquerdo não estão restritos à área lesionada, mas também envolvem miocárdio em toda sua extensão. Em particular, há alterações substanciais no volume, composição e organização da matriz extracelular durante um período de semanas e meses após o IAM, que inicialmente são respostas

adaptativas para normalizar a tensão na parede e manutenção função contrátil. No entanto, um aumento da fibrose intersticial, perda progressiva do colágeno e outros danos no miócito levam a várias anormalidades, incluindo: dilatação ventricular progressiva, aumento da tensão na parede, disfunção diastólica, arritmia, diminuição da fração de ejeção e insuficiência cardíaca (Pfeffer e Braunwald, 1990).

Embora o papel das ERO e ERN e os mecanismos pelos quais essas espécies modulam o remodelamento cardíaco ou fases desses remodelamento ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que uma proporção significativa de ERO produzidas imediatamente após o IAM geram uma infiltração de células inflamatórias que contribui substancialmente para o estresse oxidativo. Conforme Griendling et al., (2000) várias são as fontes na produção de ERO e ERN em células cardíacas induzidas pelo IAM como cadeia respiratória mitocondrial, ativação de xantina oxidase e NADPH oxidase, oxidação de lipoxigenase, oxigenase-heme e do citocromo P450 mono-oxigenases. Destes, as mitocôndrias e ativação da xantina oxidase e NADPH oxidase são as principais fontes de ROS durante a progressão de doença cardíaca.

1.3.1 Aumento na produção radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial:

Durante a respiração celular, na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio molecular é completamente reduzido à água. A molécula de oxigênio pode aceitar um total de quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, mas pode, também, ser reduzida por um elétron por vez, levando à produção de ERO (Matsuo e Kaneko, 2001). Dois a cinco por cento do oxigênio utilizado nesse processo resulta na produção de superóxido e sugere-se que essa produção ocorra principalmente nos complexos I (NADPH-ubiquinona oxidoreductase), Coenzima Q e complexo III (citocromo c) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.3.2 Ativação da xantina oxidase (XO):

A XO catalisa a degradação do monofosfato de adenosina (AMP) durante o trabalho muscular isquêmico, levando ao aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$. Durante a isquemia, o AMP, formado do ATP (trifosfato de adenosina) pela reação de adenilato quinase, é

degradado para hipoxantina. A XO é convertida e, dessa forma, reduzida para xantina desidrogenase durante a isquemia por proteases intramusculares, as quais necessitam de Ca^+ . A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico usando o oxigênio molecular como receptor de elétrons, formando assim o $\text{O}_2^{\bullet-}$. (Matsuo e KaneKo, 2001). Em condições aeróbicas, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina e a xantina sejam, primeiramente, convertidas para ácido úrico por meio da xantina desidrogenase. Além disso, o músculo esquelético tem baixa atividade da XO. Todavia, a XO pode ser um importante caminho quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação, teoricamente, pode acontecer em situação isquêmica, exercício isométrico, alta velocidade, déficit de O_2 e exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (Haliwel e Guteridge, 2007).

1.3.3 Ativação da NADPH oxidase:

O dano muscular leva à formação de várias células do sistema imune que realizam um rápido consumo de oxigênio, processo conhecido como “respiratory burst”. Esse processo é uma das fontes de formação de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, ácido hipocloroso e peroxinitrito. Quando ativada pela presença de neutrófilos, por exemplo, a NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio, resultando na produção de superóxido. As ERO produzidas por neutrófilos são geradas para destruir bactérias invasoras e remover tecidos danificados, resultando da migração de neutrófilos vindos dos tecidos endoteliais (mediada por catecolaminas) e da medula óssea (mediada pelo cortisol) (Trevor & Sandy, 2001). Isso faz com que sejam removidas proteínas e células danificadas e também células mortas. Embora isso seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido a um grande aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (interleucinas 1, 6, 8, TNF-alfa) e prostaglandinas, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório adicional, aumentando a produção de ERO que são ativadores de fator transcrição NF-kB (Mastaloudis et al., 2004).

Em contraste com a NADPH oxidase ativadas por neutrófilos, a NADPH oxidase não-fagocítica do sistema cardiovascular são constitutivamente ativas e continuamente produzem baixos níveis de superóxido. Entretanto, Conforme Griendling et al., (2000), a NADPH oxidase cardiovascular tem a capacidade de produzir uma elevada quantidade de superóxido em resposta a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos, que pode ser mantido durante minutos ou horas. A produção de superóxido pelo NADPH oxidases em células cardiovasculares ocorre tanto intra quanto extracelular, em contraste com os neutrófilos, onde é principalmente em locais confinados extracelular.

Mesmo que ERO e ERN induzidas pelo IAM induza a uma alteração significativa na função de células cardíacas, estudos recentes mostram que a utilização terapêutica de determinadas substâncias químicas ou naturais e do exercício físico regular podem tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de reparos antioxidantes (Frederico et al., 2009; Punithavathi et al., 2011; Silva et al., 2011).

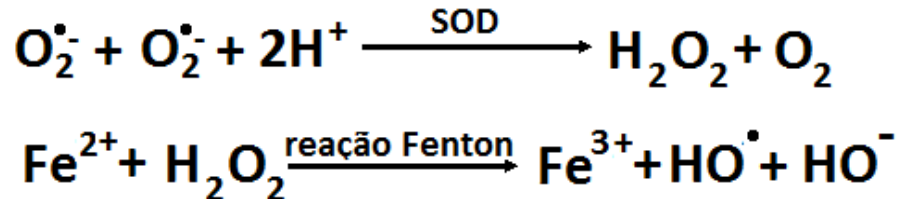
1.4 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

A produção contínua de RL durante os processos metabólicos leva as células a desenvolverem mecanismos de defesa que controlam os níveis de RL e impedem a indução de danos oxidativos, os antioxidantes. A preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os RL se tornou essencial à compreensão de algumas etiopatogenias (Shami & Moreira, 2004). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos de defesa.

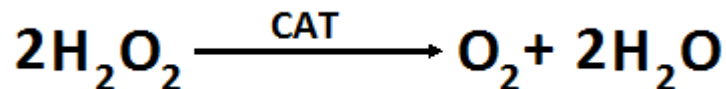
De acordo com Halliwell & Gutteridge (2007), esse sistema de defesa pode atuar de forma associada ou independente por duas vias:

- 1) Ativação de enzimas antioxidantes: as principais enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) que são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de ERO.

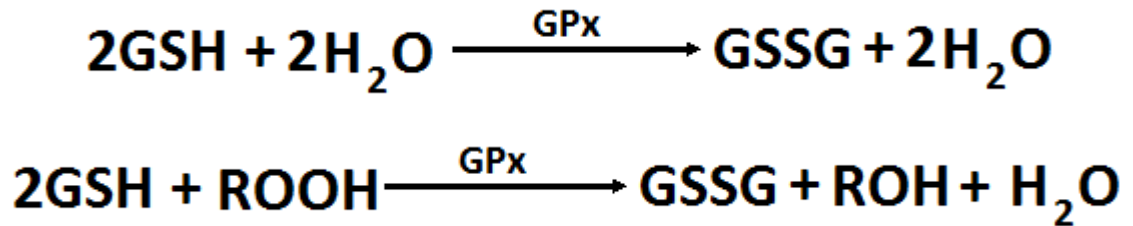
A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Hollander et al., 2000). Está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. Embora o $O_2^{\bullet-}$ não seja altamente danoso, pode extrair elétrons de diversos componentes celulares, causando reações em cadeia de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 2007). O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Quando um metal (Fe^{+2} ou Cu) é catalisado pela reação de Fenton ou Haber-Weis entre a dismutação de superóxido para H_2O_2 , é formado o hidroxil (HO^{\bullet})



A enzima catalase catalisa a degradação do H_2O_2 . Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água (Chance et al., 1979). Está localizada, principalmente, no peroxissoma; entretanto, outras organelas, como as mitocôndrias, podem conter alguma atividade. A catálise do H_2O_2 é importante, pois, na presença de Fe^{2+} , leva à formação de radical hidroxil (OH^{\bullet}) (reação de Fenton), altamente reativo e danoso às biomoléculas.



A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutatona (GSH) como doador de elétrons (Flohé & Gunzler, 1984). Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial.



2) Antioxidantes biológicos não-enzimáticos: são constituídos por antioxidantes hidrossolúveis que incluem glutathiona (GSH), ácido ascórbico e ácido úrico e antioxidantes lipossolúveis que incluem alfa-tocoferol, ubiquinóis e carotenóides.

De acordo com Ascenção et al., (2007), o metabolismo cardíaco apresenta duas características importantes que favorecem a produção de ERO e ERN: (i) elevado volume e sensidade mitocondrial, e (ii) a alta taxa de fornecimento de oxigênio para mitocôndrias. Porém, diante da elevada taxa de consumo de oxigênio e consequente produção de espécies reativas, o miocárdio apresenta um potencial sistema antioxidante limitado em relação a outros tecidos, como por exemplo o sóleo, que possui características metabólicas similares ao miocárdio (Ji et al., 2000).

Vários estudos têm sugerido uma série de substâncias com efetivas propriedades antioxidantes capazes de amenizar os efeitos oxidativos no músculo cardíaco, como carotenóides e tocoferóis (Hak et al., 2003), N-acetilcisteína (Nagoor & Maizen Prince, 2010) taurina (Silva et al., 2011), reveratrol (Xin et al., 2010) entre outros.

Similarmente aos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, o exercício físico tem exercido importante papel na proteção contração a ação deletéria as ERO. Estudos recentes mostram que o exercício físico regular pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de reparos antioxidantes (Pinho et al., 2010, Frederico et al., 2009; Silva et al., 2011).

1.5 EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE OXIDATIVO E INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Inúmeros estudos indicam que exercícios físicos realizados regularmente estão associados com reduções importantes na incidência de eventos cardiovasculares, colocando o exercício físico como uma importante modalidade terapêutica na prevenção e tratamento destas doenças (Hambrecht et al., 2000; Manson et al., 2003; Powers et al., 2008). Nos últimos anos, foram descritos diversos benefícios do exercício regular para portadores de cardiopatia, além da melhora na capacidade funcional, redução da produção de oxidantes e danos oxidativos, incluem melhora do sistema de defesa antioxidante e aumentam a resistência dos órgãos e tecidos contra a ação deletéria dos RL (Ascensão et al., 2007). Desta forma, o exercício físico tem recebido cada vez mais aceitação como parte essencial do tratamento do IAM, colaborando com mudanças de hábitos e correção dos fatores de risco.

As evidências científicas indicam que o treinamento físico pode melhorar a capacidade antioxidante e atenuar danos no tecido cardíaco de humanos e animais mediado por estresse oxidativo (Ennezat et al., 2001; Sia et al., 2002; Shiomi et al., 2004; Linke et al., 2005, Tavares et al., 2010; Silva et al., 2011). No entanto, estudos também apresentam evidências de que o exercício físico, principalmente os mais intensos, pode estar associado tanto com danos musculares quanto à produção adicional de RL (Reid, 2008).

A realização do exercício constitui um estresse fisiológico para o organismo em função do grande aumento da demanda energética em relação ao repouso, o que provoca intensa modificação do ambiente químico muscular e sistêmico, a fim de manter ou restabelecer a homeostase celular. Por exemplo, taxas metabólicas elevadas como resultados de exercício físico podem aumentar dramaticamente o consumo de oxigênio (VO_2 máx) em até 20 vezes em relação aos valores de repouso (Carmeli et al., 2000) e isso, é considerado um importante estímulo para o aumento da formação de ERO (Alessio & Goldfarb, 1988). Conseqüentemente, a exposição regular ao exercício ao longo do tempo (treinamento físico) promove um conjunto de adaptações morfológicas, funcionais e bioquímicas que conferem maior capacidade ao organismo

de se defender dos agentes estressores. Estudos recentes têm demonstrado que o treinamento físico aumenta as defesas antioxidantes e reduz os danos oxidativos em diversos tecidos, assim como a capacidade oxidativa do músculo (Pinho et al., 2006, Silva et al., 2008; Menegali et al., 2009; Frederico et al., 2009; Silva et al., 2011).

Existe uma grande diversidade e variabilidade nos resultados obtidos em estudos experimentais que avaliam a modulação do estado redox da célula muscular cardíaca. De acordo com Ascenção et al., (2007) a comparação dos resultados obtidos nos diversos estudos e uma conclusão efetiva do potencial efeito positivo do treinamento físico após o IAM é dificultada por diferenças metodológicas adotadas, como (i) características dos protocolos de treinamento, (ii) métodos e parâmetros bioquímicos; (iii) porção do tecido utilizado para análise; (iv) o tempo entre o fim do treinamento e a morte dos animais.

Embora se reconheça o importante papel do exercício físico frente às mudanças bioquímicas e moleculares induzidas pelo IAM, nem sempre a adaptação dos sistemas antioxidantes ao treinamento é eficaz, podendo diminuir o conteúdo de glutathione e a atividade de enzimas antioxidantes ou aumentar bioprodutos da modificação oxidativa de lipídios e proteínas. Alguns estudos têm demonstrado que o treinamento aeróbio pode causar uma desregulação dos sistemas antioxidantes ou mantê-los inalterados (Ascenção et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos de dois protocolos de exercício sobre parâmetros do metabolismo oxidativo ventricular em ratos pós-infarto do miocárdio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de oxidantes em ratos pós-infartados expostos a dois diferentes modelos de treinamento.

- Avaliar a atividade e expressão de enzimas antioxidantes em ratos pós-infartados exposto a dois diferentes modelos de treinamento.
- Avaliar os danos oxidativos em lipídeos e proteínas em ratos pós-infartados exposto a dois diferentes modelos de treinamento.
- Avaliar a expressão de proteínas reguladoras de função mitocondrial em ratos pós-infartados expostos a dois diferentes modelos de treinamento.

3. MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos (60 dias de idade, 200-250g), oriundos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Todos os procedimentos foram realizados conforme a Lei nº 11.794/08 (DOU 196, Seção 1, Outubro/2008) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESC. Inicialmente os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos (n=18): Sham e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Após trinta dias ao IAM, os animais foram divididos em 6 subgrupos (n=6): Sham, Sham + treinamento contínuo, Sham + treinamento fracionado, IAM, IAM + treinamento contínuo e IAM + treinamento fracionado. Os animais foram agrupados em gaiolas e receberam acesso livre à água e comida com temperatura ambiente média de 23°C graus e ciclo de claro e escuro de 12h.

3.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (Lafibe) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. O Lafibe apresenta todas as condições estruturais e técnicas necessárias para o desenvolvimento do estudo e para atender as eventuais intercorrências, garantindo a proteção aos possíveis riscos.

3.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Para determinar o tamanho da amostra foi utilizada uma relação média prevista a partir dos níveis de TBARS de 0,015 mMol de MDA/mg proteína em animais treinados com IAM e de 0,025 mMol de MDA/mg proteína em animais não-treinados com IAM (Nunes et al., 2008). Assim, o tamanho do grupo amostral necessário para detectar uma diferença significativa, considerando um nível de significância de 5% e poder de 80%, é de 6 animais por grupo.

3.4 INDUÇÃO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com Tavares et al (2010). Inicialmente os animais foram anestesiados com Xilasina (50 mg/Kg, i.p.) e cetamina (10 mg/Kg, i.p.) e expostos a ventilação mecânica numa frequência de 60 m/min e volume corrente, 1,5 mL (Havard ventilator, model 683). Uma tricotomia foi realizada no hemitorax esquerdo, no segundo espaço intercostal (ictus cordis), sem exteriorização do coração. A artéria coronária descendente anterior foi ocluída entre as bordas do apêndice auricular esquerdo e o tronco da artéria pulmonar a com uso de fio cirúrgico 6-0 (TECHNOFIO). Após a oclusão, a cavidade torácica foi fechada e suturada com fio cirúrgico 5-0. Os animais Sham foram expostos aos mesmos procedimentos, exceto a oclusão da artéria coronária. Após procedimento cirúrgico todos os animais receberam analgésicos (dipirona sódica 30 mg/Kg, i.p.)

3.5 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO

Trinta dias após o IAM os animais foram submetidos a dois diferentes protocolos de treinamentos aquáticos (contínuo e fracionado), cinco dias por semana, por um período de sete semanas em uma piscina com dimensões de 120X60X50cm e raias 10X15X50cm. O volume de água foi de 37,5cm³ com temperatura controlada de 30º a 32º graus. O treinamento contínuo foi realizado por um período de 60 minutos e o treinamento fracionado foi realizado por um período de 60 minutos com 10 séries de

cinco minutos com intervalo de 1 minuto entre as séries (Adaptado de Menegali et al., 2009).

Inicialmente, na primeira semana de treinamento, os animais utilizaram uma carga de 5% da massa corporal fixada à cauda, o que representa, em ratos normais, aproximadamente 75% do VO_2 máximo ou a máxima fase estável de lactato (Gobatto et. al., 2001). Porém, devido o fato da intensa intervenção cirúrgica, os animais não suportaram a carga adicional de esforço e realizaram as sessões de exercício sem a mesma.

3.6 CONTROLE DO TREINAMENTO

Lactato sanguíneo: Imediatamente após a primeira, décima quinta e última sessão de treinamento foram coletadas aproximadamente 25 μ L sangue caudal dos animais para a dosagem da lactato utilizando Lactímetro de marca Accusport. Os animais controles foram expostos a uma única sessão de treino para coleta de lactato.

3.7 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, todos os animais foram mortos por decapitação e a porção ventricular esquerda foi cirurgicamente removida, aliquotada, processada e armazenada a -70°C para análises bioquímicas e moleculares. O descarte dos animais foi feito do acondicionamento em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40 para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

3.8 PROCEDIMENTOS PARA MINIMIZAR, ELIMINAR OU PROTEGER O DESCONFORTO OU RISCO CAUSAL DO ANIMAL

Os ratos foram anestesiados para a realização dos procedimentos cirúrgicos através da administração intraperitoneal de xilasina e quetamina e a perda dos reflexos

pedal e caudal foram usados como controle da anestesia. Após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam analgésicos (dipirona sódica 30 mg/Kg, i.p.).

3.9 PREPARAÇÃO DO TECIDO WESTERBLOTING

Um terço do ventrículo esquerdo dos animais foi homogeneizado em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos. No sobrenadante foi determinado a concentração de proteína utilizando o método de Lowry et al. (1951) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total com anticorpo específico.

4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.1. PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO:

O superóxido foi determinado pela oxidação da adrenalina em tampão contendo SMP (partículas sub-mitocondriais), succinato (inibidor da cadeia de transferência de elétrons) e catalase. Após sucessivas centrifugações em tampão de isolamento (Manitol 0,23M, Sacarose 0,07M, TRIS-HCl 0,01M) e tampão de lavagem (KCl 140mM, Tris-HCl 20mM) as amostras (30 - 60µL) na presença de Succinato 0,7M, Catalase 10mM, Tampão de produção de O₂ - 900µl 30°C e adrenalina (0,02g/ml H₂O destilada em 10µL HCl fumegante) foram lidas espectrofotometricamente em 16 ciclos de 10 segundo a 760nm os valores foram expressos em nmol/min/MG de proteína (Poderoso et al., 1996).

4.2. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES:

Superóxido Dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina segundo Bannister e Calabrese (1987). Foi utilizado 10, 30 e 50µL da amostra (homogeneizado em tampão glicina) e adicionado 10µL de catalase (0,0024g/ml de água destilada), 970µL de tampão glicina (0,75g em 200mL de água destilada – 32°C), 17µL de adrenalina (60 mM em água destilada + 15µL/ml de HCl fumegante). A leitura foi realizada em 180 segundos com intervalo de 10 segundos medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em Unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína).

Glutathione Peroxidase (GPX): A atividade da GPx foi determinada conforme descrito por Flohé e Gunzler (1984). Foi utilizado 10 mL da amostra (tecido homogeneizado em tampão específico) e 10 ml de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 mL de um meio de reação (25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético – DPTA - 5 mM pH 7,0, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 mL de GR 5U e 100 mL de KCN 50 mM). O método baseia-se em dismutar o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx e consiste na oxidação do NADPH medido espectrofotometricamente em 340 nm. Os valores foram expressos em mM/min/mg proteína⁻¹.

Catalase (CAT): A atividade da Catalase foi determinada a partir da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pela enzima presente na amostra (Aebi, 1984). Foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,0. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 mL de amostra. Após homogeneização, a velocidade máxima de decomposição do H₂O₂ foi medida em espectrofotômetro a 240nm e os valores foram expressos em unidades de catalase/mg de proteínas.

4.3. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS:

A expressão da SOD, CAT, GPX, Citocromo C oxidase, PGC-1alfa e HIF-1 foram determinadas por Westernblotting. 200µg de proteína por amostra aplicada sobre o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da Bio Rad.

A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com um anticorpo específico para cada enzima. Os anticorpos usados foram anti-SOD, anti-GPX and anti-CAT, anti-cit C, anti HIF-1 e anti-PGC1-alfa (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). A ligação de anticorpo a proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O sinal foi detectado por tratamento com 2 μ Ci de [125I] Proteína A (30 μ Ci/ μ g) em 10 mL de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak à -80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica.

4.4. MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS:

Como índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Draper e Hadley (1990). Primeiramente as amostras foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético (10%) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%), seguido por aquecimento em banho-maria (60°C) por 30 minutos. Os níveis de TBARS foram medidos espectrofotometricamente (532nm) e expressos como equivalentes de malondialdeído (nmol/mg proteína). Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) como previamente descrito por Levine et al. (1990). Inicialmente, as proteínas foram precipitadas com adição de ácido tricloroacético (20%) e reagidas com DNPH. Após a reação as amostras foram redissolvidas em uréia 8M e o conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente de absorção de 22.000 Molar⁻¹.

4.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS:

A quantidade de total de proteína para os ensaios de expressão, atividade enzimática e danos oxidativos foram determinadas a partir da técnica descrita por Lowry et al. (1951).

O conteúdo protéico foi determinado usando a albumina bovina como padrão. Quando o reagente Folin de fenol (reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico) é adicionado, liga à proteína alterando a cor da solução (do amarelo para o azul escuro). A leitura é feita espectrofotometricamente 750 nm.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 como pacote estatístico.

6. RESULTADOS

Lactato: Os níveis de lactato observados na tabela 1 mostram que os grupos treinados nos diferentes protocolos apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle em todas as coletas realizadas. Porém, somente o grupo submetido ao treinamento contínuo e com infarto apresentou valores de lactato significativamente maiores em relação ao grupo sham ($p < 0,05$).

Grupos	Controle			Treinamento contínuo			Treinamento fracionado		
	1°	15°	30°	1°	15°	30°	1°	15°	30°
Sham	3.2±0.7	2.7±1.8	2.9±2.1	5.8±0.8#	7.3±2.9#	6.4±2.3#	6.1±1.8#	5.9±2.3#	5.3±2.1#
Infarto	4.2±1.2	3.7±2.1	3.1±2.3	8.1±2.4*#	7.3±1.1#	6.3±0.9#	7.8±2.2#	6.8±0.9#	6.2±1.3#

Tabela 1: Lactato sanguíneo (mmol/L sangue). A análise de lactato foi realizada imediatamente após a 1ª, 15ª e 30ª sessão de exercício a partir de 25µL do sangue capilar caudal. O grupo não treinando foi considerado como controle. Valores foram expressos como Média±erro padrão da média (EPM) e a significância em relação ao grupo Sham (*) e em relação ao grupo controle(°) foi de $p < 0,05$.

Produção de Ânion Superóxido: De acordo com a figura 1, os resultados mostram que o a produção de superóxido no grupo exposto ao infarto foi 31% maior em relação ao

grupo sham e que ambos os modelos de treinamento reduziram significativamente esses valores para aos níveis dos grupos controle.

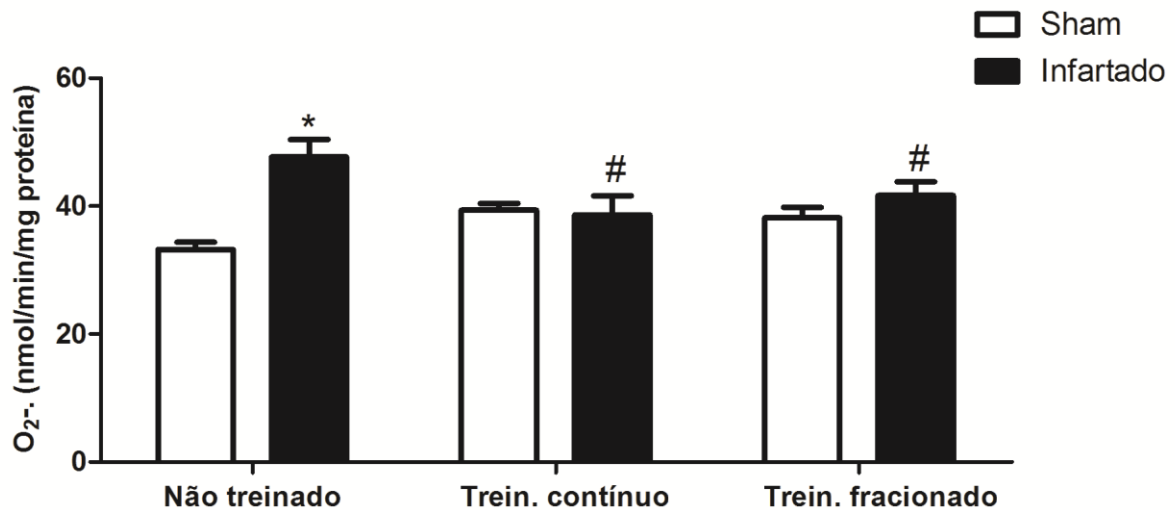


Figura 1: Produção de superóxido em ventrículos de ratos induzidos ao treinamento após infarto agudo do miocárdio. Os valores são apresentados em Média±EPM e os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteínas. A diferença significativa entre os grupos não-treinado* e grupo Sham# foi de $p < 0.05$.

Enzimas antioxidantes: A atividade e expressão da superóxido dismutase não foram alteradas pelo infarto e pelo o exercício (figura 2A e 2B). Entretanto, pode-se observar um significativo aumento na expressão da catalase nos grupos sham e grupo exposto ao treinamento contínuo (figura 2C) e a atividade só foi aumentada no grupo induzido ao infarto (figura 2D). A expressão da glutathiona peroxidase foi aumentada pós-infarto e significativamente reduzida quando os animais foram expostos ao treinamento contínuo e fracionado (figura 2E). Porém, somente os grupos treinados apresentaram um aumento na sua atividade (figura 2F).

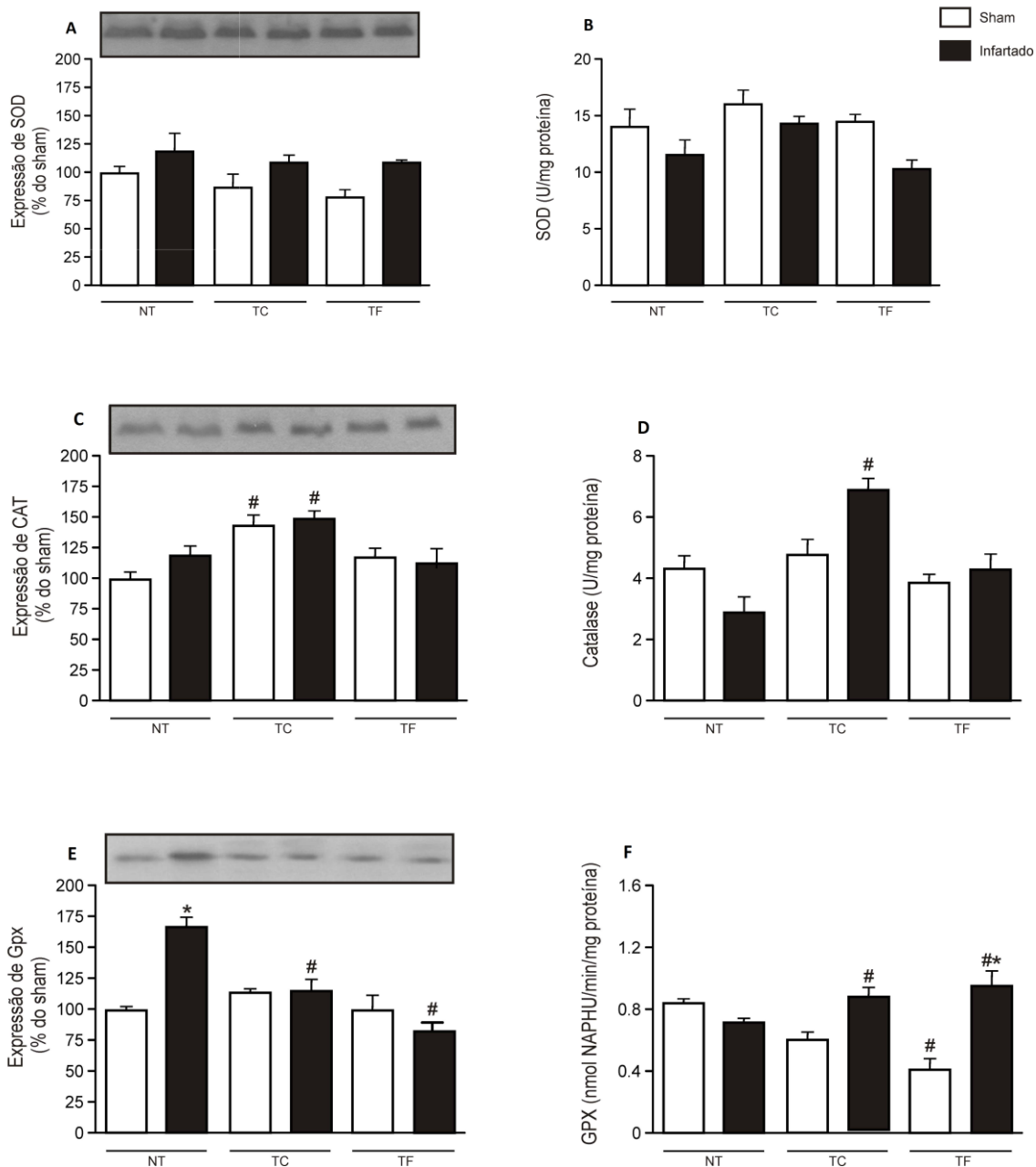


Figura 2: Atividade e expressão de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase 2A e 2B, catalase 2C e 2D, glutatona peroxidase 2E e 2F) em ventrículos de ratos induzidos ao treinamento após infarto agudo do miocárdio. Os valores são apresentados em Média±EPM e os resultados foram expressos em percentual em relação ao grupo Sham ou Unidades/mg de proteínas. A diferença significativa entre os grupos não-treinado* e grupo Sham# foi de $p < 0.05$.

Danos oxidativos: Os danos oxidativos em lipídios foram significativamente elevados pós-infarto e reduzidos somente após o treinamento contínuo (figura 3A). Porém, os

danos oxidativos em proteínas observados pós-infarto tiveram seus valores reduzidos somente no treinamento fracionado (figura 3B).

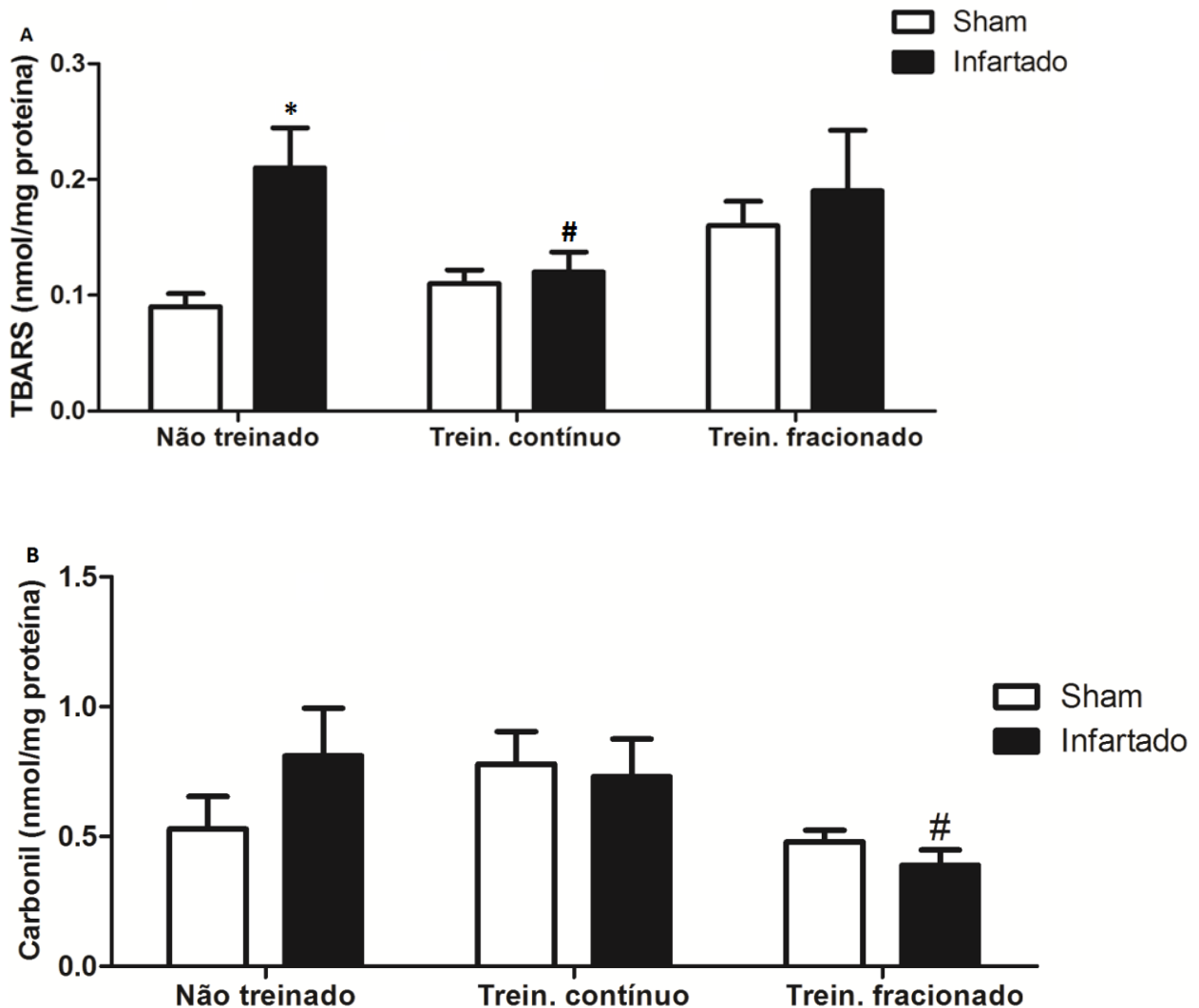
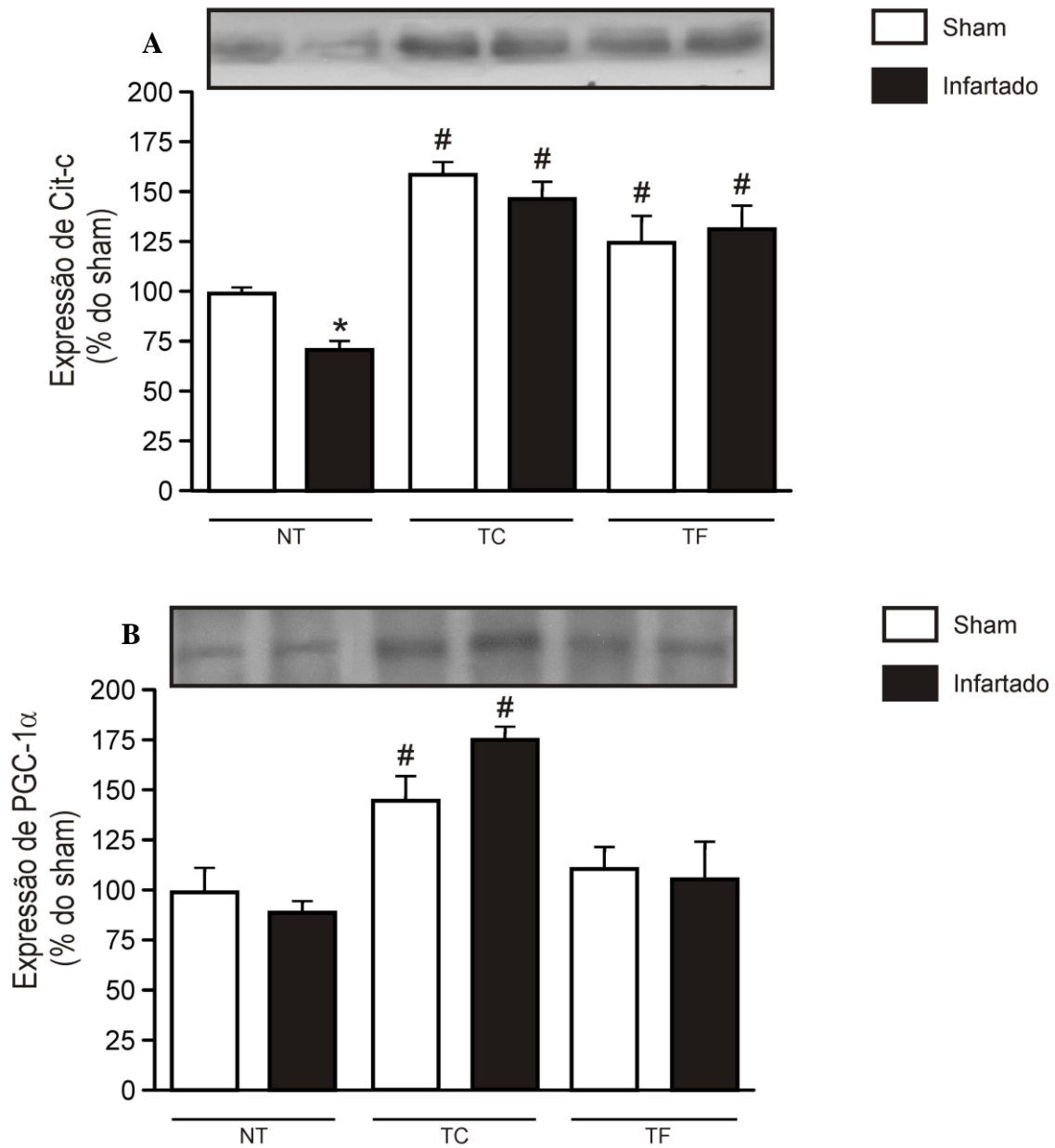


Figura 3: Danos oxidativos em lipídeos (3A) e proteínas (3B) em ventrículos de ratos induzidos ao treinamento após infarto agudo do miocárdio. Os valores são apresentados em Média±EPM e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteínas. A diferença significativa entre os grupos não-treinado* e grupo Sham# foi de $p < 0.05$.

Proteínas oxidativas: A figura 4A mostra uma redução na expressão da citocromo c oxidase pós-infarto e um aumento em todos os grupos submetido ao treinamento contínuo e fracionado. Contudo, somente os grupos submetidos ao treinamento contínuo apresentaram um aumento significativo na expressão da PGC1-alfa (figura 4B). O HIF-1 foi maior pós-infarto e esses valores foram significativamente reduzidos

nos grupos induzidos ao infarto e submetidos a ambos os protocolos de treinamento (figura 4C).



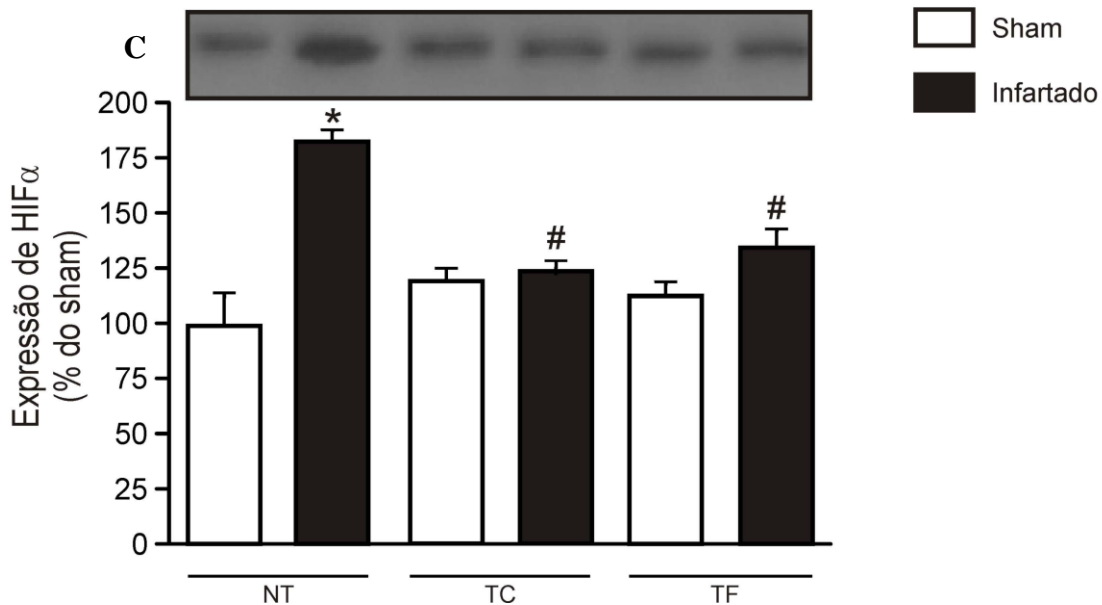


Figura 4: Expressão de proteínas mitocondrial (citocromo c oxidase 4A, PGC1-alfa 4B, HIF-1 4C) em ventrículos de ratos induzidos ao treinamento após infarto agudo do miocárdio. Os valores são apresentados em Média±EPM e os resultados foram expressos em percentual referente ao grupo Sham. A diferença significativa entre os grupos não-treinado* e grupo Sham# foi de $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

A utilização de diferentes modelos de treinamento físico, como estratégias de intervenção após o infarto do miocárdio, tem sido investigada em vários estudos (Goto et al., 2003; Taylor et al., 2004; Wisløff et al., 2007; Vona et al 2009). A maioria dos estudos referentes ao efeito do treinamento físico sobre a função cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana centra-se principalmente no treinamento aeróbico. No entanto, apesar da sua importância, ainda há controvérsia sobre o modelo ideal de exercício que possa trazer maiores efeitos benéficos, em especial, em relação a parâmetros bioquímicos e moleculares. Partindo dessa premissa, o presente estudo analisou os efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre parâmetros do metabolismo oxidativo ventricular em ratos pós infarto agudo do miocárdio (IAM). As características dos modelos de treinamento utilizados nesse estudo foram similares (duração e intensidade), porém em um dos modelos houve períodos de recuperação

durante as sessões de exercício o que provocou uma redução no tempo total de exercício.

No presente estudo, nós demonstramos que ambos os modelos de treinamento físico promovem efeitos benéficos sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no ventrículo de ratos submetidos ao IAM. Os principais achados do corrente estudo são: 1) ambos os modelos de treinamento utilizados, embora promovam benefício, modelam diferenciadamente o estado redox celular e os danos oxidativos; 2) os modelos de treinamento promovem resultados diferenciados na atividade e expressão de enzimas antioxidantes; 3) mesmo havendo melhora no estado oxidativo da célula induzidos por ambos modelos de treinamento, o treinamento contínuo parece ser mais eficiente.

Com o objetivo de acompanhar a alteração do metabolismo glicolítico para a produção de energia durante e após as sessões de treinamento, nós mensuramos os níveis de lactato. Apesar da produção de lactato ocorrer internamente no músculo esquelético, as mensurações sistêmicas desse metabólito fornecem informações precisas acerca do fornecimento energético para execução do esforço, implicando a utilização desse parâmetro importante para acompanhar a intensidade do esforço físico durante um período de treinamento. Como observado na tabela 1 os grupos treinados nos diferentes protocolos apresentaram um aumento significativo nos níveis de lactato em todas as coletas realizadas (imediatamente após a primeira, décima quinta e última sessão) e somente o grupo submetido ao treinamento contínuo e com infarto apresentou valores de lactato significativamente maiores em relação ao grupo sham. O aumento na utilização das vias glicolíticas para a produção de energia o que resultou nos maiores níveis de lactato sugere que, mesmo não havendo a utilização de cargas adicionais, o protocolo de exercício utilizado representa um esforço físico de impacto significativo sobre o metabolismo energético (Robergs et al., 2004).

O IAM promove uma série de modificações celulares em todo tecido cardíaco tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico e para se adaptar a essas modificações, o miocárdio sofre uma série de alterações bioquímicas e moleculares as quais são influenciadas pelo exercício físico (Ascensão et al., 2007). Recentes evidências sugerem que o aumento excessivo na produção de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo induzem a danos estruturais e funcionais

importantes para o remodelamento cardíaco após o IAM (Grieve et al, 2004; Lee et al., 2011) e diversos estudos tem reforçado a influência do exercício nesse processo (Nunes et al., 2008, Frederico et al., 2009, Xu et al., 2010).

Nossos resultados mostram (figura 1) que a produção de superóxido no grupo exposto ao infarto foi 31% maior em relação ao grupo sham e que ambos os modelos de treinamento reduziram significativamente esses valores para aos níveis de controle. O superóxido é o Radical Livre primário produzido a partir da redução parcial do oxigênio. Sua dismutação pela superóxido dismutase gera o peróxido de hidrogênio, que na presença de metais de transição levam a formação de hidroxil (Halliwell e Gutridge, 2007). O aumento observado nos animais infartados, possivelmente está associado a ativação de enzimas como a xantina oxidase e NAPH oxidase, envolvidas diretamente em processos de isquemia-reperfusão e migração de células fagocíticas para o tecido muscular lesionado, respectivamente (Fukui et al., 2001; Li et al., 2002). O efeito redutor na produção de superóxido por ambos os protocolos de treinamento, está possivelmente associado com a melhora do metabolismo oxidativo induzido pelo exercício, em particular observados pelo aumento na expressão do citocromo C oxidase (Figura 4A) em ambos os protocolos e o aumento na expressão de PGC-1 induzida pelo exercício contínuo (figura 4B). Teoricamente, essa correlação entre a redução na produção pelo aumento na função mitocondrial pode se dar a partir de alguns mecanismos, tais como: (1) menor influxo de Ca^{2+} na mitocôndria induzido pelo treinamento (Starnes et al., 2007); (2) adaptações estruturais específicas no complexo I diminuindo o extravasamento de elétrons (Grivennikova et al., 2006); (3) ativação de fatores de transcrição (AP-1 e NF-kB) que promovem a ação de enzimas antioxidantes (Lambertucci et al., 2007). Adicionalmente, a redução dos níveis de HIF (figura 4C) também pode contribuir para a redução da produção ERO. Similar ao presente estudo, (Swaminathan et al., 2010) demonstram que diminuição nos níveis de HIF promove proteção contra a liberação de citocromo C oxidase, diminuindo indiretamente estresse oxidativo no miocárdio de animais.

Cabe ressaltar que o IAM está associado com extensa resposta inflamatória sistêmica e miocárdica (Aronson et al., 2007) o que possivelmente estimula a produção de óxido nítrico, um importante vasodilatador, e ainda ativa a NADPH oxidase,

promovendo a formação de superóxido adicionais. Porém óxido nítrico possui uma maior afinidade com o superóxido do que a SOD o que promove a formação de peroxinitrito e possivelmente, a redução na disponibilidade de superóxido (Halliwell e Guttridge, 2007).

Os modelos de exercício não alteraram a atividade e expressão da superóxido dismutase (figura 2A). Esse resultado é surpreendente uma vez que diversos estudos sugerem o efeito do treinamento físico sobre a modulação dessa enzima em tecido muscular esquelético (Pinho et al., 2006, Silva et al., 2009) e cardíaco (Frederico et al., 2009, Silva et al., 2011). Portanto, esse resultado reforça a hipótese de que em animais infartados, a redução na produção de radicais livres, em especial o superóxido, está muito mais relacionada aos efeitos do exercício sobre o metabolismo oxidativo muscular do que sobre a modulação de SOD, uma vez que é a proteína responsável pela dismutação do superóxido.

Embora, os modelos de treinamentos não melhoram o perfil da expressão e atividade as SOD, podemos observar que as enzimas catalase e glutathione peroxidase, foram substancialmente alteradas. A figura 2C mostra um significativo aumento na expressão da catalase nos grupos sham e infartado expostos ao treinamento contínuo, da mesma forma um aumento na atividade do grupo induzido ao infarto (figura 2D). A expressão da glutathione peroxidase foi aumentada pós-infarto e significativamente reduzida quando os animais foram expostos ao treinamento contínuo e fracionado (figura 2E). Porém, somente os grupos treinados apresentaram um aumento na sua atividade (figura 2F). Esses resultados sugerem que a modulação dessas enzimas após IAM respondem de maneira diferente aos modelos de treinamento. A diminuição na expressão da GPx pode ser devida a uma redução da formação de peróxido de hidrogênio o que possivelmente possa ter ocorrido em face de uma redução na produção ou disponibilidade de superóxido (figura 1). Além disso, é possível que a GPx, em músculo cardíaco possa apresentar uma menor modulação induzida pelo exercício em relação à catalase. Porém, o aumento observado na atividade de ambas as enzimas, catalase (treinamento contínuo) e GPx (treinamento contínuo e fracionado) sugere que ambos os modelos de treinamento são eficazes no sentido de melhorar o sistema de defesa antioxidante.

Mesmo observando uma melhora no perfil antioxidante do músculo cardíaco, a adaptação dos sistemas antioxidantes ao treinamento nem sempre é eficaz. De acordo com Ascensão et. al., (2007), o treinamento físico aeróbio pode causar uma desregulação dos sistemas antioxidantes ou mante-los inalterados. Por exemplo, Hong e Johnson; (1995), apesar de observarem um aumento na atividade cardíaca da SOD em animais treinados, também encontraram redução na atividade da CAT, GPx e GR. No entanto, observa-se no geral que existe uma tendência na melhora dos parâmetros de estresse oxidativo decorrentes do treinamento.

A diferença nos resultados obtidos em diversos estudos pode estar diretamente relacionado às diferenças metodológicas adotadas, como (i) características dos protocolos de treinamento, (ii) métodos e parâmetros bioquímicos; (iii) porção do tecido utilizado para análise; (iv) o tempo entre o fim do treinamento e a morte dos animais. A intensidade e a duração da sessão de treinamento, por exemplo, são fatores que influenciam diretamente a capacidade de alteração e adaptação do sistema antioxidante no músculo cardíaco. Powers et al. (1993) observaram combinações de diferentes intensidades (leve, moderada e alto) e duração (30, 60 e 90 min / dia) resultando em diferentes efeitos sobre a atividade da SOD, CAT e GPX no ventrículo esquerdo. Nenhuma dessas combinações promoveram aumento nas atividades da CAT e GPx, mas foi observado aumento na atividade da SOD após alta intensidade em todas as durações. Segundo o autor, parece que a resposta adaptativa do sistema antioxidante e, conseqüentemente, dos marcadores indiretos de dano oxidativo no tecido ventricular, também parece ser mais específico, para qualquer tipo de tecido ou diferentes sistemas antioxidantes envolvidos.

Interessantemente, nossos resultados mostram que os danos oxidativos em lipídios e proteínas apresentaram resultados diferentes em relação aos modelos de treinamento. A figura 3A mostra que a lipoperoxidação foi reduzida em relação ao grupo infartado somente após o treinamento contínuo e os danos oxidativos em proteínas pós-infarto tiveram seus valores reduzidos somente no treinamento fracionado (figura 3B). Embora não se tenha explicação para esse fato, é possível que esses resultados sejam decorrentes do aumento na atividade da glutathiona peroxidase observados em ambos os modelos de treinamento.

Em resumo, os resultados no presente estudo sugerem uma melhora significativa no estado redox do miocárdio de ratos induzidos ao IAM e expostos a diferentes modelos de treinamento, porém ambos os modelos de treinamento utilizados modulam diferenciadamente esse estado redox e promovem resultados diferenciados na atividade e expressão de enzimas antioxidantes. O modelo de treinamento contínuo parece ser mais eficiente por apresentar melhores resultados em todos os parâmetros analisados.

8. CONCLUSÕES

Atentos aos objetivos iniciais desta dissertação, chegamos às seguintes conclusões:

- 1) ambos os modelos de treinamento utilizados, embora promovam benefício, modulam diferenciadamente o estado redox ventricular após o IAM;
- 2) os modelos de treinamento promovem resultados diferenciados na atividade e expressão de enzimas antioxidantes após IAM;
- 3) mesmo havendo melhora no estado oxidativo da célula induzidos por ambos modelos de treinamento, o treinamento contínuo parece ser mais eficiente na modulação do estado redox do ventrículo alterado pelo IAM.
- 4) Os danos oxidativos induzidos pelo IAM são minimizados pelo treinamento físico, no entanto, esses danos respondem diferenciadamente aos modelos de treinamento, contínuo e fracionado.

Em síntese, os resultados apresentados dessa dissertação mostraram que o uso de diferentes modelos de treinamento físico com sessões de exercício contínua ou fracionada melhoram os parâmetros de estresse oxidativo e perfil oxidativo mitocondrial em ventrículo de ratos após o infarto agudo do miocárdio. Embora a consistência dos resultados permita sugerir o uso de ambos os modelos como recursos terapêuticos, sugere-se que novos estudos sejam conduzidos a fim de verificar o efeito de diferentes intensidades sobre ambos os modelos e desenvolver estudos similares com seres humanos.

9. REFERÊNCIAS

AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. 105:121-26; 1984.

ALESSIO HM, GOLDFARB, AH. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **Journal of Applied Physiology**. 64:1333-1336; 1988.

ANTONIADES C; TOUSOULIS D; TENTOLOURIS C; et al. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. **Herz**. 28: 628-38; 2003.

ARONSON D, BOULOS M, SULEIMAN A, et al. Relation of C-reactive protein and new-onset atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**. 100:753-7; 2007.

ASCENSÃO A, FERREIRA R , MAGALHÃES J. Exercise-induced cardio protection biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. **International Journal of Cardiology** 117 16–30; 2007

BANNISTER JV, CALABRESE L. Assay for SOD. **Methods of Biochemical Analysis**. 32: 279-312; 1987.

BIRCH-MACHIN MA, BRIGGS HL, SABORIDO AA, BINDOFF LA, TURNBULL DM. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**. 51(1):35-42; 1994.

BITTNER, J. & OBERMANN, A. . Efficacy studies in coronary rehabilitation. **Cardiology Clinics**.11:333-347; 1993.

BROOKS G, WHITE T. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**. 45: 1009-1015; 1978.

CARMELI E; LAVIAM G; REZNICK A.Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. **Free radicals in exercise and aging**. Champaign: Human Kinetics, pp. 73-115; 2000.

CHANCE B; SIES CH; BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology** 59: 527-605.1979.

DALLE-DONNE I, GIUSTARINI D, COLOMBO R, ROSSI R, MILZANI A. Protein carbonylation in human Diseases. **TRENDS in Molecular Medicine** 9(4):169-76; 2003.

DRAPPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 186: 421-31; 1990.

ENNEZAT PV, MALENDOWICZ SL, TESTA M, et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. **Journal of the American College of Cardiology** 38:194–8; 2001.

FAN Q, YANG XC, LIU Y, WANG LF, LIU SH, GE YG, CHEN ML, WANG W, ZHANG LK, IRWIN MG, XIA Z. Postconditioning attenuates myocardial injury by reducing nitro-oxidative stress in vivo in rats and in humans. **Clinical Science**. Dec 3;120(6):251-61; 2010.

FISCHER JC; RUITENBEEK W; BERDEN JA; TRIJBELS JM; VEERKAMP JH; STADHOUDERS AM, SENGERS RC, JANSSEN AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta** 29: 23-36; 1985.

FLOHÉ L; GUNZLER W. Assay of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology** 105: 114-21; 1984.

FRANCO FGM; MATOS LDNJ. Exercício físico e perfusão miocárdica. In: **Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata** (Negrão CE; Barreto AC). Manoled, São Paulo pp. 179- 259; 2005.

FREDERICO MJ, JUSTO SL, DA LUZ G, DA SILVA S, MEDEIROS C, BARBOSA VA, SILVA LA, BOECK CR, DE PINHO RA, DE SOUZA CT. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. **Free Radical Research** 43(10):957-64; 2009.

FUKUI T, YOSHIYAMA M, HANATANI A, OMURA T, YOSHIKAWA J, ABE Y. Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 281:1200–6; 2001.

GOBATTO CA, DE MELLO MA, SIBUYA CY, DE AZEVEDO JR, DOS SANTOS LA, KOKUBUN E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 130(1):21-7; 2001.

GOTO C; NAKAGAWA N; KAWAMURA M. et al. Effect of Different Intensities of Exercise on Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. **Circulation** 108: 530-535; 2003.

GREENLAND, P. & CHU, J. J. Efficiency of cardiac rehabilitation services With emphasis on patients after myocardial infarction. **Annals of Internal Medicine** 109:650-653; 1988.

GRIENDLING KK, SORESCU D, USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research** 86:494–501; 2000.

GRIEVE DJ, BYRNE JA, CAVE AC. AND SHAH AM. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. **Heart, Lung and Circulation** 13:132-8; 2004.

GRIVENNIKOVA VG, VINOGRADOV AD. Generation of superoxide by the mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757:553–61; 2007.

HAK AE, STAMPFER MJ, CAMPOS H, SESSO HD, GAZIANO JM, WILLETT W, MA J. Plasma carotenoids and tocopherols and risk of myocardial infarction in a low-risk population of US male physicians. **Circulation** Aug 19;108(7):802-7; 2003.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. **Free Radical in Biology and Medicine**. University Press, Oxford, NY. 2007.

HAMBRECHT R, WOLF A, GIELEN S, LINKE A, HOFER J, ERBS S, et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. **TheNew England Journal of Medicine**. 342:454-60; 2000.

HEDBACK, B. & PERK, J.. Can high risk patients after myocardial infarction participate in comprehensive cardiac rehabilitation. **Scandinavian Journal of Rehabilitative Medicine**. 1: 15-22; 1990.

HEDBCK, B.; PERK, J. & WODLIN, P. Long term reduction of cardiac mortality after myocardial infarction: 10 years results of a comprehensive rehabilitation program. **European Heart Journal**. 6 :831-835; 1993

HILL MF, SINGAL PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **American Journal of Pathology** 148:291–300; 1996.

HOLLANDER J; BEJMA J; OOKAWARA T; OHNO H; JI LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. **Mechanisms of ageing and development** 116: 33-45; 2000.

HONG H, JOHNSON P. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** (9):923-31; 1995.

IBGE. Síntese de Indicadores Sociais 2002. Síntese de Indicadores Sociais confirma as desigualdades da sociedade brasileira. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: abril de 2006.

Ji L. Exercise-induced oxidative stress in the heart. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, Sen CK, Packer L, Hanninens O, editors. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. **The Bernoullis of Base**. p. 689–712; 2000.

Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology** 87: 465-470; 1999.

KHAPER N, SINGAL PK. Modulation of oxidative selective inhibition of angiotensin II type 1r in rats. **Journal of the American College of Cardiology** 37(5):1461-6; 2001.

KÖNIG D; BERG A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. **Österreichisches Journal für** 3(1):6-15; 2002.

LAMBERTUCCI RH, LEVADA-PIRES AC, ROSSONI LV, CURI R, PITHON-CURI TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. **Mechanisms of Ageing and Development** 128:267-75; 2007.

LEE TM, CHEN CC, HSU YJ. Differential Effect of NADPH Oxidase and Xanthine Oxidase Inhibition on Sympathetic Reinnervation in Post-infarcted Rat Hearts. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2011.

LEONARDO A. M. ZORNOFF, SERGIO A. R. PAIVA, MARCOS F. MINICUCCI, JOEL SPADARO. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 434-440; 1998.

LERMAN A; WEBSTER MWI; CHESEBRO JH; et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. **Circulation**. 88: 2923-2928; 1993.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. 186:464-78; 1990.

LINKE A, ADAMS V, SCHULZE PC, ET AL. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. **Circulation** 111:1763–70; 2005.

LORGERIL M; SALEN P; ACCOMINOTTI M; et al. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into potential importance of selenium in heart failure. **European Journal of Heart Failure** . 3:661-669; 2001.

LOWRY OH, ROSEBOUGH NG, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-75; 1951.

MANSON JE, GREENLAND P, LACROIX AZ, STEFANICK ML, MOUTON CP, OBERMAN A, et al. Walking compared with vigorous exercise for prevention of cardiovascular events in women. **New England Journal of Medicine**. 347:716-25; 2002.

MASTALOUDIS A, MORROW JD, HOPKINS DW, DEVARAJ S & TRABER MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radical Biology and Medicine**. 36: 1329-1341; 2004.

MATSUO M, KANEKO T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. **Free Radicals in Exercise and Aging Champaign: Human Kinetics** p. 1-33; 2001.

MAY, G. S.; EBERLEIN, K. A.; FURBERG, C. D. & PASSAMANI, E. R. Secondary prevention after myocardial infarction: A review of long term trials. **Program Cardiovascular Disease** 24: 331-352; 1982.

MENEGALI BT, NESI RT, SOUZA PS, SILVA LA, SILVEIRA PC, VALENÇA SS, PINHO RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**. (6):567-73; 2009.

NAGOOR MEERAN MF, MAINZEN PRINCE PS. Protective effects of N-acetyl cysteine on lipid peroxide metabolism on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. 00:1-7; 2010.

NUNES RB, TONETTO M, MACHADO N, CHAZAN M, HECK TG, VEIGA AB, DALL'AGO P. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. **Journal of Applied Physiology**. 104(6):1641-7; 2008.

OLDRIDGE, N. B.; GUYATT, G. H.; FISCHER, M., E. & RIMM, A. A.. Cardiac rehabilitation after myocardial infarction. Combined experience of randomized clinical trials. **Journal of American Medical Association** 260:945-950; 1988.

PASHKOW, F. J. Issues in contemporary cardiac rehabilitation. A historical perspective. **Journal of American College Cardiology** 21: 822-834; 1993.

PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Ventricular remodelling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation** 81:1161-72; 1990.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, FISHBEIN MC, FLETCHER PJ, SPADARO J, KLONER RA, BRAUNWALD E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circulation Research**.44:503-512; 1979.

PINHO, R. A., SILVA, L.A., PINHO, C. A., SCHEFFER, D. L., SOUZA, C. T., BENETTI M, CARVALHO T, PIZZOL, F. D. Oxidative Stress and Inflammatory Parameters After an Ironman Race. **Clinical Journal of Sport Medicine (Print)**. , v.20, p.306 - 311, 2010.

PODEROSO JJ, CARRERAS MC, LISDERO C, RIOBÓ N, SCHÖPFER F, BOVERIS A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat

heart mitochondria and submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 328(1):85-92; 1996.

POLIDORI MC; MECOCCI P; CHERUBINI A; SENIN U. Physical activity and oxidative stress during aging. **International Journal of Sports Medicine** 21: 154 – 157; 2000.

POWERS SK, CRISWELL D, LAWLER J, et al. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. **American Journal of Physiology** 6(Pt 2):H2094–8; 1993.

POWERS SK, QUINDRY JC, KAVAZIS AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**. 44(2):193-201; 2008.

POWERS SK; JI LL; LEEUWENBURG C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 31: 987 – 997; 1999.

PUNITHAVATHI VR, STANELY MAINZEN PRINCE P. The cardioprotective effects of a combination of quercetin and α -tocopherol on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. (1):28-40; 2011.

RADÁK Z; KANEKO T; TAHARA S; NAKAMOTO H; OHNO H; SASVÁRI M; NYAKAS C; GOTO, s. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and dna in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. **Free Radical Biology & Medicine**. 27:69 – 74. 1999.

REID MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. **Free Radical Biology & Medicine**. 44(2):169-79; 2008.

ROBERGS RA, GHIASVAND G, PARKER D Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 287:R502–R16; 2004.

RUSTIN P; CHRETIEN D; BOURGERON T; GÉRARD B; RÖTIG A; SAUDUBRAY JM. MUNNICH A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**. 228: 35-51; 1994.

SANCHEZ-QUESADA JL; ORTEGA H; PAYES-ROMERO A; SERRAT-SERRAT J; et al. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. **Atherosclerosis** 132: 207-213; 1997.

SHAMI NJIE; MOREIRA EAM. Lycopene as an antioxidant agent. **Brazilian Journal of Nutrition** 17: 227-236; 2004.

SHAW, C. W.. Effects of a prescribed supervised exercise program after acute myocardial infarction. **The Lancet** 2:1091-1094; 1979.

SHIOMI T, TSUTSUI H, MATSUSAKA H, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents leftventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. **Circulation** 109:544–9; 2004.

SIA YT, LAPOINTE N, PARKER TG, et al. Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat. **Circulation** 105:2549–55; 2002.

SILVA F L. , MAZZOTTI NG , PICORAL M , NASCIMENTO DM , MARTINS MIM , KLEIN AB. Infarto do miocárdio experimental e aumento do estresse oxidativo em diafragma de ratos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** 31(6):506-10; 2005.

SILVA LA, TROMM C, DA ROSA GL, GONÇALVES CL, PINHO CA, DE SOUZA CT, STRECK EL, PINHO RA. Interval training does not decrease oxidative stress in the heart of mice. **International Journal of Cardiology**. 147(2):308-9; 2011.

SILVA LA; Resposta de duas sessões de natação sobre parâmetros de estresse oxidativo em nadadores. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano** 11(2):160-165; 2009.

SINGH U; JIALAL I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology** 13: 129-142; 2006.

SMITH CM; KELSEY KT; WIENCKE JK; LEYDEN K. et al. Inherited glutathione-s-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. 3:471-477; 1994.

STARNES JW, BARNES BD, OLSEN ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. **Journal of Applied Physiology** .102:1793–8; 2007.

STEINBERG D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. **Circulation** 84: 1420-1425; 1991.

SWAMINATHAN JK, KHAN M, MOHAN IK, SELVENDIRAN K, NIRANJALI DEVARAJ S, RIVERA BK, KUPPUSAMY P. Cardioprotective properties of Crataegus oxyantha extract against ischemia-reperfusion injury. **Phytomedicine** 17:744-52; 2010.

TADD, I. C.; WOSORNU, D.; STEWART, I. & WLLD, T. Cardiac rehabilitation following myocardial infarction. **A practical approach Sports Medicine**. 4: 243-259; 1992.

TAVARES AM, DA ROSA ARAÚJO AS, BALDO G, MATTE U, KHAPER N, BELLÓ-KLEIN A, ROHDE LE, CLAUSELL N. Bone marrow derived cells decrease inflammation

but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life sciences**. 87:23-26; 2010.

TAYLOR RS, BROWN A, EBRAHIM S, JOLLIFFE J, NOORANI H, REES K, SKIDMORE B, STONE JA, THOMPSON DR, OLDRIDGE N. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Physiology**.116:682–692; 2004.

TERBLANCHE SE. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. **Cell Biology International** 23: 749-753; 2000.

TREVOR CC; SANDY SH. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. **Medicine & Science in Sports & Exercise** 33: 1732-1738; 2001.

TSAO PS; NIEBAUER J; BUITRAGO R; et al. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 18: 947-953; 1998.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 39(1):44-84; 2007.

VONA, G.M. CODELUPPI, T. IANNINO, E. FERRARI, J. BOGOUSSLAVSKY, AND L.K. VON Segesser Effects of Different Types of Exercise Training Followed by Detraining on Endothelium-Dependent Dilatation in Patients With Recent Myocardial Infarction **Circulation**.119:1601-1608; 2009.

WISLØFF U; STØYLEN A; LOENNECHEN JP; et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. A randomized study. **Circulation**. 115: 3086-3094; 2007.

XIN P, PAN Y, ZHU W, HUANG S, WEI M, CHEN C. Favorable effects of resveratrol on sympathetic neural remodeling in rats following myocardial infarction. **European Journal of Pharmacology**. 649(1-3):293-300; 2010.

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. **Experimental Physiology**. 95:1008-15; 2010.

ZAGO AS; ZANESCO A. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 87: 264-270; 2006.

ZHANG Z; SHEN HM; ZHANG QF; ONG CN. Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in macrophages. **American Journal of Physiology** 277: 743-748; 1999.