

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

SIMONE ALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO
CARDÍACA DE RATAS OVARIETOMIZADAS APÓS O
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

**VITÓRIA
2014**

SIMONE ALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO
CARDÍACA DE RATAS OVARIETOMIZADAS APÓS O
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues de
Abreu

**VITÓRIA
2014**

SIMONE ALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO
CARDÍACA DE RATAS OVARIETOMIZADAS APÓS O
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues de Abreu
Universidade federal do Espírito Santo – Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo
Universidade Federal do Espírito Santo - Membro interno

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Universidade Vila Velha (UVV) - Membro externo

**VITÓRIA
2014**

DEDICO ESTE TRABALHO

Em especial as minhas duas filhas (Ana Clara e Isabela), ao meu esposo Robson, a minha sogra Ilma, minha mãe Neidite e a todos os parentes e amigos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pela força, cuidado e proteção, pois sem ele não teria completado mais uma etapa em minha vida.

As minhas duas filhas Ana Clara e Isabela, por cada beijo, cada abraço e por todas as manifestações de carinho. Amor incondicional.

Ao meu esposo Robson, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio em todas as minhas decisões, estando sempre ao meu lado.

Aos meus pais Geraldo e Neidite, que foram a base da minha educação e sempre me ensinaram a nunca desistir e acreditar sempre no meu potencial.

A minha sogra Ilma, que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando a cuidar das meninas e do seu filho. Além de cuidar também de mim. Sem a sua ajuda eu não teria chegado até o fim desse mestrado.

A minha querida irmã Gabriela, pelo carinho, apoio e pelas caronas. Sempre companheira.

A todos os meus familiares pelas orações, estando sempre na torcida pela minha vitória.

Aos colegas de laboratório, Patrick, Cíntia, Renata, Mariana, Vinícius, Fabrício e Profª Sônia, que na verdade foram verdadeiros irmãos e me apoiaram durante todo o mestrado.

Ao meu amigo Erick, que teve importante participação para a finalização desse projeto. Meu muito obrigado.

A Suelen, pela importante ajuda no momento de ausência. Sem você esse trabalho não seria possível.

Aos alunos de iniciação científica, Mariza, Paulo, Priscila, Renato e Laís, muito obrigada pela ajuda.

A Profª Drª Gláucia, pelo apoio, oportunidade, confiança e compreensão.

Ao Profº Jones e os alunos do seu, Eduardo e Priscila, pelo importante trabalho, ajuda e parceira.

Aos colegas de outros laboratórios, em especial, Ananda e Ludmila que me auxiliaram em vários momentos que precisei.

Enfim, a todos os colegas que estiveram na torcida de mais uma conquista em minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

Cerca de 40% dos pacientes com infarto do miocárdio desenvolvem disfunção ventricular com ou sem sinais de insuficiência cardíaca, que adversamente influencia na qualidade de vida, taxas de hospitalizações e mortalidade. O remodelamento ventricular após um evento agudo isquêmico é o principal fator envolvido na disfunção ventricular e apresenta importantes diferenças entre machos e fêmeas. Estudos têm demonstrado que a redução dos hormônios ovarianos pode interferir de forma negativa em importantes vias relacionadas com o processo de remodelamento ventricular. Além disso, a prática regular de exercício físico tem demonstrado importantes efeitos benéficos após o infarto do miocárdio. Diante disso, os objetivos do presente estudo é avaliar os efeitos do treinamento físico de corrida em ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio sobre a função cardíaca, parâmetros histológicos e morfométricos e expressão de proteínas relacionadas ao sistema renina angiotensina, sistema oxidante e antioxidante cardíaco. Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), com oito semanas de idade, ovariectomizadas e divididas aleatoriamente em cinco grupos: Controle, OVX+SHAM_{SED}, OVX+SHAM_{EF}, OVX+IM_{SED} e OVX+IM_{EF}. Duas semanas após a indução do infarto do miocárdio os animais iniciaram o treinamento de corrida. O protocolo de treinamento foi realizado por um período de oito semanas, com duração de 60 min/dia, cinco vezes por semana com intervalo de dois dias para repouso. Quarenta e oito horas após o último dia do protocolo de treinamento físico os animais foram anestesiados e as seguintes análises realizadas: (a) avaliação da função cardíaca, após a cateterização do ventrículo esquerdo; (b) a avaliação da expressão proteica das enzimas antioxidantes (SOD e Catalase), do receptor AT1 de angiotensina II e da gp91phox no ventrículo esquerdo pela técnica de Western Blotting; (c) avaliação da deposição de colágeno e da hipertrofia do ventrículo esquerdo por morfometria; (e) a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo por fluorimetria. Os resultados demonstram que após oito semanas de treinamento físico, os animais do grupo OVX+IM_{EF} apresentaram uma redução na expressão do receptor AT1, acompanhado do aumento na expressão da Catalase quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED} (p<0,05).

Além disso, o treinamento físico preveniu o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo juntamente com o aumento do $dP/dt+$. A área de secção transversa do miócito e a deposição de colágeno foi significativamente maiores no grupo OVX+IM_{SED} do que no grupo com OVX+IM_{EF} ($p < 0,05$). Em conjunto, esses resultados evidenciam os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a função cardíaca, o qual resulta diretamente na atenuação do processo de remodelamento cardíaco, em ratas ovariectomizadas e submetidas ao infarto do miocárdio.

Palavras chaves: Menopausa; Infarto do miocárdio; remodelamento cardíaco; treinamento físico.

ABSTRACT

Approximately 40% of patients with myocardial infarction develop ventricular dysfunction with or without signs of heart failure, which adversely affect the quality of life, rates of hospitalization and mortality. The adverse ventricular remodeling after an acute ischemic event is the main factor involved in ventricular dysfunction and presents important differences between males and females. Studies have shown that the reduction of ovarian hormones can interfere negatively in important pathways related to the remodeling process. In addition, the regular practice of exercise training have shown important beneficial effects after myocardial infarction. Therefore, the aims of this study were to analyze the effects of exercise training in treadmill on the cardiac function, histologic and morphometric parameters and to check the protein expression of cardiac renin-angiotensin, oxidant and antioxidant systems in ovariectomized rats after myocardial infarction. Female Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*), with eight weeks of age were randomly divided into five groups at the time of ovariectomy: Control, OVX+SHAM_{SED}, OVX+SHAM_{EF}, OVX+IM_{SED} and OVX+IM_{EF}. Two weeks after the induction of myocardial infarction animals started the exercise training. The training protocol was carried out for a period of eight weeks, with duration of 60 min/day, five times a week with an interval of two days to rest. Forty-eight hours after the last day of exercise training protocol, animals were anesthetized for the achievement of the following analyzes. For the evaluation of cardiac function, the left ventricle was catheterized. Proteins expression in the left ventricle were performed by Western Blotting. Collagen and hypertrophy were assessed by histology and the citrate synthase activity by fluorimetry. After eight weeks of exercise training and myocardial infarction, animals of OVX+IM_{EF} group showed a reduction in the expression of AT1 receptor and gp91phox, accompanied by an increase in catalase expression when compared to MI group ($p < 0.05$). In addition, the exercise training prevented the increase in left ventricular end-diastolic pressure together with the reduction of dP/dt+. The cross-sectional area of the myocyte and collagen deposition were significantly increased in the MI group ($p < 0.05$), but these changes were also prevented by exercise training. Together, these results demonstrates the beneficial

effects promoted by the exercise training in treadmill on the cardiac remodeling process, impacting directly on the improvement of cardiac function in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Alterações na fase aguda e crônica no ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio. 20
- Figura 2.** Demonstração da oclusão da artéria descendente anterior esquerda com um fio mononylo 6.0. 34
- Figura 3.** Representação esquemática da distribuição dos grupos. 35
- Figura 4.** Protocolo utilizado, para avaliar o efeito do treinamento físico crônico após o infarto do miocárdio. 36
- Figura 5.** Figura representativa de uma onda de pressão ventricular, delimitando os pontos de onde foram obtidas as variáveis. 37
- Figura 6.** Avaliação funcional cardíaca. 46
- Figura 7.** Expressão proteica do receptor AT1 (A) e gp91phox (B) no ventrículo esquerdo após oito semanas de treinamento físico. 47
- Figura 8.** Expressão proteica das enzimas antioxidantes isoforma mitocondrial da superóxido dismutase (SOD-2) (A) e Catalase (B). 48
- Figura 9 (A e B).** Extensão do infarto corado com picrosírius após oito semanas de treinamento físico. 49
- Figura 10.** Avaliação da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo. 50
- Figura 11.** Avaliação da área de secção transversa do miócito. 51

Figura 12. Diagrama dos efeitos do treinamento físico após o infarto do miocárdio em ratas OVX. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros morfométricos oito semanas após o treinamento físico..... 44

Tabela 2. Efeito da ovariectomia e treinamento físico sobre a frequência cardíaca pressão arterial sistólica, diastólica e média. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II – Angiotensina II
ANP – Peptídeo atrial natriurético
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)
BCL2 – B-cell lymphoma 2 (Proteína de ação anti-apoptóticas)
CS – Citrato sintase
CTGF – Fator de crescimento de tecido conjuntivo
DCV – Doenças cardiovasculares
dP/dt – Derivada máxima de pressão
dP/dt + - Derivada máxima de pressão
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ecSOD - Superóxido Dismutase Extracelular
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ET-1 – Endotelina tipo I
FC – Frequencia cardíaca
gp22phox – protein 22 phagocyte oxidase
gp91phox - glycoprotein 91 phagocyte oxidase
GPx - Glutathione Peroxidase
H₂O – Água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
IL-1 β – Interleucina 1 β (Beta)
IL-6 – Interleucina 6
IM – Infarto do miocárdio
IM+EF – Animais submetidos ao Infarto do Miocárdio que realizou o treinamento físico.
MMP – Metaloproteinases de matriz
MnSOD - Superóxido Dismutase Mitocondrial
mRNA –Ácido ribonucleico mensageiro
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

O_2^- - Ânion Superóxido

O_2 – Oxigênio

OMS – Organização mundial de Saúde

OVX – Ovariectomia

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM - Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PC – Peso corporal

PDFVE – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PU – Peso de útero

Sham - Animais submetidos à operação fictícia

Sham+EF - Animais submetidos à operação fictícia que realizaram o treinamento 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

TRH – Terapia de Reposição Hormonal

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia	17
1.2 Remodelamento Ventricular	17
1.3 Morte Celular	18
1.4 Remodelamento da Matriz Extracelular	19
1.5 Ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona no Processo de Remodelamento	20
1.6 Ativação Neural no Processo de Remodelamento	22
1.7 Estresse Oxidativo no Processo de Remodelamento	22
1.8 Diferenças de Gêneros no Processo de Remodelamento	23
1.9 Atividade Física no Processo de Remodelamento	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	
3.1 – Objetivo Geral	30
3.2 – Objetivos Específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 - Animais Experimentais	32
4.2 – Ovariectomia	32
4.3 - Indução do Infarto do Miocárdio	33
4.4 - Grupos Experimentais	35
4.5 - Treinamento Físico	35
4.6 - Protocolo Experimental	36
4.7 - Avaliações hemodinâmicas	36

4.8 - Coleta de tecido	38
4.9 - Análises Histológicas	38
4.10 - Análise do colágeno e hipertrofia	38
4.11 - Análise da extensão do infarto	39
4.12 - Western Blotting	39
4.13 - Atividade da Citrato Sintase	40
4.14 - Análise Estatística	41

5. RESULTADOS

5.1 - Peso corporal e dos órgãos	43
5.2 - Parâmetros hemodinâmicos arteriais	45
5.3 - Parâmetros funcionais cardíacos	46
5.4 - Expressão proteica do receptor AT1 e gp91phox	47
5.5 - Expressão proteica das enzimas antioxidantes	48
5.6 - Avaliação da extensão do infarto	49
5.7 - Avaliação da deposição de colágeno intersticial	50
5.8 - Avaliação da Hipertrofia cardíaca	51
5.9 - Principais resultados	52

6. DISCUSSÃO

55

7. CONCLUSÃO

63

8. REFERÊNCIAS

64

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) prevalecem como a principal causa de mortalidade e incapacidade no mundo (Mendis et al. 2011). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 ocorreram 17,3 milhões de mortes por DCV, dentre os quais destaca-se o infarto do miocárdio (IM) sendo responsável por 7,3 milhões de mortes (World Health Organization, 2011).

No Brasil entre 1995 e 2005 o IM apresentou um profundo impacto no quadro de internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS), com um aumento de 61% no número de internações, resultando em um alto custo para a saúde pública (Timerman et al. 2006). Em 2010, o número de mortalidade hospitalar dos pacientes internados por IM se manteve persistentemente elevado, com média de 15,3% do total das internações registradas em todo país.

A implementação da prevenção primária e estratégias de intervenções têm permitido maior acesso da população ao tratamento adequado e, conseqüentemente, ajudado a reduzir a taxa de mortalidade após um evento agudo isquêmico (Marcolino et al. 2013; Bordon et al. 2002). Entretanto, o aumento de sobrevivência após o IM tem colocado a doença coronariana, juntamente com a hipertensão, como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Lloyd-Jones et al. 2002).

1.2 Remodelamento Ventricular

Na medida em que as cardiopatias evoluem para a insuficiência cardíaca, observam-se uma série de alterações morfofuncionais, chamadas de “Remodelamento ventricular”. O remodelamento ventricular é representado pelas alterações morfológicas que ocorrem no ventrículo como consequência das adaptações às alterações funcionais impostas pelo processo patológico que desencadeou a cardiopatia. Esse remodelamento é influenciado por fatores físicos (mecânicos), neurohumorais e genéticos existentes no momento e no evoluir da doença que desencadeia a insuficiência cardíaca (Brozena & Jessup, 2003).

A fase inicial do remodelamento ventricular após o IM é considerada benéfica e adaptativa, porém, a persistência na isquemia resulta na dilatação ventricular, redução da função sistólica, disfunção da válvula mitral e insuficiência cardíaca sintomática (Ricardo et al. 2004). O processo de remodelamento cardíaco patológico ocorre em várias condições clínicas, incluindo infarto do miocárdio, cardiomiopatias dilatadas ou adquiridas e hipertensão arterial (Brozena & Jessup, 2003).

1.3 Morte Celular

No IM a oclusão aguda e persistente da coronária resulta na redução do fluxo sanguíneo para o tecido, promovendo a morte do miócito (Ricardo et al. 2004). A morte celular no miocárdio isquêmico pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose, sendo que a principal forma de morte celular na fase aguda após um processo isquêmico é a necrose celular (Konstantinidis et al. 2013). A perda da integridade da mitocôndria após o IM promove a liberação citosólica de fatores pro-apoptóticos contribuindo para a apoptose do cardiomiócito (Tsujiimoto et al. 1998; Lomonosova et al. 2010). Estudos demonstram que a apoptose tem grande repercussão durante o processo de remodelamento e progressão da insuficiência cardíaca, estando este fato associado a um desbalanço na expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas (Bax e Bcl2 respectivamente) (Takemura & Fujiwara, 2004; Olivetti et al. 1997). Na fase aguda do infarto, na área não infartada, ocorre um aumento na expressão da Bax em paralelo com a redução da expressão de Bcl-2, esses fatores em conjunto vão facilitar a apoptose nas áreas fora da região infartada, aumentando a depleção da célula (Cheng et al. 1996). Além disso, mediadores finais da via apoptótica, as caspases 3 são ativadas em resposta a outros estímulos apoptóticos além do desequilíbrio da relação (Thornberry et al. 1998). Têm sido evidenciado que a inibição das caspases 3 é capaz de reduzir o processo de remodelamento via redução da dilatação e disfunção ventricular após o IM (Balsam et al. 2005). Portanto, a modulação da apoptose pode se constituir como um elemento essencial para a atenuação do remodelamento ventricular após o IM.

Após a fase de morte celular (predominantemente necrose), são liberados moléculas de alarme (DAMP) que ativarão as respostas imunitárias inata e adaptativa, iniciando

um processo de reparo cardíaco que inclui a inflamação, com reabsorção do tecido morto e indução do reparo (neoformação de tecido conjuntivo) que resultará na cicatriz na área infartada. (Liehn et al. 2011). Na fase inicial do reparo cardíaco ocorre a infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Frangogiannis et al. 2012). No miocárdio isquêmico os neutrófilos são responsáveis pela liberação das metaloproteinases de matriz (MMP, sigla referente ao Inglês “matrix metaloproteinases”) iniciando a degradação de colágeno e preparação do tecido para a sua regeneração e reconstrução. Os macrófagos tem como a principal função realizar a fagocitose do tecido necrótico, além de produzir e liberar citocinas para estimular a proliferação de fibroblastos e a intensa produção de colágeno (Frantz & Nahrendorf, 2014). As citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , sigla referente ao inglês “tumor necrosis factor”), Interleucinas (IL-6 e IL-1 β) não são constitutivamente expressas no coração normal (Kapadia et al. 1995). Entretanto, estudos experimentais demonstram uma superexpressão dessas citocinas após o IM com consequente aumento da atividade das MMPs na área infartada, além do aumento do peptídeo natriurético (ANP) e aumento na expressão de colágeno no miocárdio não infartado (Irwin et al. 1999; Deten et al. 2002), sugerindo a participação dessas citocinas no processo de remodelamento após o IM.

1.4 Remodelamento da Matriz Extracelular

O aumento exacerbado da resposta inflamatória citado anteriormente leva a modificações da matriz extracelular com consequentes alterações na forma e função do coração (Spinale et al. 2007). A estimulação da degradação de colágeno é regulada por uma variedade de citocinas inflamatórias tais como, TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β (sigla derivada do inglês “Transforming growth factor”), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF, do inglês “Connective Tissue Growth factor”), TIMP (do inglês “tissue inhibitor of matrix metalloproteinase”), entre outros (Creemers et al., 2001). O aumento do TGF- β induz a conversão de fibroblastos em miofibroblasto com consequente aumento na deposição de colágeno. Além disso, o aumento na expressão do mRNA do CTGF após o IM está envolvido na deposição de colágeno na região infartada, aumentando também na área não infartada durante o processo de

cicatrização (Dean et al. 2005). No miocárdio, a matriz extracelular corresponde ao complexo de macromoléculas que fornece uma rede de suporte estrutural a geometria do miocárdio durante o ciclo cardíaco. Assim, a perda ou descontinuidade do interior da rede pode levar mudanças da geometria e função do coração (Spinale et al. 2002). Um dos fatores determinantes no processo de remodelamento cardíaco é a perda da matriz extracelular pelas MMPs no miocárdio (Whittaker et al. 1991). As MMPs são enzimas essenciais envolvidas na dinâmica da matriz extracelular, estão presente no interstício do miocárdio na forma inativa, e, quando ativadas, participam da degradação de colágeno (Creemers et al. 2001). Evidenciando a participação das MMPs no remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio, Rohde et al. (1999), observaram que a inibição das MMPs pela administração do inibidor específico de MMP (PD166793), reduz a dilatação do ventrículo esquerdo em camundongos após o IM. Além disso, estudos têm demonstrado que alterações na atividade das MMPs estão associados a progressão da insuficiência cardíaca após o IM (Peterson et al. 2001; Creemers et al. 2001). Diante desses dados, observamos que no miocárdio isquêmico a inflamação e o remodelamento da matriz extracelular estão envolvidos no processo de reparo tecidual, que, no entanto, podem ser importantes alvos terapêuticos na redução do processo de remodelamento e prevenção da insuficiência cardíaca.

1.5 Ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona no Processo de Remodelamento

O remodelamento ventricular após o IM também é caracterizado por alterações morfofuncionais tais como, aumento no diâmetro da câmara cardíaca e redução da função sistólica (Ricardo et al. 2004). A perda da eficiência do bombeamento cardíaco após o IM inicia uma resposta adaptativa no intuito de manter o débito cardíaco a valores próximos dos normais.

Estudos têm evidenciado o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) como um dos principais mediadores envolvido nesse processo (El-Sabban et al. 2000; Yamagishi et al. 1993; Meggs et al. 1993). A via clássica deste sistema é ativada pela diminuição da pressão arterial desencadeando nos rins a secreção da renina pelas células

justaglomerulares, enzima responsável pela clivagem de seu substrato, o angiotensinogênio, em angiotensina-I. Este hormônio não possui efeitos fisiológicos significativos, por sua vez, principalmente nos vasos pulmonares é convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina-II (Ang II), que exerce seus efeitos fisiológicos através de dois diferentes subtipos de receptores, conhecidos como AT1 e AT2 (Paul et al. 2006). A maioria dos efeitos fisiológicos conhecidos da Ang II são mediada via receptor AT1, que é amplamente distribuído no organismo humano, incluindo o fígado, as glândulas supra-renais, o cérebro, o pulmão, os rins, o coração e a vasculatura (Mehta & Griendling, 2007).

O SRAA tem um importante papel na regulação do processo fisiológico no sistema cardiovascular. Porém, a sua ativação de forma crônica e exarcebada após o IM conduzem a uma progressiva disfunção cardíaca (Mehta & Griendling, 2007). No miocárdio isquêmico ocorre a produção de renina pelos macrófagos e fibroblastos, contribuindo para a formação local de Ang II (Sun et al. 2001). Além disso, a expressão da ECA e do receptor AT1 nos macrófagos e fibroblastos sugere que a produção de Ang II têm importante papel nas reações inflamatórias e fibrogênicas de maneira autócrina após o IM (Busatto et al. 1997).

A ativação do SRAA após o IM pode promover a hipertrofia do cardiomiócito e aumento na deposição de colágeno (Robert et al. 1999; Busatto et al. 1997). Por exemplo, Patten et al. (2003), usando camundongos após o infarto do miocárdio, demonstraram que a administração de inibidores da ECA e do receptor AT1 inibiu a hipertrofia do VE e reduziu a expressão gênica de colágeno do tipo I. Além disso, o aumento na produção de Ang II aumenta a produção de aldosterona que é um importante mediador da hipertrofia do cardiomiócito, fibrose e apoptose (Mulrow et al. 1999; Sun et al. 2009; Sohn et al. 2010). Estudos experimentais e clínicos têm evidenciado que a inibição da ativação dos componentes do SRAA tais como, renina, ECA, AT1 e aldosterona contribui para a atenuação do processo de remodelamento e prevenção da insuficiência cardíaca após o IM.

1.6 Ativação Neural no Processo de Remodelamento

Além da ativação do SRA, a hiperatividade do Sistema nervoso simpático (SNS) após o infarto do miocárdio também contribui para o processo de remodelamento patológico, estando associado ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Cohn et al. 1984). O aumento nos níveis plasmático e teciduais de norepinefrina indicam um elevado tônus simpático após o IM, estando associado a hipertrofia cardíaca (Sutton et al. 2000), apoptose (Distefano et al. 2012), dilatação ventricular (Spinale FG, 2007) e ao aumento do risco de morte em pacientes com insuficiência cardíaca (Cohn et al. 1984).

Em humanos, a ativação do sistema nervoso simpático está associada a uma piora na sensibilidade baroreflexa arterial e pulmonar, bem como um aumento na resistência vascular (Ferguson et al. 1992).

Um dos mecanismos proposto para explicar a gênese da hiperatividade simpática é a ativação do sistema renina angiotensina cerebral. Em ratos Wistar, a infusão intracerebral, intraventricular e sistêmico de Losartan reduziu a hiperatividade simpática e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo após o IM (Huang et al. 2009). Nessa mesma linha, um estudo conduzido por Lal et al. (2005) utilizando ratos com deficiência de angiotensinogênio cerebral, demonstram uma atenuação do remodelamento cardíaco após o IM. Evidenciando assim, que a ativação do SRAA no cérebro desempenha um papel central no processo de remodelamento.

1.7 Estresse Oxidativo no Processo de Remodelamento

Os níveis aumentados de Ang II também auxilia indiretamente o remodelamento ventricular através do aumento na formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Viridis et al. 2011). Nos macrófagos e fibroblastos a geração das EROs (de particular importância o ânion superóxido (O_2^-)) é formada pela NADPH oxidase (Harrison et al. 2000). A NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular utilizando NADH ou NADPH como doadores de elétrons, sendo uma fonte constitutiva das EROs (Nedeljkovic et al. 2003). No coração a NADPH oxidase (subunidades gp22phox e gp91phox) é a maior fonte de O_2^- e é significativamente aumentada após o IM (Fukui et al. 2001). Além disso, tem sido demonstrado uma redução na atividade da superóxido

dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) no coração de ratos infartados (Hill & Singal, 1996). Essas enzimas fazem parte dos mecanismos celulares antioxidantes, e participam na dismutação do O_2^- em H_2O_2 pela SOD, que posteriormente é convertido em H_2O e O_2 pela CAT e GPx. Portanto, essas enzimas têm importante participação na prevenção da formação EROs (Schneider et al. 2004). Os níveis de GPx cardíaco também são reduzidos em pacientes com infarto agudo do miocárdio (Chiara et al. 2007).

Após o infarto do miocárdio as EROs estimulam a produção das citocinas inflamatórias e inversamente, as citocinas inflamatórias estimulam a produção das EROS (Nian et al. 2004; Irwin et al. 1999). Na fase crônica do IM, a formação das EROs e as citocinas inflamatórias ativam as MMPs e a deposição de colágeno, que contribui para a mudança estrutural e reparo tecidual do miocárdio isquêmico (Siwik et al. 2000; Deten et al. 2001). Essas observações indicam que o estresse oxidativo é o desbalanço entre a formação das EROs e a atenuação da capacidade de defesa antioxidante, fenômeno esse que se destaca como parte importante do processo de apoptose, da resposta inflamatória, fibrose cardíaca e hipertrofia do cardiomiócito.

1.8 Diferenças de Gêneros no Processo de Remodelamento

Ao longo dos anos tem sido demonstrado que o processo de remodelamento apresentam algumas diferenças de gêneros importantes (Piro et al. 2010). Estudos realizados em humanos sugere que homens e mulheres podem apresentar diferenças na modulação da via apoptótica na região infartada (Guerra et al. 1999). Nessa mesma linha, Biondi-Zoccai et al. (2005) demonstraram que a apoptose de células miocárdicas em homens que morreram após o IM foi maior quando comparado com mulheres, estando essa diferença relacionado com a maior expressão da Bax no miocárdio. Em modelo animal, Cavaasin et al. (2004) constataram que os camundongos machos quando comparados as fêmeas apresentam uma degradação da matriz extracelular prematura por causa do aumento no número de neutrófilos e da atividade das MMPs. Além disso, nesse mesmo estudo, foi verificado que os animais machos apresentaram

uma remoção do tecido necrótico e formação da cicatriz retardada, provavelmente devido ao menor número de macrófagos.

Entretanto, estudos sugerem que as diferenças entre homens e mulheres podem estar relacionadas aos hormônios sexuais, dentre eles, o 17- β estradiol (Piro et al. 2010; Pedram et al. 2010). Um estudo realizado em mulheres na pré e pós-menopausa mostrou que as que se encontram no período pós-menopausa apresentam evidências de um remodelamento ventricular esquerdo concêntrico com uma piora da função ventricular (Schillaci et al. 1998). Do mesmo modo, o tratamento com o 17- β estradiol em ratas ovariectomizadas, têm demonstrado atenuar o processo de remodelamento ventricular através da redução na deposição de colágeno e hipertrofia dos cardiomiócito (Júnior et al. 2012). Em outro estudo, foi demonstrado que a deficiência dos hormônios ovarianos através da ovariectomia pode induzir a uma redução na expressão de duas isoformas da SOD (SOD extracelular (ecSOD) e SOD mitocondrial (MnSOD)) em cultura de células do músculo liso, e este fato foi associado com um aumento na produção de radicais livres (Strehlow et al. 2003). De outra forma, Nickenig et al. (1998) avaliando a participação do estrogênio na modulação do receptor AT1 de Ang II, verificaram que a redução dos hormônios ovarianos levou a um aumento na densidade desse receptor.

Portanto, a redução dos hormônios ovarianos pode interferir de forma negativa em importantes vias que estão presentes durante o processo de remodelamento. Diante disso, ações que buscam atenuar o processo de remodelamento, tais como, tratamentos farmacológicos ou não farmacológicos são indispensáveis para a prevenção da insuficiência cardíaca pós IM.

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido uma das opções terapêuticas farmacológicas com o objetivo de reduzir o processo de remodelamento, assim como, a incidência de morbidade e mortalidade em mulheres após a menopausa. Estudos clínicos têm encontrado uma relação entre a TRH e redução de mortalidade em mulheres após a menopausa (Folsom et al. 1995; England et al. 1997; Shlipak et al. 2001). Um estudo conduzido por Bretler et al. (2012), evidenciaram que a TRH em mulheres após o IM pode reduzir os riscos de fibrilação atrial no primeiro ano após o

IM. Além disso, Shlipak et al. (2001), demonstraram que o uso da TRH antes da hospitalização por IM pode estar associado com a redução do risco de mortalidade hospitalar em mulheres na pós-menopausa. Um estudo experimental realizado em ratas ovariectomizadas avaliando a influência do 17- β estradiol na fase aguda e crônica após o IM, demonstraram que o uso da TRH na fase aguda do infarto pode ser prejudicial, resultando no aumento do tamanho do infarto. No entanto, cronicamente, a TRH pode reduzir a dilatação do ventrículo esquerdo após o IM (Smith et al. 2000). Entretanto, existem ainda muitas controvérsias acerca da utilização da TRH no processo de remodelamento após o IM, contudo, muitos estudos ainda são necessários.

Nesse contexto, a prática sistemática da atividade física vem sendo amplamente estudada como uma opção de tratamento após o infarto do miocárdio e prevenção da insuficiência cardíaca.

1.9 Atividade Física no Processo de Remodelamento

A inatividade física está associada com uma elevada incidência de morbidade e mortalidade (Carnethon et al. 2005). Vários estudos têm demonstrado que a atividade física induz a uma melhor capacidade aeróbica, conferindo uma sustentada cardioproteção contra as doenças cardiovasculares em modelos animais e humanos, melhorando assim a qualidade de vida (Brum et al. 2011; Campos et al. 2012; Erbs et al. 2010). Em pacientes com insuficiência cardíaca estável, submetidos a uma rotina de treinamento físico, observou-se melhora dos sintomas e aumento da tolerância ao exercício, com reflexos positivos na qualidade de vida, reduzindo o número de hospitalizações (Dubach et al. 2001). Em ratos alimentados com uma dieta rica em sal a partir dos 6 meses, Miyachi et al. (2009) relataram que 9 semanas de treinamento físico de natação foi capaz de reduzir a fibrose intersticial e aumentar de densidade dos capilares no miocárdio, associado com um remodelamento cardíaco benéfico e atenuação da insuficiência cardíaca em ratos hipertensos.

Estudos experimentais relatam que a atividade física está associada a inúmeros efeitos benéficos durante o processo de remodelamento após o IM. Resultados mais recentes

demonstram que ratas fêmeas submetidas a um programa de treinamento intervalado durante oito semanas apresentaram uma redução da deterioração da contratilidade cardíaca associado a uma atenuação de disfunção mitocondrial após o IM (Kraljevic et al. 2013). Além disso, ratos obesos que realizaram um treinamento físico durante o mesmo período de tempo, demonstraram uma cardioproteção através da redução do estresse oxidativo e melhora da capacidade antioxidante (Barbosa et al. 2012). Outros estudos que analisaram os efeitos do exercício físico praticado de forma crônica demonstram que o mesmo pode ainda reduzir a severidade do processo de remodelamento por redução da atividade simpática (Flores et al. 2010), redução da hipertrofia do cardiomiócito (Wisloff et al. 2002) e redução nos níveis circulantes de Ang II (Negra & Middlekauff, 2008).

Como citado anteriormente, a redução dos hormônios ovarianos pode interferir negativamente sobre vias importantes durante o processo remodelamento. Muitos são os relatos sobre os efeitos benéficos do treinamento físico na atenuação do processo de remodelamento após o infarto do miocárdio. Contudo, ainda não temos o conhecimento de um estudo que avaliou os efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros funcionais cardíacos e sobre o processo de remodelamento em ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio.

Nesse contexto a hipótese do presente estudos é que o treinamento físico praticado de maneira crônica, possa interferir positivamente através da atenuação do processo de remodelamento em ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio. Como já demonstrado em outros modelos experimentais, o treinamento físico pode atuar melhorando a capacidade do sistema antioxidante e a redução da ativação do SRAA, com consecutiva melhora da função cardíaca nesse modelo experimental.

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

De acordo com Kober et al. (1998), cerca de 40% dos pacientes com IM desenvolvem disfunção ventricular com ou sem sinais de Insuficiência cardíaca, que adversamente influencia na qualidade de vida, taxas de hospitalização e mortalidade. Tendo em vista que a redução dos hormônios ovarianos no período pós-menopausa é um importante fator de risco para o aumento da incidência de insuficiência cardíaca e da mortalidade após o IM, avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a função cardíaca em ratas ovariectomizada após o IM pode contribuir para o entendimento dos mecanismos pelos quais o treinamento físico pode auxiliar na melhora da função cardíaca com a ausência dos hormônios ovarianos após o infarto do miocárdio e, portanto, contribuindo para que o exercício físico se justifique como uma importante estratégia terapêutica para a reabilitação cardíaca e prevenção da insuficiência cardíaca em mulheres acometidas por um evento cardíaco isquêmico após a menopausa.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico de corrida em ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio sobre os principais parâmetros funcionais cardíacos, além de verificar as respostas adaptativas sobre o sistema renina angiotensina e o sistema antioxidante cardíaco.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do treinamento físico crônico sobre os parâmetros funcionais cardíacos de ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio;
- Analisar os efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros morfométricos cardíacos em ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio;
- Analisar a expressão dos receptores AT1 no músculo cardíaco de ratas ovariectomizadas, submetidas ao treinamento físico crônico após o infarto agudo do miocárdio;
- Analisar a expressão da gp91phox (subunidade da NADPH oxidase) no músculo cardíaco de ratas ovariectomizadas, submetidas ao treinamento físico crônico após o infarto do miocárdio.
- Analisar as respostas do treinamento físico sobre a expressão das enzimas do sistema antioxidantes, Superóxido Dismutase (SOD 2), Catalase (CAT) no músculo cardíaco de ratas ovariectomizadas após o infarto do miocárdio.
- Analisar a atividade da citrato sintase no músculo sóleo das ratas que realizaram o treinamento físico.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), com oito semanas de idade, pesando entre 250-300 gramas. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), acomodadas em gaiolas coletivas com no máximo cinco ratas por gaiola, tendo livre acesso à água e comida. Os animais foram acomodados em uma sala com temperatura entre 22 e 24°C e ciclo de dose horas claro e escuro. O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Animais do Centro Biomédico da 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, e o descarte dos animais feitos em um freezer contido no Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, onde foi dada a destinação apropriada.

4.2 Ovariectomia

Após anestesia com uma mistura de ketamina (50mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL) as ratas foram submetidas a uma incisão de aproximadamente 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, tendo a cavidade peritoneal aberta para remoção dos ovários (ovariectomia) e ligadura da tuba uterina em ambos os lados.

Após a retirada dos ovários foi realizada a sutura da musculatura e pele. Ao final do procedimento, os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina – 2,5% - 0,1 mL – *i.m.*). Para comprovação do sucesso da cirurgia, após o sacrifício, o útero foi retirado e pesado úmido. O grupo controle foi submetido a uma cirurgia fictícia.

4.3. Indução do Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio foi obtido pela oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, conforme a técnica descrita por (Baldo et al. 2012). Sete dias após a ovariectomia, os animais foram pesados e anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo uma mistura de ketamina (50mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10mg/kg, BAYER, BRASIL). Alcançado o plano anestésico desejável (confirmado pela ausência do reflexo da córnea), os animais tiveram seus membros fixados a uma mesa cirúrgica, em posição supina. Com uma pequena depilação no lado esquerdo do tórax e adequada assepsia do local, foi realizado uma incisão na pele do animal para exposição e dissecação dos músculos intercostais. Uma sutura em forma de uma bolsa foi preparada previamente para 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). (Figura 2) Após a oclusão, o tórax foi imediatamente fechado com a sutura em bolsa previamente preparada. No caso dos animais que necessitaram, foi realizada uma ventilação mecânica feita com máscara de borracha aplicada diretamente sobre os orifícios nasais. Três grupos de animais (controle, OVX+SHAM_{SED} e OVX+SHAM_{EF}) foram submetidos ao procedimento de cirurgia fictícia, que consistiu na aplicação de todos os passos descritos anteriormente, exceto a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam uma injeção de antibiótico Enrofloxacina – 2,5% (10 mg/Kg, Vencofarma, Brasil) por via intramuscular.



Figura 2. Demonstração da oclusão da artéria descendente anterior esquerda com um fio mononylon 6.0.

4.4. Grupos Experimentais

Duas semanas após a indução do infarto do miocárdio os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: Controle, OVX+SHAM_{SED}, OVX+SHAM_{EF}, OVX+IM_{SED} e OVX+IM_{EF}. (Figura 3)

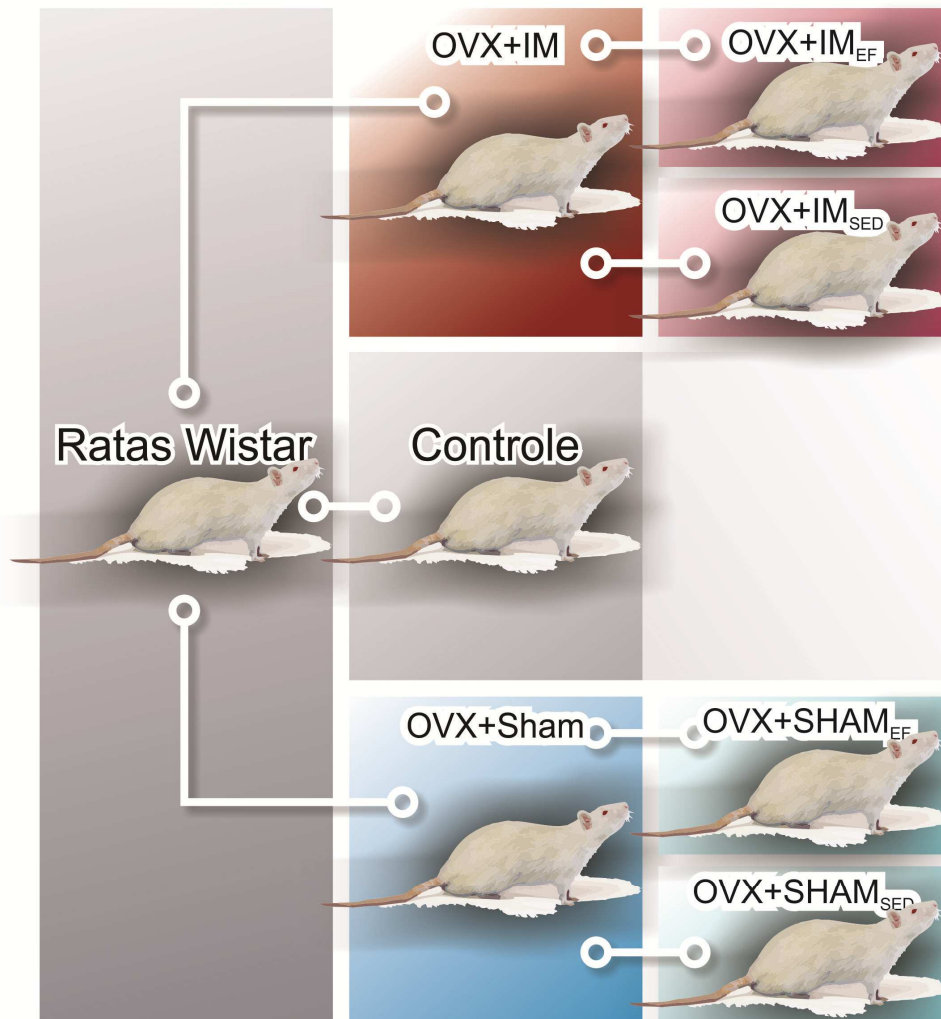


Figura 3. Representação esquemática da distribuição dos grupos.

4.5. 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. O protocolo de treinamento consistiu da modificação de um

protocolo utilizado previamente para treinamento de ratas fêmeas, ovariectomizadas, após o infarto do miocárdio (Flores et al., 2010).

O período de treinamento foi dividido em duas fases, fase de adaptação com duração de uma semana no qual os animais correram 10 min/dia a 0.3 Km/h, esse tempo foi progressivamente aumentado até que no quinto dia os animais corressem continuamente por 60 minutos. A fase de treinamento foi iniciada a partir da segunda semana com duração de 60 min/dia, cinco vezes por semana com intervalo de dois dias para repouso. A intensidade foi gradualmente aumentada em uma velocidade de 0.3 para 1.2 km/h durante oito semanas. (Figura 4) Durante o período de treinamento físico, os animais que não conseguiram concluir o protocolo (3 animais do grupo OVX+IM_{EF}) foram excluídos do estudo, sendo substituídos por outros.

4.6. Protocolo Experimental

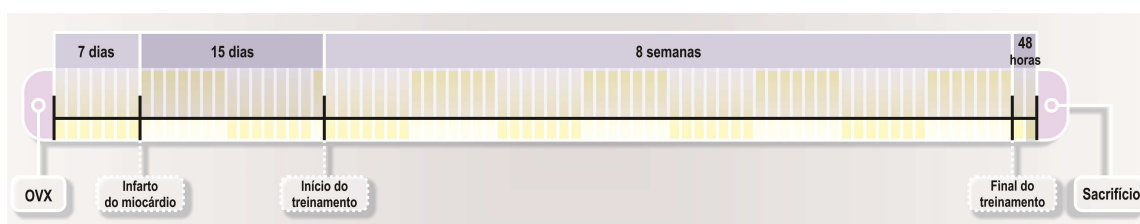


Figura 4. A figura 4 apresenta todo o protocolo utilizado neste trabalho, avaliando o efeito do treinamento físico crônico em ratas OVX após o infarto do miocárdio.

4.7. Avaliações hemodinâmicas

Quarenta e oito horas após o último dia de treinamento físico, os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de ketamina (50mg/kg, AGENER, BRASIL) e Xilazina (10mg/kg, BAYER, BRASIL) por via intraperitoneal. Atingindo o ponto anestésico, os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica na posição supina para o procedimento de cateterismo ventricular esquerdo como descrito por (Resende et al., 2007).

Foi realizada uma depilação e uma incisão na altura mediana do pescoço para acesso à artéria carótida direita. Um cateter de polietileno (PE50) preenchido com solução

salina heparinizada (50 U/ml – Ariston Heparina Sódica) foi introduzido no lúmen do vaso e em seguida conectado a um transdutor de pressão (FE221 Bridge amp, ADInstruments, Austrália) o qual foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35, ADInstruments, Austrália). Na artéria carótida direita foi obtida a frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM). No ventrículo esquerdo foram obtidas as pressões sistólica (PSVE) e diastólica final (PDFVE) do ventrículo esquerdo, além da derivada máxima de contração e relaxamento ($dP/dt+$ e $dP/dt-$, respectivamente). A figura 5 mostra uma curva típica de pressão ventricular esquerda, indicando os pontos de obtenção de cada parâmetro. Após a avaliação das pressões ventricular o cateter foi recuado para a artéria carótida para verificar se a valva aórtica não foi lesada. O sangue foi coletado por via cateter direto no tubo contendo EDTA.

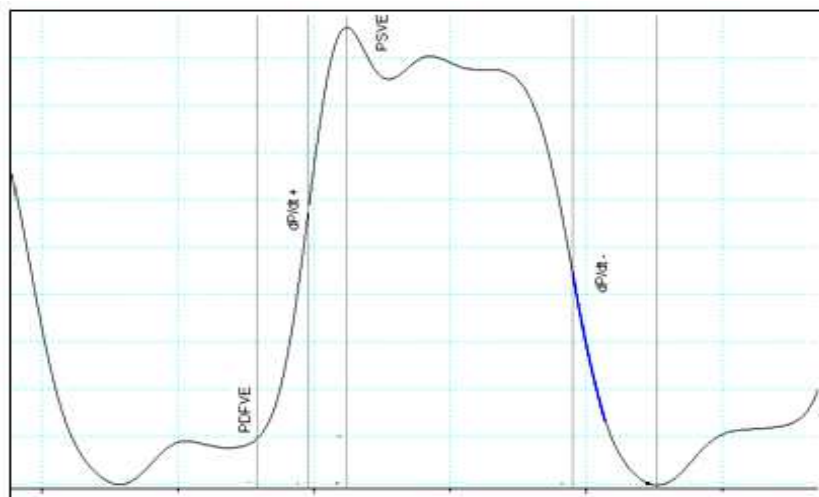


Figura 5. Figura representativa de uma onda de pressão ventricular, delimitando os pontos de onde foram obtidas as variáveis.

4.8. Coleta de tecido

Após as análises descritas acima, os corações foram rapidamente removidos e o ventrículo esquerdo foi separado e armazenado em recipientes contendo solução tamponada de formol (10%) para as análises histológicas. A coleta de tecido para a biologia molecular foi realizada da mesma forma, porém os ventrículos esquerdos foram armazenados em tubos criorresistentes, identificados apropriadamente e armazenados a -80°C. Os ventrículos direitos foram retirados e avaliados os pesos úmido e seco. Para calcular o percentual de água no pulmão, estes foram colocados em estufas a 96°C por 48 horas.

4.9 Análises Histológicas

Para as análises histológicas, os corações fixados em formol foram divididos em três fatias transversais de aproximadamente 2 mm. As fatias passaram por processo de desidratação em banho de álcool, diafanização em banhos de xilol e inclusão em bloco com banhos de parafina. Foram feitos cortes transversais em cada fatia com espessura de 4µm e montados em laminas de vidro, sendo coradas com picrosírius (Picrosírius Red, F3BA, FLUKA, EUA) ou hematoxilina e eosina (Vetec, Brasil) para as análises específicas descritas e seguir.

4.10 Análises do colágeno e hipertrofia

O ventrículo esquerdo foi dividido em três fatias de aproximadamente 2mm e posteriormente preparadas para histologia. Cada fatia foi serialmente cortada em seções transversais de 4 µm de espessura e coradas com picrosírius para determinar a área ocupada por colágeno. As fatias também foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para determinar área de secção transversa do miócito. A porcentagem de coloração vermelho do Picrosírius indicou o valor percentual ocupada por colágeno.

Nove áreas de cada corte foram analisadas na camada subendocárdica e subepicárdica. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) acoplado a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon) sob aumento de 400 vezes. Para avaliação da área de secção transversa do miócito, 40 a 60 miócitos posicionado perpendicularmente ao plano da secção e tendo tanto um núcleo visível e uma membrana de células claramente definida e ininterrupta foram selecionados em cada animal. Imagens celulares vistos com uma câmera de vídeo foram projetados em um monitor e rastreado. Imagens para a quantificação da deposição de colágeno e avaliação da área de secção transversa do miócito foram processadas com o software ImageJ (v. 1.43u, National Institutes of Health, EUA). (Forechi et al. 2012)

4.11 Análises da extensão do infarto

Para a análise da extensão do infarto do miocárdio, o ventrículo esquerdo foi dividido em seções transversais e corados com Picrosírius. Após este procedimento, as seções de imagem foram digitalizadas (Laserjet Pro M1132, HP, EUA) e analisados com o software ImageJ. (National Institutes of Health, EUA). O perímetro do epicárdio relacionada à área infartada (delimitado por Picrosírius coloração) foi delimitada. Todos os procedimentos foram repetidos para o endocárdio. Extensão do infarto foi apresentado como o valor percentual médio do perímetro infartada do ventrículo esquerdo. (Fraccarollo et al., 2008)

4.12 Western Blotting

A análise da expressão proteica 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

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).

4.13 Atividade da Citrato Sintase

Os músculos sóleos foram homogeneizados em um tampão de extração fosfato (fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM e cocktail inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, EUA)) com pH 7,4, centrifugadas durante 15 minutos a 12000 g e 4°C. Em seguida o sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio. A quantificação de proteína foi realizado pelo método de (Lowry & Rosebrough, 1951) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Após a quantificação de proteína, foi testada a quantidade de proteína a ser usada no ensaio, para isso, foi pipetado 7,5, 15, 30 ou 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína em cada poço da placa para cultura de célula, adicionado 200 μl de mistura de ensaio e 11 μl de substrato (oxaloacetato 0,5 mM). Após testar a quantidade de proteína ser usada foi iniciado a análise das amostras. Na placa foi

adicionado inicialmente 15 µg/µl da amostra e em seguida a mistura de ensaio, com a placa posicionada para a leitura foi pipetado o substrato e realizado a leitura. O tempo de duração do ensaio foi de 5 minutos, realizado a leitura de cinco amostras por vez, com comprimento de onda de 412nm e temperatura da leitura a 25°C. A atividade máxima de citrato sintase foi medida dentro do intervalo linear do ensaio.

4.14 Análise Estatística

Os valores das variáveis contínuas são apresentados como média ± SEM. Os dados das médias dos pesos de órgãos, da expressão proteica e dos parâmetros hemodinâmicos foram comparados pela análise de variância de uma via (ANOVA). Para verificar entre quais grupos houveram diferenças foi utilizado o teste post-hoc de Fisher. Testes não paramétricos foram utilizados para analisar os dados histológicos. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar o tamanho do infarto. Os valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Peso corporal e dos órgãos

Conforme apresentado na tabela 1, observa-se que não houve diferenças no peso corporal inicial entre os grupos, porém os pesos corporais finais nos grupos OVX estavam significativamente mais pesados quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Avaliando o efeito do treinamento físico sobre o peso corporal final, observou-se uma redução no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+SHAM_{SED} ($p < 0,05$). Quando analisado o somatório dos coxins de gordura (retroperitoneal e parametrial), verificou-se que o treinamento físico foi eficaz em prevenir o acúmulo excessivo de gordura abdominal nas ratas infartadas que realizaram o treinamento físico, demonstrando que o treinamento altera positivamente a composição corporal das mesmas.

O Peso do útero foi utilizado para analisar indiretamente a condição estrogênica nos animais, demonstrando uma redução nos grupos que foram OVX ($p < 0,05$). A atrofia que ocorre no útero após a OVX comprova a eficiência da cirurgia de castração. Avaliando o peso do pulmão, a razão peso do pulmão/peso corporal e o percentual de água no pulmão, demonstramos o aumento de ambas variáveis nos animais infartados ($p < 0,05$). Porém, ao final do protocolo de treinamento, foi observada uma redução da razão peso do pulmão/peso corporal no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED}, não havendo diferenças significativas nas outras variáveis.

O peso seco dos ventrículos direito foi significativamente maior nos grupos infartados em relação aos grupos controle e OVX+SHAM_{EF} ($p < 0,05$), não havendo diferenças associados ao treinamento físico após o IM.

A análise da atividade do citrato sintase foi verificada para demonstrar a efetividade do treinamento físico. Ainda na tabela 1, demonstramos um aumento na atividade dessa enzima nos animais que realizaram o treinamento físico quando comparado aos animais sedentários ($p < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros ponderais oito semanas após o treinamento físico

	Controle (n=12)	OVX+SHAM_{SED} (n=12)	OVX+SHAM_{EF} (n=12)	OVX+IM_{SED} (n=12)	OVX+IM_{EF} (n=12)
PC Inicial (g)	232 ± 5,74	233 ± 11,29	250 ± 8,84	240 ± 10,96	228 ± 7,38
PC Final (g)	268 ± 8,92	333 ± 6,06 [#]	312 ± 6,52 [#]	324 ± 8,13 [#]	304 ± 15,47 ^{#‡\$}
PC (% Variação)	15 ± 0,49	33 ± 2,08 ^{#†}	20 ± 2,00	26 ± 2,38 [#]	30 ± 2,31 ^{#†}
Gordura abdominal (g)	16,7 ± 1,67	20,2 ± 2,20	19,0 ± 1,23	25,0 ± 1,68 ^{#†}	17,2 ± 1,85 ^{\$}
PU (mg)	0,521 ± 0,02	0,121 ± 0,008 [#]	0,098 ± 0,005 [#]	0,090 ± 0,003 [#]	0,090 ± 0,003 [#]
VD seco (g)	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,05 ± 0,008 ^{#†}	0,05 ± 0,004 ^{#†}
Pulmão (g)	1,48 ± 0,07	1,70 ± 0,05	1,65 ± 0,08	3,07 ± 0,27 ^{#‡†}	2,75 ± 0,26 ^{#‡†}
Pulmão/PC (mg/g)	5,46 ± 0,28	5,05 ± 0,23	5,31 ± 0,21	8,95 ± 0,71 ^{#‡†}	7,15 ± 0,66 ^{#‡†\$}
% Água no Pulmão	79,9 ± 0,29	79,7 ± 0,31	79,4 ± 0,41	81,9 ± 0,48 ^{#‡†}	81,9 ± 0,45 ^{#‡†}
Atividade CS, $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	3270 ± 242	4105 ± 533	5870 ± 583 ^{#‡}	2933 ± 457 [†]	4753 ± 273 ^{#\$}

Dados são expressos como média ± EPM. PC, peso corporal; PU, peso do útero; VD, ventrículo direito; CS, citrato sintase. Três animais do grupo OVX+IM_{EF} foram excluídos do estudo durante o treinamento físico. [#] p < 0,05 vs Controle; [†] p < 0,05 vs OVX+SHAM_{EF}; [‡] p < 0,05 vs OVX+SHAM_{SED}; ^{\$} p < 0,05 vs OVX+IM_{SED}. (One-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Fisher)

5.2. Parâmetros hemodinâmicos arteriais

Na tabela 2 estão apresentados os parâmetros hemodinâmicos obtidos através do cateterismo arterial. Como esperado, o treinamento físico reduziu a frequência cardíaca nos animais OVX+SHAM_{EF} quando comparado aos grupos OVX+SHAM_{SED} e Controle (p<0,05). O mesmo não foi observado nos animais infartados, demonstrando um aumento da frequência cardíaca após o infarto que não foi revertido pelo treinamento físico.

Como verificado através do cateterismo arterial o infarto levou a uma redução das pressões arteriais sistólica, diastólica e média no grupo OVX+IM_{SED} quando comparado aos grupos Controle, OVX+SHAM_{SED} e OVX+SHAM_{EF}. Essa redução foi significativamente revertida após o treinamento físico no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED} (p<0,05). Esse fato pode estar associado à melhora da função cardíaca após o IM nos animais treinados. Esses dados também estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Efeito da ovariectomia e treinamento físico sobre a frequência cardíaca pressão arterial sistólica, diastólica e média.

	Controle (n=12)	OVX+SHAM _{SED} (n=12)	OVX+SHAM _{EF} (n=12)	OVX+IM _{SED} (n=12)	OVX+IM _{EF} (n=12)
FC (bpm)	202 ± 6	193 ± 9	167 ± 9 ^{#‡}	200 ± 9 [†]	213 ± 6 [†]
PAS (mmHg)	117 ± 6	135 ± 6 [#]	129 ± 5	107 ± 6 ^{‡†}	129 ± 3 ^{\$}
PAD (mmHg)	83 ± 5	106 ± 5 [#]	104 ± 4 [#]	85 ± 4 ^{‡†}	99 ± 3 [#]
PAM (mmHg)	93 ± 4	114 ± 6 [#]	115 ± 4 [#]	93 ± 6 ^{‡†}	112 ± 3 [#]

Dados são expressos como média ± EPM. FC, frequência cardíaca, PAS, pressão arterial sistólica, PAD, pressão arterial diastólica e PAM, pressão arterial média. # p < 0,05 vs Controle; † p < 0,05 vs OVX+SHAM_{EF}; ‡ p < 0,05 vs OVX+SHAM_{SED}; \$ p < 0,05 vs OVX+IM_{SED}. (One-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Fisher)

5.3. Parâmetros funcionais cardíacos

Conforme demonstrado na figura 6A não houveram diferenças significativas sobre a PSVE entre os grupos. A PDFVE (figura 6B) foi significativamente aumentada nos grupos OVX+IM_{SED} e OVX+IM_{EF} quando comparado aos grupos Controle, OVX+SHAM_{SED} e OVX+SHAM_{EF} ($p < 0,05$). Avaliando o efeito do treinamento físico após o infarto, observamos uma redução significativa da PDFVE no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED} ($p < 0,05$). Ainda, após as oito semanas de treinamento físico foi verificado um aumento do $dP/dt+$ no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED}, porém, sem alterações significantes do $dP/dt-$ causadas pelo treinamento físico (figura 6C e D).

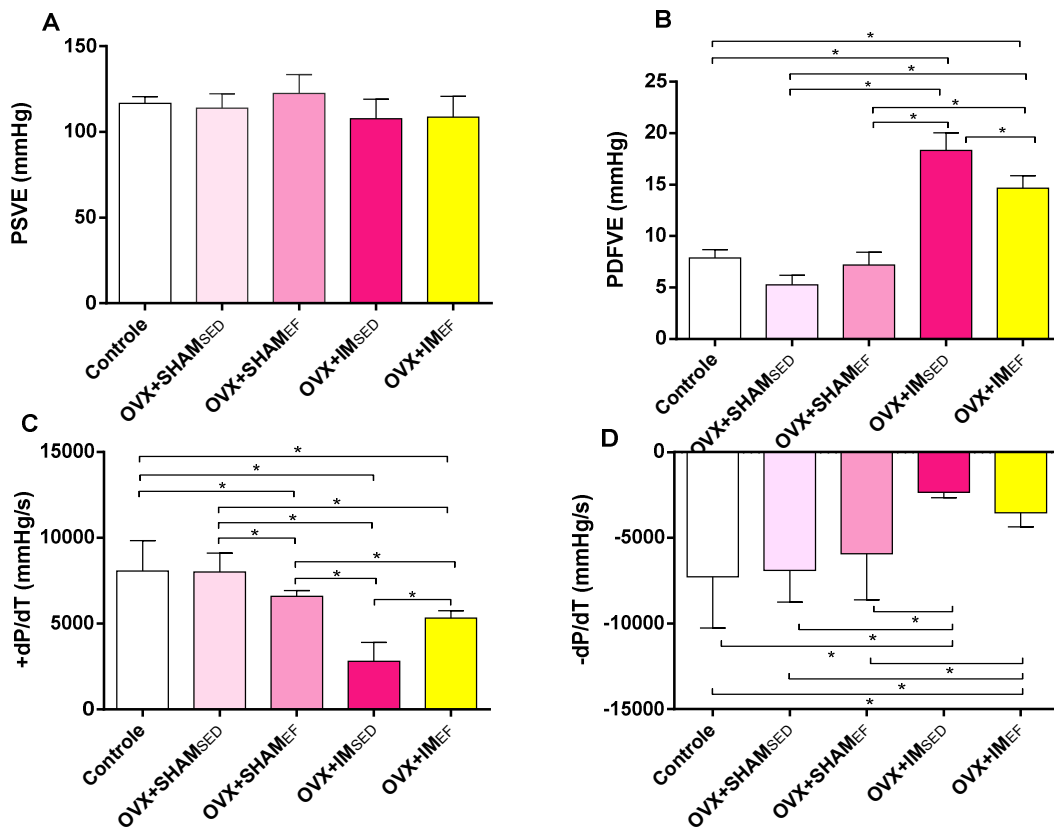


Figura 6. Avaliação funcional cardíaca. (A) Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE). (B) Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE). (C e D) Derivada máxima e mínima de pressão ($dP/dt+$ e $dP/dt-$). Dados são expressos como média \pm EPM ($n = 12$). $*p < 0.05$. (One-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Fisher)

5.4 Expressões proteicas do receptor AT1 e gp91phox

A expressão proteica do receptor AT1 no ventrículo esquerdo foi significativamente maior no grupo OVX+IM_{SED} quando comparado ao grupo OVX+IM_{EF} ($p < 0,05$), portanto, o treinamento físico conseguiu prevenir esse aumento, demonstrando uma redução significativa no grupo OVX+IM_{EF}. (Figura 7A)

Analisando a expressão proteica da gp91phox, que é uma subunidade da NADPH oxidase, pode observar na figura 7B que houve um aumento na expressão dessa enzima no grupo OVX+IM_{SED}. No grupo OVX+IM_{EF} o treinamento físico inibiu significativamente esse aumento quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED}. ($p < 0,05$)

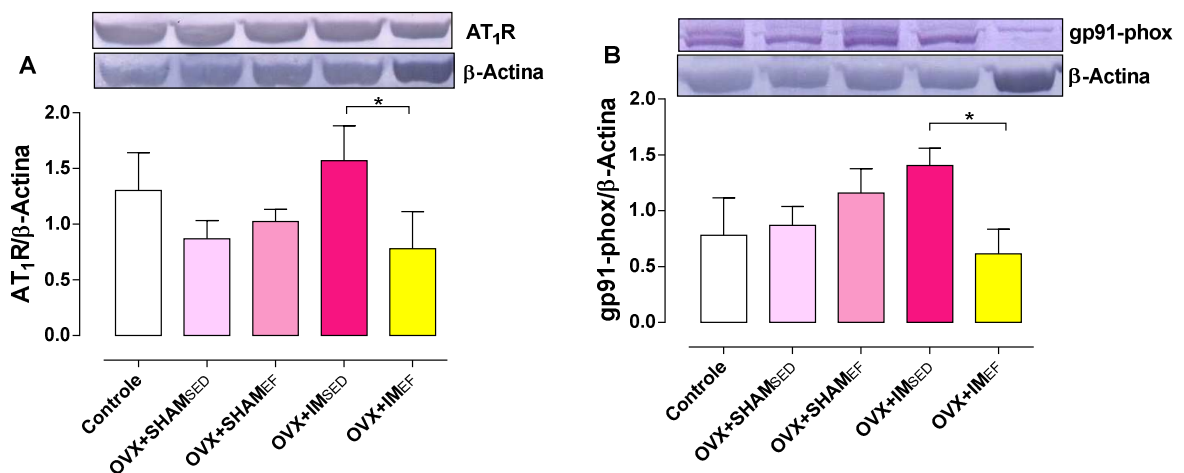


Figura 7. Expressão proteica do receptor AT1 (A) e gp91phox (B) no ventrículo esquerdo após oito semanas de treinamento físico. (n = 5). * $p < 0.05$. (One-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Fisher)

5.5. Expressão proteica das enzimas antioxidantes

Como observado na figura 8A não houveram diferenças significativas entre os grupos sobre a expressão da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD-2).

Analisando a expressão da enzima antioxidante CAT, que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 , observamos um aumento significativo no grupo OVX+IM_{EF} quando comparado a todos os demais grupos, demonstrando a efetividade do treinamento físico na melhora do sistema antioxidante. ($p < 0,05$) (Figura 8B)

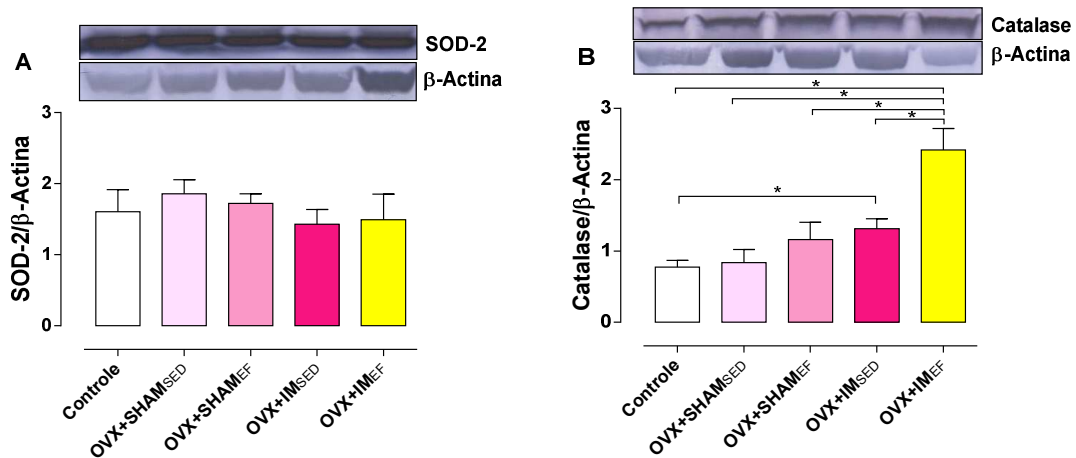


Figura 8. Expressão proteica das enzimas antioxidantes isoforma mitocondrial da superóxido dismutase (SOD-2) (A) e CAT (B). Dados são expressos como média \pm EPM, comparados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de pos hoc de Fisher. (n = 5). * $p < 0.05$.

5.6. Avaliação da extensão do infarto

A figura 9A e B mostra a área da extensão do infarto no ventrículo esquerdo corado com picosírius. Como observado na figura 9C, não houve diferença significativa na área de infarto entre os grupos avaliados.

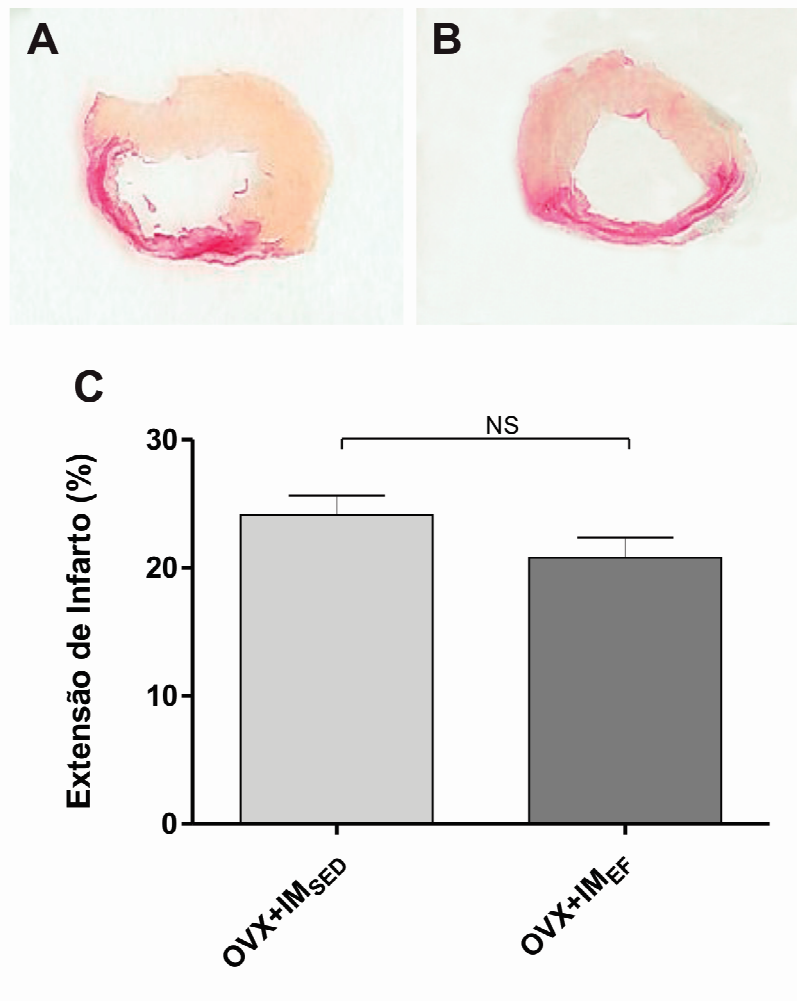


Figura 9. Extensão do infarto corado com picosírius após oito semanas de treinamento físico (A e B). Gráfico representativo da análise estatística da extensão do infarto (C) demonstrando a não diferença entre os grupos. Dados são expressos como média \pm EPM (n = 7). (Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos)

5.7. Avaliação da deposição de colágeno intersticial

As figuras 10 A, B, C, D e E mostram imagens representativas da área do miocárdio remanescente ao infarto ocupada por colágeno. Como demonstrado na figura 10F, o infarto levou a um aumento significativo da deposição de colágeno intersticial no grupo OVX+IM_{SED} quando comparado aos grupos Controle, OVX+SHAM_{SED}, OVX+SHAM_{EF} e OVX+IM_{EF}. Avaliando o efeito do treinamento físico sobre a deposição de colágeno intersticial, observou-se que o treinamento físico reduziu significativamente a deposição de colágeno nos grupos OVX+SHAM_{EF} e OVX+IM_{EF} após as oito semanas de treinamento. ($p < 0,05$)

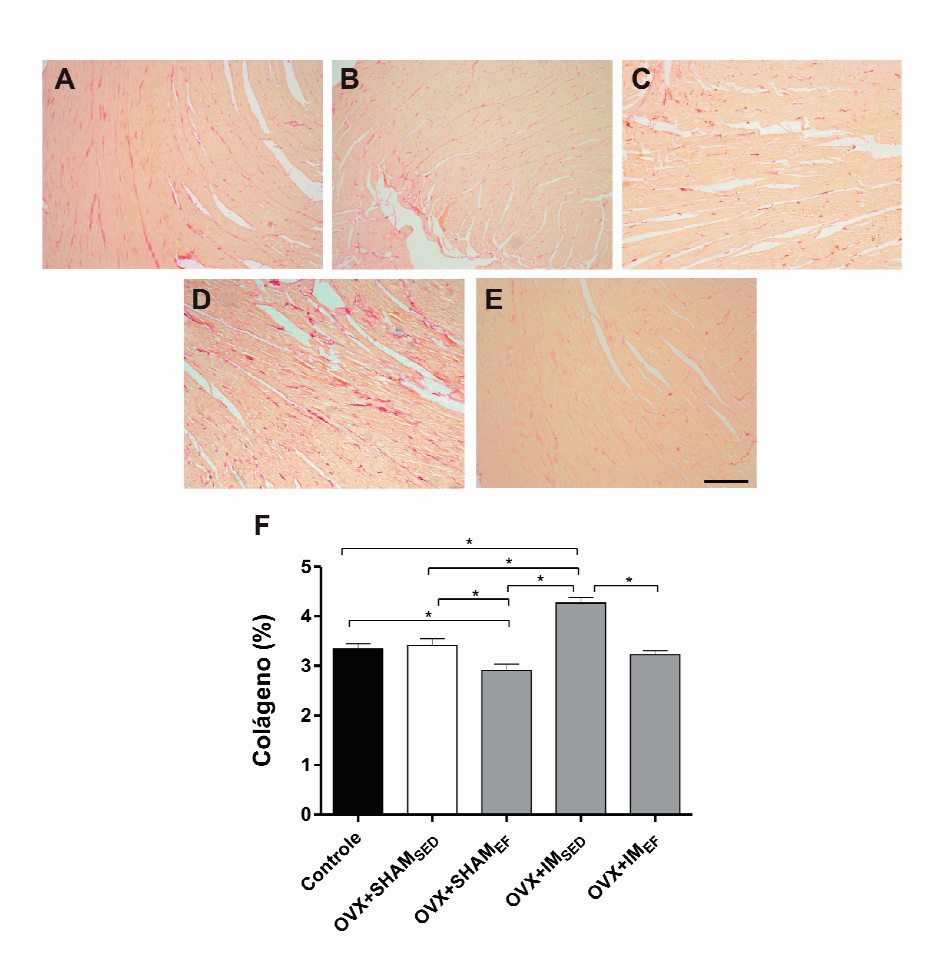


Figura 10. Avaliação da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo. Na parte superior da figura imagens representativas avaliadas em nove cortes transversais corados com picrosírius, em aumento de 400x dos animais Controle (A), OVX+SHAM_{SED} (B), OVX+SHAM_{EF} (C), OVX+IM_{SED} (D) and OVX+IM_{EF} (E). A figura 4F demonstra o percentual da deposição de colágeno entre os grupos. Dados são expressos como média \pm EPM ($n = 7$). * $P < 0.05$. Escala: 200 μ m. (Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos)

5.8. Avaliação da Hipertrofia cardíaca

Na figura 11 estão apresentadas na parte de cima as imagens representativas da área de secção transversa do miócito corado com hematoxilina e eosina. Assim como observado com a deposição de colágeno, o infarto aumentou significativamente a área de secção transversa do miócito no grupo OVX+IM_{SED}, o treinamento físico preveniu esse aumento no grupo OVX+IM_{EF}, assim como, reduziu no grupo OVX+SHAM_{EF} quando comparado ao grupo controle. ($p < 0,05$)

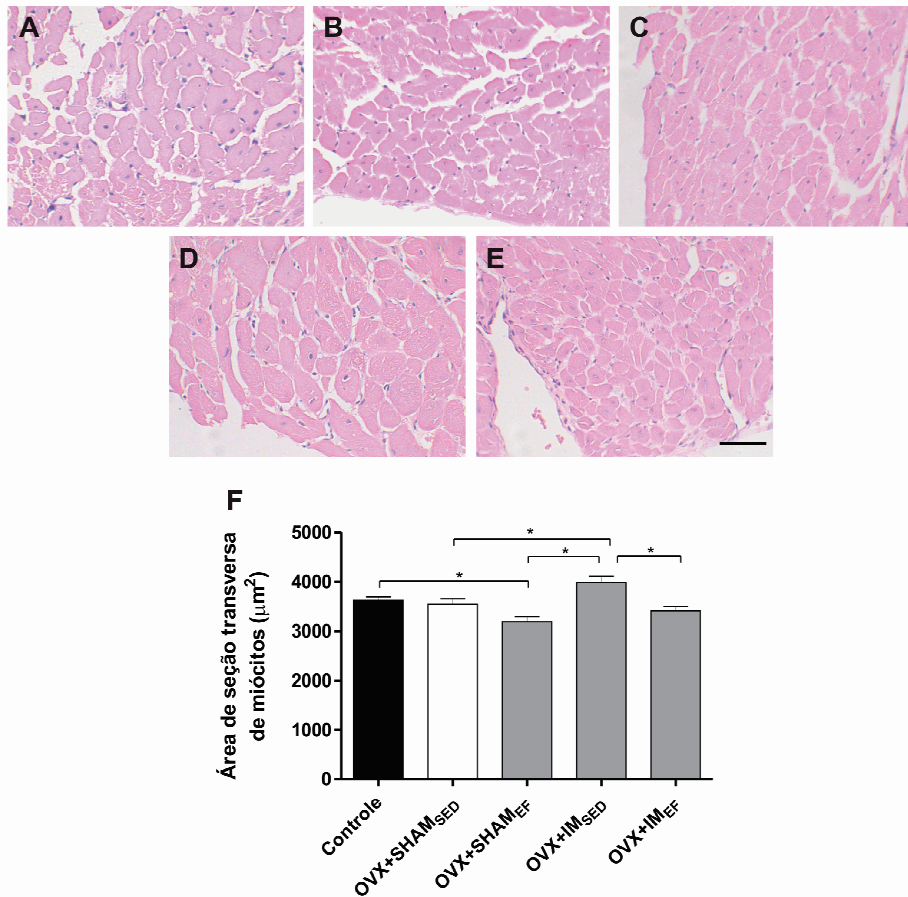


Figura 11. Avaliação da área de secção transversa do miócito. Imagens representativas das secções coradas com hematoxilina e eosina dos grupos controle (A), OVX+SHAM_{SED} (B), OVX+SHAM_{EF} (C), OVX+IM_{SED} (D) and OVX+IM_{EF} (E). Foram fotografadas 40 a 60 miócitos em cada corte, sob aumento de 400x e escala de 50 μm . Dados são expressos como média \pm EPM. ($n = 7$). * $p < 0.05$. (Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos)

5.9. Principais resultados

A figura 12 resume os principais resultados encontrados em nosso estudo.

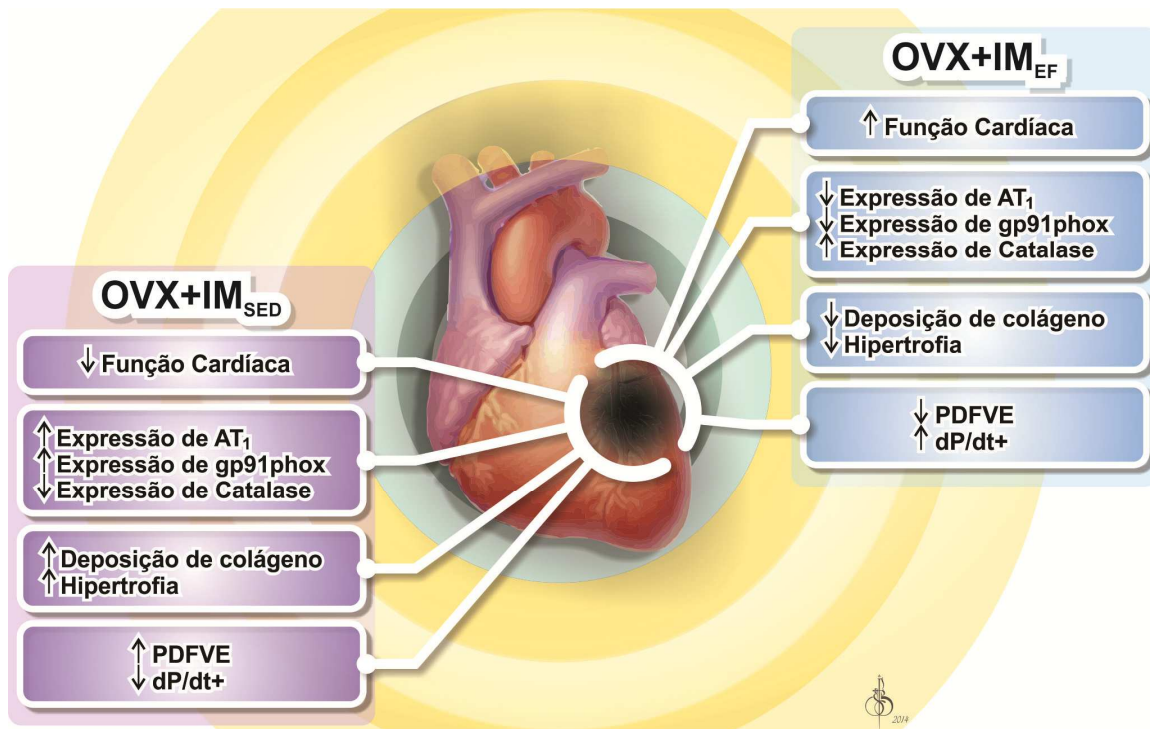


Figura 12. Diagrama dos efeitos do treinamento físico após o infarto do miocárdio em ratas OVX.

Como demonstrado no diagrama, às ratas OVX e submetidas ao infarto do miocárdio apresentaram uma redução da função cardíaca. Oito semanas após o infarto, os animais sedentários tiveram um aumento na expressão do receptor AT₁ e da enzima gp91phox, assim como a redução na expressão da CAT. Essas alterações proteicas foram acompanhadas do aumento na deposição de colágeno e da área de secção transversa do miócito, sinalizando uma excessiva fibrose intersticial e hipertrofia cardíaca. Além disso, os animais sedentários apresentaram um aumento da PDFVE e redução do dP/dt+.

Ao contrário do que foi observado nos animais OVX e infartados sedentários, o treinamento físico induziu a uma melhora da função cardíaca através da redução na expressão do receptor AT₁, redução da expressão proteica de uma das principais fontes na geração das espécies reativas de oxigênio no coração e melhora do sistema antioxidante, via aumento na expressão da CAT. Em conjunto, melhora desses

parâmetros levaram a uma redução da deposição de colágeno e redução da hipertrofia cardíaca. Por fim, essas importantes alterações levaram a uma redução da PDFVE e aumento do $dP/dt+$ após oito semanas de treinamento físico, reforçando a importância desses efeitos na redução dos efeitos deletérios do remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio.

DISCUSSÃO

6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do treinamento físico sobre a atenuação do processo de remodelamento, assim como, a melhora da função cardíaca em ratas ovariectomizadas após o IM.

Diante disso, obtivemos três achados principais: i) o treinamento físico melhorou os parâmetros relacionados à função cardíaca em ratas ovariectomizada após o IM; ii) atenuou os efeitos do remodelamento induzido pelo IM e, iii) reduziu a expressão de proteínas de uma das principais vias geradoras de espécies reativas de oxigênio, assim como, aumentou a expressão da enzima antioxidante catalase, o que contribui para a melhora da função contrátil e para a redução do processo de remodelamento.

Em nosso estudo, pode-se observar um aumento no peso corporal final nos grupos OVX quando comparados ao grupo controle. Resultados similares foram encontrados em estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstrando um aumento do peso corporal final acompanhado do aumento da adiposidade abdominal total em ratas ovariectomizadas (Endlich et al. 2011; Claudio et al. 2013). Uma das explicações para o aumento do peso corporal após a redução dos hormônios ovarianos está relacionado com uma série de alterações metabólicas ocorridas nesse período resultando no aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento da obesidade (Zoth et al. 2010). Em mulheres, esses resultados se reproduzem, mostrando um aumento do peso corporal associado ao aumento no percentual de gordura após a menopausa (Sénéchal et al. 2011).

Ainda, observamos também que o treinamento crônico de corrida não conseguiu prevenir o aumento do peso corporal no grupo OVX+SHAM_{EF}, porém, as ratas infartadas que realizaram o treinamento físico (OVX+IM_{EF}) apresentaram uma redução do peso corporal quando comparado ao grupo OVX+IM_{SED}. Esses dados corroboram as descrições feitas por Flores et al. (2010) utilizando o mesmo modelo animal e o mesmo protocolo de treinamento físico. Cabe ressaltar que, no presente estudo, a redução no peso corporal dos animais OVX+IM_{EF} foi acompanhado da redução da adiposidade abdominal, o que não foi observado no grupo OVX+SHAM_{EF}. Da mesma forma, ratos

obesos e infartados que realizaram dois meses de treinamento físico de corrida não apresentaram diferenças significativas sobre o peso corporal total, porém, tiveram uma redução da gordura abdominal (Barbosa et al. 2012). Diante disso, essa pode ser a explicação para a redução do peso corporal no grupo OVX+IM_{EF}, reforçando os efeitos positivos do treinamento físico sobre a composição corporal.

Além das alterações sobre o peso corporal, nossos resultados mostraram um aumento na razão do peso do pulmão pelo peso corporal (PP/PC) nos animais OVX+IM_{SED} quando comparado aos grupos controle, OVX+SHAM_{SED} e OVX+SHAM_{EF}. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Jasmim et al. (2003), evidenciando um aumento na razão do PP/PC duas e oito semanas após o infarto do miocárdio. Ao contrário do observado nos animais do grupo OVX+IM_{SED}, os animais do grupo OVX+IM_{EF} apresentaram uma redução da razão do PP/PC, que pode ser explicada pela melhora dos parâmetros funcionais, tal como, a redução da PDFVE no grupo que realizou as oito semanas de treinamento físico. Embora tenhamos evidenciado que o treinamento físico reduziu a razão PP/PC no grupo OVX+IM_{EF}, o mesmo não ocorreu com o percentual de água no pulmão. Corroborando a esses dados, Jain et al. (2000) demonstraram que ratos machos que realizaram cinco semanas de treinamento físico de corrida não apresentaram redução no percentual de água no pulmão após o protocolo de treinamento. Porém, Portes et al. (2009) observaram alterações significativas desse parâmetro em ratas infartadas sedentárias e infartadas que foram submetidas a oito semanas de treinamento de natação. Essas diferenças observadas podem ser explicadas pelo tipo de treinamento físico utilizado em ambos os estudos, visto que, a imersão na água reduz a força gravitacional, aumentando o retorno venoso, a pressão central, que conseqüentemente melhora a função ventricular (Pendergast & Lundgren 2009). Esses fatores em conjunto podem promover efeitos adicionais durante o treinamento físico.

Avaliando os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a pressão arterial após o IM, observamos que os animais OVX+IM_{EF} apresentaram um aumento da pressão arterial média quando comparado aos animais OVX+IM_{SED}, este fato pode ser explicado pela melhora da função cardíaca evidenciada pela redução da PDFVE e aumento da contratilidade ventricular demonstrado em nosso estudo. Embora o

treinamento físico tenha promovido efeitos benéficos sobre a pressão arterial após o IM, o mesmo não foi encontrado nos animais OVX+SHAM_{EF} quando comparado ao grupo OVX+SHAM_{SED}. Porém, um estudo realizado por Kemi et al. (2005), demonstraram que as adaptações cardiovasculares ao treinamento físico são dependentes da intensidade, evidenciando a importância da intensidade do programa de treinamento nas adaptações miocárdicas. Diante do exposto, esse fato pode explicar a não alteração de alguns parâmetros funcionais observado em nosso estudo.

Além dos achados citados acima, o treinamento físico também garantiu melhoras importantes durante o processo de remodelamento, uma delas é a redução na deposição de colágeno. O aumento na deposição de colágeno contribui para um remodelamento adverso após o IM (Tziakas et al. 2003). Em nosso estudo, os animais que realizaram oito semanas de treinamento físico apresentaram uma redução na deposição de colágeno quando comparado aos animais do grupo sedentário. Um dos mecanismos que pode explicar os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a deposição de colágeno após o IM está na redução da ativação do SRAA. A ativação neurohumoral após um evento cardíaco isquêmico aumenta a produção de Ang II pelos fibroblastos (Sun et al. 2009). A Ang II exerce seus efeitos através de dois subtipos de receptores, o AT1 e AT2, porém, com maior predominância do AT1 (Dostal et al. 1997). A ação da Ang II sobre o receptor AT1 nas células cardíacas leva ao aumento na deposição de colágeno por diferentes vias de sinalização (Tziakas et al. 2003). Esses efeitos progredem com a redução dos hormônios ovarianos (Júnior et al. 2012; Shlipak et al. 2001; Cavaşin et al. 2004). A redução nos níveis circulantes de estrogênio aumenta a produção de Ang II e Endotelina (ET-1) pelos fibroblastos, pelos macrófagos e também pelo endotélio. Sua ação mediante a ativação do fator de Transformação de Crescimento β (TGF- β) estimula a produção das metaloproteinases de matriz, a transformação de fibroblasto em miofibroblasto, tendo como resultado final a síntese dos colágenos do tipo I e III (Pedram et al. 2010). Cabe salientar que o coração de um adulto normal é formado por aproximadamente 2% a 4% de colágeno, o que lhe confere uma alta rigidez e resistência à tração, e, portanto, pequenas alterações na sua composição pode afetar de maneira adversa a contratilidade cardíaca, assim, quanto maior a concentração de colágeno, pior é a força desenvolvida

pelo ventrículo (Brower & Gardner, 2006). Um estudo conduzido por Wan et al. (2007), avaliou os efeitos do treinamento físico sobre o SRAA e sobre o processo de remodelamento após o IM. Os autores demonstraram que a realização do treinamento físico após o IM em ratos machos pode reduzir os níveis circulantes da renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), Ang II e aldosterona, associado à preservação da função cardíaca. Esses efeitos foram independentes do tempo de início de treinamento físico (1 ou 6 semanas após o IM). Similarmente, Braith et al. (1999) verificaram que 16 semanas de treinamento físico é capaz de reduzir os níveis circulantes de Ang II em pacientes com insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. Importante ressaltar que embora não tenhamos avaliado os diversos componentes do SRAA, a redução na expressão do receptor AT1 em nosso estudo, pode sugerir que o treinamento físico tenha uma importante influência sobre a redução da deposição de colágeno. Ainda, demonstrando a importante influência do receptor AT1 no processo de remodelamento, Ju et al. (1997) evidenciaram que, o bloqueio do receptor AT1, está associado à redução da fibrose cardíaca após o IM.

Como demonstrado no presente estudo, a redução na deposição de colágeno nos animais treinados foi acompanhada do aumento da contratilidade ($dP/dt+$) e redução da PDFVE. O aumento na deposição de colágeno contribui para o aumento da rigidez e redução da complacência da câmara ventricular (Brower & Gardner, 2006). Diante disso, sua redução desempenha um papel vital na redução do remodelamento adverso após o IM (Sun et al. 2009), fazendo com que ocorra a distribuição normal da força de contração durante o ciclo cardíaco (Tombe et al. 2011). Semelhante ao descrito por outros autores (Sutton & Sharpe 2000; Ricardo et al. 2004; Zornoff et al. 2008), observamos que a redução na deposição de colágeno após o IM teve importante colaboração para a redução PDFVE, assim como, no aumento da contratilidade ventricular ($dP/dt+$).

A cascata de ativação neurohumoral, como já descrito anteriormente, quando ativado cronicamente, exerce vários efeitos deletérios após o IM, dentre eles, a hipertrofia cardíaca (Crabos et al. 1994). Isso pôde ser evidenciado quando Meggs et al. (1993) e Smith et al. (2000) constataram um aumento na expressão do receptor AT1 após o IM ou a redução dos hormônios ovarianos, o que ocasionou um aumento na expressão do

receptor de endotelina do tipo B, resultando na hipertrofia miocárdica. Além disso, o aumento na densidade do receptor AT1 em fibroblastos de ratos adultos pode induzir a hipertrofia e o remodelamento ventricular adverso (Crabos et al. 1994). Como descrito por Komukai et al. (2010), a redução dos hormônios ovarianos durante a menopausa, leva a um aumento na expressão do receptor AT1. No presente estudo observamos um aumento na área de secção transversa do miócito cardíaco no grupo IM indicando hipertrofia. Essa hipertrofia pode ser explicada pela expressão aumentada do receptor AT1 no ventrículo esquerdo desses animais. Porém, outros fatores também podem contribuir para esse efeito, como a hipertrofia miocárdica compensatória e a formação excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecido como estresse oxidativo.

As alterações na tensão da parede ventricular devido a excessiva dilatação da câmara cardíaca é considerada um mecanismo compensatório benéfico que tende a normalizar ou diminuir o estresse da parede, porém pode contribuir para a dilatação do ventrículo esquerdo e progressão da insuficiência cardíaca (Litwin et al. 1991). De acordo com a Lei de Laplace o estresse na parede do ventrículo esquerdo é proporcional à dimensão da cavidade, e inversamente proporcional a espessura da parede. Assim, o aumento na espessura da parede da câmara cardíaca compensa as alterações hemodinâmicas associadas à dilatação da câmara ventricular, tornando-se um mecanismo de hipertrofia compensatória. Diante desse fato, este pode também justificar o aumento da área de secção transversa dos cardiomiócito após o IM, que foi revertido pelo treinamento físico por meio da redução na dilatação evidenciado indiretamente pela redução da PDFVE, refletindo na redução do estresse da parede.

O estresse oxidativo é definido como um desbalanço entre os sistemas pró e antioxidante, de maneira que o primeiro predomina, causando dano celular via aumento das EROS. As enzimas antioxidantes, tais como a SOD, Catalase e a GPx desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase das EROs (Touyz et al. 2004). Após o IM a produção das EROs estão marcadamente aumentadas (Sun et al. 2009). Tem sido demonstrado que o complexo enzimático da NADPH oxidase é uma importante fonte na produção de ânion superóxido após o infarto do miocárdio e que contribui significativamente para o estresse oxidativo (Hafstad et al. 2013).

Esse complexo, possui duas subunidades associadas à membrana, a gp91phox (também conhecida por NOX2) e a p22phox, além de mais cinco subunidades que regulam e organizam o acoplamento da enzima na membrana, aumentando a sua atividade e produzindo constitutivamente ânion superóxido (Lassègue et al. 2012). No coração a gp91phox está envolvida no processo de remodelamento após o IM (Looi et al. 2008). Tem sido demonstrado que a ativação do receptor AT1 via Ang II no cardiomiócito leva a um aumento na produção de ânion superóxido mediante a ativação da NADPH oxidase, induzindo a hipertrofia do cardiomiócito por mecanismo dependente da ativação da Akt (Hafstad et al. 2013; Lassègue et al. 2012). Além disso, o aumento nos níveis de Ang II induz a ativação da Rac1 (outra subunidade da NADPH oxidase) em conjunto com a gp91phox, aumentando a produção das EROs (Hingtgen et al. 2006). O efeito pró-fibrótico da ativação da via Ang II/AT1 é também mediado pela gp91phox (Wilson et al. 2009). De forma geral, o aumento na expressão da gp91phox pode ser acompanhado do aumento na geração das EROs, e esse, por sua vez, ativa as metaloproteinases de matriz induzindo ao aumento na degradação da matriz extracelular com consequente aumento na deposição de colágeno, assim como, da hipertrofia do cardiomiócito do ventrículo esquerdo (Hafstad et al. 2013; Sun et al. 2007). Observações feitas por Yung et al. (2011), mostraram que a deficiência dos hormônios ovarianos em ratas ovariectomizadas aumenta a expressão da ECA, do receptor AT1 de Ang II e da NADPH oxidase, essas alterações foram acompanhadas do aumento do estresse oxidativo e redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Yung et al. 2011). Cabe ressaltar que o estrogênio é um composto antioxidante, e que, no entanto, a sua ausência pode elevar os níveis das EROS e ocasionar um efeito adicional após o IM (Kim et al. 2006). Em nosso trabalho, o treinamento físico reduziu a expressão da gp91phox nos animais OVX+IM_{EF}, como demonstrado anteriormente, essa redução foi acompanhada da redução na deposição de colágeno e da hipertrofia do cardiomiócito. Um estudo conduzido por (Barbosa et al. 2012), demonstraram que ratos obesos que fizeram um programa de treinamento durante 8 semanas tiveram uma redução na produção de ânion superóxido, acompanhado por um aumento na atividade da SOD e glutathiona peroxidase (GPx) no coração e aorta desse modelo animal. Resultados semelhantes foram observados por Pinho et al. (2012), mostrando

que diferentes protocolos de treinamento físico reduziu a produção de ânion superóxido em ratos machos após IM.

Demonstramos em nosso estudo, que em paralelo a redução na expressão da gp91phox, ocorreu uma melhora do sistema enzimático antioxidante, comprovado pelo aumento na expressão da catalase. Estudo recente em nosso laboratório demonstrou que oito semanas de treinamento físico de natação aumentou a expressão da catalase em artéria coronária de ratas OVX (Claudio et al. 2013). Diante disso, um possível efeito antioxidante relacionado com o treinamento físico é a maior sensibilidade da catalase aos efeitos do treinamento físico, colaborando assim, para os efeitos cardiovasculares benéficos do treinamento físico. Assim, um possível efeito antioxidante treinamento físico poderia contribuir na explicação desses resultados.

Diante do exposto, acredita-se que a ativação crônica do SRAA parece ser um dos principais componentes presente nas respostas patológicas do sistema cardiovascular após o IM e a redução dos hormônios ovarianos. (Sun et al. 2009; Pedram et al. 2010). Em nosso estudo, ocorreu uma redução na expressão do receptor AT1 de Ang II nos animais que realizaram oito semanas de treinamento físico após o IM. Descrições semelhantes foram descritos por Liu et al. (2000), evidenciando que a prática crônica de exercício é capaz de reduzir os níveis circulantes de Ang II em coelhos com insuficiência cardíaca crônica. Além disso, camundongos que realizaram 8 semanas de corrida apresentaram uma redução nos níveis de Ang II, assim como redução na atividade da ECA. Em conjunto, esses dados fornecem evidências de que a redução na ativação do SRAA no coração explica, em parte, os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a função cardíaca (Brum et al. 2011).

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Concluimos nesse estudo que o treinamento físico crônico na esteira melhora os parâmetros funcionais cardíacos em ratas ovariectomizadas após o IM. Nossos resultados demonstram que esses efeitos estão associados com a redução da expressão do receptor AT1, da gp91phox, assim como, o aumento da expressão da enzima antioxidante catalase, no coração, provavelmente contribuindo de forma positiva na redução dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. Esses dados reforçam a importância do treinamento físico após o IM como um alvo terapêutico para o restabelecimento da função cardíaca, tendo em vista que mulheres infartadas exibem um pior prognóstico quando estão no período pós-menopausa.

8. REFERÊNCIAS

- Baldo MP, Teixeira AKG, Rodrigues SL, Mill JG. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. *Food and chemical toxicology* 2012;50:3-4.
- Balsam LB, Kofidis T, Robbins RC. Caspase-3 inhibition preserves myocardial geometry and long-term. *Journal of Surgical Research* 2005;124:194-200.
- Barbosa V, Luciano TF, Vitto MF, Cesconetto PA, Marques SO, Souza DR, Bom K, Pimentel GD, Katashima CK, Ropelle ER, Pinho RA, Souza CT. Exercise training plays cardioprotection through the oxidative stress reduction in obese rats submitted to myocardial infarction. *International journal of cardiology* 2012;157(3)
- 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(1):99–101.
- Bordon JG, Paiva SAR, Matsubara LS, Inoue RMT, Matsui M, Gut AL, Ferreira ALA, Zornoff LAM. Redução da Mortalidade Após Implementação de Condutas Consensuais em Pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2004;82.
- Braith RW, Welsch MA, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepin CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;34(4):1170–5.
- Bretler DM, Hansen PR, Lindhardsen J, Ahlehoff O, Andersson C, Jensen TB, Raunso J, Torp-Pedersen C, Gislason GH. Hormone replacement therapy and risk of new-onset atrial fibrillation after myocardial infarction—a nationwide cohort study. *PloS one* 2012;7(12).
- Brower G, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Journal of Cardio* 2006;30(4):604–10.
- Brozena SC, Jessup M. The new staging system for heart failure. What every primary care physician should know. *Geriatrics* 2003;58(6):31–6.

Brum PC, Bacurau AVN, Medeiros A, Ferreira JCB, Vanzelli AS, Negrão CE. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011;44(9):827–835.

Busatto VC, Cicilin M, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Brazilian journal of medical and biological research* 1997;30(5):679–87.

Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, Kowaltowski AJ, Brum PC, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB. Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PLoS one* 2012;7(12):52764.

Carnethon MR, Gulati M, Greenland P. Prevalence and cardiovascular disease correlates of low cardiorespiratory fitness in adolescents and adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005;294(23):2981–8.

Cavasin M, Tao Z, Menon S, Yang X. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life sciences* 2004;75(18):2181–92.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984;31:819–823.

Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Experimental Cell Research* 1996;226:316–327.

Chiara B, Mafricib A, Campolo J, Famoso G, Sedda V, Parolini M, Cighetti G, Lualdi A, Fiorentini C, Parodi O. Low plasma glutathione levels after reperfused acute myocardial infarction are associated with late cardiac events. *Coronary Artery Disease* 2007;18:77–82.

Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moyses MR, Bissoli NS, Gouveia S A, Silva JF, Lemos VS, 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(6):64806

Crabos M, Roth M, Hahn AWA, Emet P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *The Journal of clinical investigation* 1994;93(6):2372–8.

Causes of death 2008: data sources and methods. *World Health Organization*, Geneva, 2011.

Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJ P. Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction: A New Approach to Prevent Heart Failure? *Circulation Research* 2001;89(3):201–210.

Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 2005;53(10):1245–56.

Deten A, Hořl A, Leicht M, Barth W, Zimmer H. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2001;33(6):1191–207.

Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer H. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovascular research* 2002;55(2):329–40.

Distefano G and Sciacca P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Italian Journal of Pediatrics* 2012; 38:41.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular Mechanisms of Angiotensin II in Modulating Cardiac Function : Intracardiac Effects and Signal Transduction Pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1997;2902:2893–2902.

Dubach P, Sixt S, Myers J. Exercise training in chronic heart failure : why , when and how. *Swiss Med Wkly* 2001;131:510–515.

El-Sabban M.E, 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 renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2000;1(4):369–78.

Endlich PW, Firmesb LB, Gonçalves WLS, Gouvea SA, Moysés MR, Bissoli NS, Reis AM, AbreuGR. Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats. *Peptides* 2011;32(8):1706–12.

England TN, Tampfer MJS, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *The New England Journal of Medicine* 1997;19:1769–1775.

Erbs S, Höllriegel R, Linke A, Beck EB, Adams V, Gielen S, Möbius-Winkler S, Sandri M, Kränkel N, Hambrecht R, Schuler G. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. *Circulation. Heart failure* 2010;3(4):486–94.

Ferguson DW, Berg WJ, Roach PJ, Oren RM, Mark AL. Effects of heart failure on baroreflex control of sympathetic neural activity. *Am J Cardiol* 1992;69:523-531.

Flores LJ, Figuero D, Sanches IC, Jorge L, Irigoyen M, Rodrigues B, Angelis K. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. *Menopause* 2010;17(4):712–7.

Folsom AR, Mink PJ, Sellers TA, Hong C, Zheng W, Potter JD. Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women. *American journal of public health* 1995;85(8 Pt 1):1128–32.

Forechi L, Baldo MP, Meyerfreund D, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor improves early remodeling in isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Pharmacological reports* 2012;64(3):643–9.

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(4):905–14.

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research* 2012;110(1):159–73.

Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research* 2014;1–9.

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* 2001;281(5):1200–6.

Jain M, Liao R, Ngoy S, Whittaker P, Apstein CS, Eberli F. Angiotensin II receptor blockade attenuates the deleterious effects of exercise training on post-MI ventricular remodelling in rats. *Cardiovascular Research* 2000;46:66–72.

Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Loreto CD, Beltrami CA, , Kajstura J, Anversa P. Myocyte Death in the Failing Human Heart Is Gender Dependent. *Circulation Research* 1999;85(9):856–866.

Hafstad AD, Nabeebaccus A, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic research in cardiology* 2013;108(4):359.

Harrison DG, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.

Hill MF, Singal PK. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. *American journal of Pathology* 1996;148(1):291–300.

Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological genomics* 2006;26(3):180–91.

Huang BS, Ahmad M, Tan J, Leenen FH. Chronic central versus systemic blockade of AT(1) receptors and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:968–975.

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen W, Shou Z, Liu P. Tissue Expression and Immunolocalization of Tumor Necrosis Factor- in Postinfarction Dysfunctional Myocardium. *Circulation* 1999;99(11):1492–1498.

Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IMC.. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 1997;35(2):223–32.

Júnior JS. Morfologia dos cardiomiócitos e quantificação do colágeno no miocárdio de ratas tratadas com isoflavonas ou estrogênios. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012; 34(10):447-52

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *The Journal of clinical investigation* 1995;96(2):1042–52.

Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes J, komedal T, Wisloff U, Ellingsen O. Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovascular Research* 2005;67:161–172.

Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(10):6760–7.

Kober L, Torp-Pedersen C, Jorgensen S, Eliassen P, Camm AJ. “Changes in absolute and relative importance in the prognostic value of left ventricular systolic function. *American Journal of Cardiology* 1998;81:1292–1297.

Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of Cell Death in Heart Disease. *Arterioscler thromb vasc biol* 2012;32:201332(7).

Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundamental & clinical pharmacology* 2010;24(6):687–98.

Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U, Ljubkovic M. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. *Cardiovascular research* 2013;99(1):55–64.

Lal A, Veinot JP, Ganten D, Leenen FHH. Prevention of cardiac remodeling after myocardial infarction in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005;39:521–529.

Lassègue B, Martín AS, Griendling KK. Oxidases in the Cardiovascular System. *Circ Res* 2012;110(10): 1364–1390.

Liehn E, Postea O, Curaj A, Marx N. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;58(23):2357–62.

Litwin SE, Raya TE, Anderson PG, Litwin CM, Bressler R, Goldman S. Induction of myocardial hypertrophy after coronary ligation in rats decreases ventricular dilatation and improves systolic function. *Circulation* 1991;84(4):1819–1827.

Liu JL, Irvine S, Reid IA, Patel KP, Zucker IH. Chronic Exercise Reduces Sympathetic Nerve Activity in Rabbits With Pacing-Induced Heart Failure : A Role for Angiotensin II. *Circulation* 2000;102(15):1854–1862.

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2002;106(24):3068–3072.

Lomonosova E, Chinnadurai G. *BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview.* *Oncogene* 2008;27:S2–19.

Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, Marber M, Monaghan MJ, Shah AM. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2008;51(2):319–25.

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

Marcolino M. Implantação da Linha de Cuidado do Infarto Agudo do Miocárdio no Município de Belo Horizonte. *Arq Bras Cardiol* 2013;100(C).

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. *Circulation Research* 1993;72(6):1149–1162.

Mehta P, Griendling K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292: C82–C97.

Mendis S, Puska P, Norrving B. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.* World Health Organization, Geneva 2011. 2

Miyachi M, Yazawa H, Furukawa M, Tsuboi K, Ohtake M, Nishizawa T, Hashimoto K, Yokoi T, Kojima T, Murate T, Yokota M, Murohara T, Koike Y, Nagata K. Exercise training alters left ventricular geometry and attenuates heart failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 2009;53(4):701–7.

Mulrow PJ. Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regulatory peptides* 1999;80(1-2):27–32.

Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med* 2003;195–200.

Negra CE, Middlekauff HR. Exercise training in heart failure : reduction in angiotensin II , sympathetic nerve activity , and baroreflex control. *J Appl Physiol* 2008;104:577–578.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research* 2004;94(12):1543–53.

Nickenig G, Bäumer AT, Grohè C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JFM, Daemen MJAP, Vetter H, Böhm M. Estrogen Modulates AT1 Receptor Gene Expression In Vitro and In Vivo. *Circulation* 1998;97(22):2197–2201.

Schneider CD, Oliveira AR. Oxygen free radicals and exercise : mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte* 2004;10(c):314–318.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Reed J C, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *The New England journal of medicine* 1997;336(16):1131–41.

Patten RD, Aronovitz M, Einstein M, Lambert M, Pandian NG, Mendelsohn ME, Konstam MA. Effects of angiotensin II receptor blockade versus angiotensin-converting-enzyme inhibition on ventricular remodelling following myocardial infarction in the mouse. *Clinical Science* 2003;104:109–118.

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

Pedram A, Razandi M, O’Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Molecular endocrinology* 2010;24(11):2152–65.

Pendergast DR, Lundgren CEG. The underwater environment: cardiopulmonary, thermal, and energetic demands. *Journal of applied physiology* 2009;106(1):276–83.

Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O’Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TMA, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in a Rat Model of Progressive Heart Failure. *Circulation* 2001;103(18):2303–2309.

Pinho C, Tromm CB, Tavares AMV, Silva LA, Silveira PCL, Souza CT, Benetti M, Pinho RA. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life sciences* 2012;90(13-14):553–9.

Piro M, Bona RD, Abbate A, Biasucci LM, Crea F. Sex-related differences in myocardial remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;55(11):1057–65.

Portes LA, Saraiva RM, Santos AA, Tucci PJF. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009;36:394–399.

Ricardo M, Leães PE. Remodelamento Ventricular : dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 2004;1–7.

Robert V, Heymes C, Silvestre J, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 Receptor Subtype as a Cardiac Target of Aldosterone : Role in Aldosterone-Salt Induced Fibrosis. *Hypertension* 1999;33(4):981–986.

Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Early Left Ventricular Enlargement After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 1999;99(23):3063–3070.

Schillaci G, Verdecchia P, Borgioni C, Ciucci A, Porcellati C. Early Cardiac Changes After Menopause. *Hypertension* 1998;32(4):764–769.

Sénéchal M, Arguin H, Bouchard DR, Carpentier AC, Ardilouze JL, Dionne IJ, Brochu M. Weight gain since menopause and its associations with weight loss maintenance in obese postmenopausal women. *Clinical interventions in aging* 2011;6:221–5.

Shlipak MG, Angeja BG, Go AS, Frederick PD, Canto JG, Grady D. Hormone Therapy and In-Hospital Survival After Myocardial Infarction in Postmenopausal Women. *Circulation* 2001;104(19):2300–2304.

Siwik D, Chang DLF, Colucci WS. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. *Circulation Research* 2000;86(12):1259–1265.

Smith PJW, Ornatsky O, Stewart DJ, Picard P, Dawood F, Wen W, Liu PP, Webb DJ, Monge JC. Effects of Estrogen Replacement on Infarct Size, Cardiac Remodeling, and the Endothelin System After Myocardial Infarction in Ovariectomized Rats. *Circulation* 2000;102(24):2983–2989.

Sohn HJ, Yoo KH, Jang GY, Lee JH, Choi BM, Lee JH, Bae IS, Yim HE, Son CS, Lee JW. Aldosterone modulates cell proliferation and apoptosis in the neonatal rat heart. *Journal of Korean medical science* 2010;25(9):1296–304.

Spinale FG. Matrix Metalloproteinases: Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. *Circulation Research* 2002;90(5):520–530.

Spinale FG. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases : Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol Rev* 2007;87:1285–1342.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation research* 2003;93(2):170–7.

Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular research* 2009;81(3):482–90.

Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *The American journal of the medical sciences* 2007;334(3):197–205.

Sun Y, Zhang J, Zhang J, Weber KT. Renin expression at sites of repair in the infarcted rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2001;33(5):995–1003.

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000;101(25):2981–2988.

Timerman A, Mansur AP. Epidemiologia das doenças cardiovasculares. *Revista da Sociedade de Cardiologia Socesp do Estado de São Paulo* 2006;1:16.

Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacology & therapeutics* 2004;104(1):1–16.

Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998;281(5381):1312–1316.

Tombe PPD, Mateja RD, Tachampaa K, Mou YA, Farmanb GP, Irving TC. Muofilament length Dependent Activation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(5):851–858.

Touyz Rm. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004;37(8):1263–73.

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to cells* 1998;3(11):697–707.

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

Virdis A, Duranti E, Tadde, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension : Role of Angiotensin II. *International Journal of Hypertension* 2011;7.

Wan W, Powers AS, Li J, Ji L, Erikson JM, Zhang JQ. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *The American journal of the medical sciences* 2007;334(4):265–73.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner R. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 1991;84(5):2123–2134.

Wilson P, Morgan J, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Mediators of mineralocorticoid receptor-induced profibrotic inflammatory responses in the heart. *Clinical science* 2009;116(9):731–9.

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility , Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002;54:162–174.

Yamagishi H, Kim S, NishiKimi T, takeuchi K, Takeda T. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats 1993;25:1369-1380.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PloS one* 2011;6(3):17437.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Review Article Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction : Concepts and Clinical Implications. *Arq Bras Cardiol* 2009;92(2):150-156.

Zoth N, Weigt C, Laudenschlag U, Diel P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2010;122:100–105.