

**REGIANE MARIA SOARES RAMOS**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO DE BAIXA INTENSIDADE  
INICIADO 24 HORAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO SOBRE A  
ESTRUTURA E FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Educação  
Física, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

Viçosa – MG

2013

**REGIANE MARIA SOARES RAMOS**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO DE BAIXA INTENSIDADE  
INICIADO 24 HORAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO SOBRE A  
ESTRUTURA E FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Educação  
Física, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

---

José Geraldo Mill

---

Daise Nunes Queiroz da Cunha  
(Co-orientadora)

---

Thales Nicolau Prímola Gomes  
(Co-orientador)

---

Antônio José Natali  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por constantemente renovar a minha fé, força e esperança principalmente neste momento.

Aos meus queridos pais Domingos e Cida pelo amor, incentivo e por sacrificarem seus sonhos e vontades e prole dos meus.

Aos meus queridos irmãos Rachel e Raphael, pela cumplicidade, amor e amizade sempre. Nossa união sempre foi muito importante na minha vida.

Ao meu amor Evandro, pelo carinho e companheirismo a mim dedicados em todos os momentos. Sua confiança, paciência e constante incentivo foram fundamentais na construção deste trabalho.

Às famílias Soares e Ramos, que mesmo sem entender nada do que eu faço, vibram a cada conquista. Obrigada pelo carinho e apoio sempre.

Às minhas grandes amigas Aline, Mayra, Márcia e Thaynara, pela amizade desde o início da vida acadêmica. Ótimas companhias que pretendo cultivar por toda vida.

Às queridas amigas Juliana, Bárbara e Marcinha, ótimas companhias e exemplos acadêmicos a seguir. Obrigada pelos conselhos e constante incentivo.

Ao amigo Luiz Bozi, que mais uma vez esteve disponível para tirar as minhas dúvidas, pela hospitalidade e ensinamentos durante a jornada com os experimentos em São Paulo. Exemplo acadêmico a seguir.

Ao professor e orientador Antônio José Natali, pela oportunidade, orientação e pelos ensinamentos.

Ao professor e Co-orientador Thales Nicolau Prímola Gomes, pela oportunidade e sugestões para a composição deste trabalho.

A Co-orientadora Daise Nunes Queiroz da Cunha, pela paciência, orientação e ensinamentos durante a jornada com os experimentos, e na composição deste trabalho.

Ao professor Leonardo Bonato Felix, pela constante ajuda na composição deste trabalho.

Ao professor José Geraldo Mill pela honrosa participação em meu seminário de defesa de dissertação.

Aos amigos do BIOEX: Felipe, Mateus, Filipinho, Lucas, Victor, Anselmo, Judson, Aurora, Miguel, Gilton, Edson e Helton, pelos ótimos momentos de convivência, e que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Educação Física: Miltinho, Maísa, Luís e Jackson, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela convivência.

À CAPES, pelo fundamental auxílio financeiro.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Objetivo geral.....	7
2.1. Objetivos específicos.....	7
3. Revisão de literatura.....	8
3.1. O modelo de infarto experimental induzido por oclusão coronariana.....	8
3.2. A remodelação cardíaca após o infarto.....	10
3.3. Efeitos do IM sobre a contratilidade do miocárdio e cardiomiócitos .....	13
3.4. Benefícios do exercício físico regular realizado após o IM ao miocárdio e aos cardiomiócitos.....	16
4. Material e Métodos.....	23
4.1. Animais e desenho experimental.....	23
4.2. Indução do Infarto do Miocárdio.....	24
4.2.1. Anestesia.....	24
4.2.2. Toracotomia e infarto do miocárdio.....	25
4.2.3. Cuidados pós-operatórios.....	26
4.3. Adaptação à esteira.....	27
4.4. Exercício físico após o IM.....	27
4.5. Avaliação da capacidade ao esforço físico.....	27
4.6. Programa de treinamento.....	28
4.7. Avaliação eletrocardiográfica (ECG).....	28

<b>4.8. Avaliação da função cardíaca.....</b>	<b>29</b>
<b>4.9. Avaliação da hipertrofia e da insuficiência cardíaca congestiva.....</b>	<b>30</b>
<b>4.10. Avaliação histológica.....</b>	<b>31</b>
<b>4.11. Avaliação da função contrátil dos cardiomiócitos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.11.1. Isolamento dos cardiomiócitos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.11.2. Soluções de isolamento.....</b>	<b>34</b>
<b>4.11.3. Solução tampão HEPES.....</b>	<b>35</b>
<b>4.11.4. Mensuração da contração celular.....</b>	<b>35</b>
<b>4.12. Análise estatística.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Mortalidade/Sobrevivência.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. Indicadores de Insuficiência Cardíaca.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.1. Avaliação da tolerância ao esforço físico.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.2. Avaliação da Congestão pulmonar.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3. Indicadores de Remodelamento Cardíaco.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1. Peso corporal, do coração e dos ventrículos e características morfológicas do miocárdio.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3.2. Área do cardiomiócito.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3.3. Tamanho do infarto (%).....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.4. Conteúdo de Colágeno.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4. Eletrocardiograma.....</b>	<b>44</b>
<b>5.5. Função cardíaca.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6. Avaliação das propriedades mecânicas.....</b>	<b>48</b>
<b>5.6.1. Amplitude de contração celular, tempo de contração e relaxamento celular.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1. Mortalidade/sobrevivência.....</b>	<b>51</b>
<b>6.2. Tolerância ao esforço físico e insuficiência cardíaca.....</b>	<b>53</b>

<b>6.3. Remodelamento cardíaco.....</b>	<b>56</b>
<b>6.4. Função cardíaca.....</b>	<b>62</b>
<b>6.5. Função contrátil dos cardiomiócitos.....</b>	<b>63</b>
<b>6.6. Considerações e limitações do estudo.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AEC – acoplamento excitação contração.
- ACADE – artéria coronária descendente anterior esquerda.
- AC – área celular.
- ad libitum* – do latim “à vontade”.
- ANOVA – análise de variância.
- Ang II – angiotensina II.
- AT1 – receptor de Angiotensina II do tipo 1.
- ATPase – adenosina trifosfatase.
- BIOEX – Laboratório de Biologia do Exercício.
- °C – temperatura (graus Celsius).
- Ca<sup>+2</sup> – cálcio.
- CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio.
- CEUA – Comissão de Ética para Uso de Animais.
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono.
- [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> – concentração intracelular de Cálcio.
- DATASUS – Banco de dados do Sistema Único de Saúde.
- DC – débito cardíaco.
- dP/dt<sub>máx</sub> – taxa máxima de elevação de pressão.
- dP/dt<sub>min</sub> – taxa mínima de declínio de pressão.
- ECG – eletrocardiograma.
- ECA – enzima conversora de angiotensina.
- EGTA – *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*.
- FC – frequência cardíaca.
- DP – desvio padrão.
- FE - fração de ejeção.
- HEPES – *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid*.
- %H<sub>2</sub>O – teor de água.

IC – insuficiência cardíaca.

ICC – insuficiência cardíaca congestiva.

IM – infarto agudo do miocárdio.

IMSD – grupo infarto sedentário.

IMEX – grupo infarto exercitado.

*in vitro* – do latim “dentro do vidro”.

*in vivo* – do latim “dentro do vivo”.

KCl – cloreto de potássio.

mmHg – milímetro de mercúrio.

m/min – metros por minuto.

MMP – metaloproteinases da matriz extracelular.

MEC – matriz extracelular.

mRNA – RNA mensageiro.

NCX – trocador sódio cálcio.

NaCl – cloreto de sódio.

Na<sup>+</sup> – íon sódio.

O<sub>2</sub> – oxigênio.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

PCI – peso corporal.

PC – peso do coração.

PSVE – pressão sistólica do ventrículo esquerdo.

PDFVE – pressão diastólica final do ventrículo esquerdo.

RS – retículo sarcoplasmático.

RyR<sub>2</sub> – canais receptores de rianodina do tipo 2.

SERCA2 – cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático.

SI – septo interventricular.

SNS – sistema nervoso simpático.

SHAM – cirurgia simulada.

SHSD – grupo controle sedentário.

SHEX – grupo controle exercitado.

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

TGF- $\beta$ 1 – fator transformador de crescimento beta 1.

T<sub>pico</sub> – tempo para o pico de contração celular.

T<sub>50%</sub> – tempo para 50% de relaxamento celular.

TL – tamanho do coração no eixo longitudinal.

TT – tamanho do coração no eixo transversal.

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz.

TTF – tempo total do teste até a fadiga.

VD – ventrículo direito.

VE – ventrículo esquerdo.

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular.

VMC – velocidade máxima de corrida.

VC – volume cardíaco.

VO<sub>2max</sub> – consumo máximo de oxigênio.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático experimental.....	24
Figura 2. Registro típico de uma curva de pressão do ventrículo esquerdo (VE), mostrando os pontos de análise.....	30
Figura 3. Esquema ilustrativo das propriedades mecânicas analisadas.....	36
Figura 4. Tempo total de exercício até a fadiga (TTF, min) obtido no teste de esforço físico.....	38
Figura 5. Fotomicrografia representativa do corte transversal do VE, corados com hematoxilina – eosina (HE).....	42
Figura 6. Fotomicrografias representativas da região medial dos corações em corte transversal corados com <i>picrossírius red</i> .....	43
Figura 7. Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo corados com <i>picrossírius red</i> .....	44
Figura 8. Traçados ilustrativos do eletrocardiograma.....	45
Figura 9. Traçados representativos da contratilidade celular.....	48
Figura 10. Propriedades mecânicas dos cardiomiócitos.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de treinamento em esteira rolante.....	28
Tabela 2. Peso corporal, do coração e dos ventrículos, características morfológicas do miocárdio e teor de água nos pulmões.....	39
Tabela 3. Quantidade de colágeno tipo I no miocárdio.....	44
Tabela 4. Parâmetros eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia de indução do IM.....	45
Tabela 5. Parâmetros eletrocardiográficos dos animais com IM antes e após o programa de corrida. ....	46
Tabela 6. Parâmetros hemodinâmicos dos animais.....	47

## RESUMO

RAMOS, Regiane Maria Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2013. **Efeitos do treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após a cirurgia isquêmica sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos submetidos ao infarto do miocárdio experimental.** Orientador: Antônio José Natali. Co-orientadores: Daise Nunes Queiroz da Cunha e Thales Nicolau Prímola Gomes.

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após a cirurgia isquêmica sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos submetidos ao infarto do miocárdio (IM) experimental. Ratos Wistar com 30 dias de idade foram divididos em 4 grupos: Sham Sedentário (SHSD, n=15), Sham Exercitado (SHEX, n=15), Infartado Sedentário (IMSD, n=15) e Infartado Exercitado (IMSD, n=15). Vinte e quatro horas após indução do IM e da cirurgia simulada (Sham), os animais dos grupos IMEX e SHEX foram colocados na esteira rolante com 5° de inclinação, por um período de 20 minutos por dia, onde correram à velocidade de 12m/min durante 5 dias consecutivos. No 6° e no 35° dias, estes animais foram submetidos à avaliação da tolerância ao esforço físico. A tolerância ao esforço físico foi estimada pela capacidade máxima de esforço físico em teste progressivo de corrida em esteira e quantificada pelo tempo total até a fadiga (TTF, min) neste teste. A velocidade máxima de corrida (VMC) obtida no teste do 6° dia foi utilizada para calcular a intensidade de corrida adotada no programa de treinamento (%VMC, m/min). Este programa consistiu de corrida em esteira (5 dias/semana, 60min/dia, inclinação de 5°) a 65-75% da VMC. Trinta e cinco dias após a indução do IM, os cardiomiócitos da região remanescente ao IM do ventrículo esquerdo (VE) de metade dos animais de cada grupo foram isolados por dispersão enzimática, após eutanásia. Os cardiomiócitos foram estimulados a 1Hz, em temperatura controlada (~37°C), para mensuração da função contrátil. O restante dos animais foi usado para obtenção dos registros hemodinâmicos. Após este procedimento, estes animais sofreram eutanásia e os corações foram removidos, fixados e corados com Hematoxilina-eosina e *Picrosirius red* para análise histológica. Os resultados mostraram que o programa de exercício

físico aplicado não comprometeu a sobrevivência dos animais infartados. Os animais exercitados apresentaram maior capacidade de corrida em relação aos sedentários ( $p < 0,05$ ). O peso do coração, peso relativo do coração, peso relativo do VE, volume cardíaco, área celular do cardiomiócito e o teor de água no pulmão foram maiores nos animais infartos em comparação com o Sham ( $P < 0,05$ ), mas sem diferença entre os grupos IMSD e IMEX. Além disso, o programa de corrida não atenuou o tamanho do infarto e a deposição de colágeno no miocárdio remanescente ao IM. O eletrocardiograma (ECG) demonstrou que os animais IM apresentaram elevação dos segmentos ST, prolongamento dos intervalos QT, QTc e da onda T, aumento na amplitude das ondas Q e T, e redução da amplitude da onda S, em relação aos animais Sham ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao final do programa de corrida, não foram encontradas diferenças nestes parâmetros avaliados. Os ratos IM apresentaram aumento na frequência cardíaca (FC) de repouso, reduções na pressão sistólica do VE (PSVE) e da taxa máxima de elevação de pressão ( $dP/dt_{m\acute{a}x}$ ), além de elevação da pressão diastólica final do VE (PDFVE) e da taxa máxima de queda de pressão ( $dP/dt_{m\grave{i}n}$ ) ( $p < 0,05$ ). Contudo, o programa de treinamento físico aplicado reduziu a  $dP/dt_{m\grave{i}n}$  e a FC de repouso além de aumentar a PSVE dos animais IM ( $p < 0,05$ ). A amplitude de contração e o tempo de relaxamento não foram alterados pelo IM. No entanto, os animais IM apresentaram aumento no tempo para o pico de contração celular, em comparação aos animais Sham ( $p < 0,05$ ), mas sem diferença entre os grupos IMSD e IMEX. Concluiu-se que o treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após o IM experimental e realizado durante 5 semanas não agravou o remodelamento cardíaco e atenuou os efeitos deletérios do IM sobre os parâmetros hemodinâmicos.

## ABSTRACT

RAMOS, Regiane Maria Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2013. **Effects of low-intensity aerobic exercise training initiated 24 hours after myocardial infarction on the structure and function of the myocardium and cardiomyocytes of rats.** Advisor: José Antonio Natali. Co-advisors: Daise Nunes Queiroz da Cunha and Thales Nicolau Prímola Gomes.

This study aimed at investigating the effects of low-intensity aerobic training initiated 24 hours after myocardial infarction (MI) on the structure and function of the myocardium and cardiomyocytes. Four-weeks old Wistar rats were divided into 4 groups: Sham Sedentary (SHSD, n=15), Sham exercised (SHEX, n=15), infarcted Sedentary (IMSD, n=15) and infarcted exercised (IMSD, n=15). Twenty-four hours after MI and sham operation animals from the training groups were placed on a treadmill with a 5° angle of inclination, during 20 minutes per day, at a speed of 12m/min for 5 consecutive days. On the 6th and 35th days animals were evaluated for tolerance to physical exertion. Exercise tolerance was estimated by the maximum physical exertion in a progressive treadmill running test and quantified by the total time until fatigue (TTF, min) achieved in the mentioned test. The maximum running speed (MRS) achieved in the 6<sup>th</sup> day test was used to calculate the intensity adopted in the training program (VMC%, m/min). This program consisted of treadmill running (5 days/week, 60min/day, and inclination of 5°) at a speed of 65-75% of MRS. Thirty-five days after the induction of MI, half of animals of each group were used for cardiomyocytes isolation. After euthanasia, cardiomyocytes were isolated from the non-infarcted area of the left ventricle (LV) by enzymatic dispersion. The cardiomyocytes were stimulated at 1Hz, under controlled temperature (~37°C) for measurements of contractile function. The remaining animals in each group were used to obtain in the hemodynamic recordings. After that, these animals were euthanized and the hearts were removed, fixed and stained with hematoxylin-eosin and picrosirius red for histological analysis. The exercise program did not affect the survival of infarcted animals. Animals in the training program had greater running capacity compared to sedentary ( $p < 0.05$ ). Heart weight, indexed heart weight, LV indexed weight, heart volume, cardiomyocyte area and water content in the lungs were greater in the MI groups ( $P < 0.05$ ) than in Sham groups. In addition, the running program did not attenuate the

infarct size and collagen deposition in the remaining myocardium. Animals with MI had ST segment elevation, QT prolongation, increase of QTc and T wave amplitude, and reduced Q, S and T waves amplitude compared to Sham ( $p < 0.05$ ). However, at 35 days later no differences in these ECG parameters were observed. MI rats showed an increase in heart rate (HR) at rest, decreased LV systolic pressure (LVSP) and the maximum rate of pressure rise ( $dP/dt_{max}$ ) and increased LV end-diastolic pressure (PDFLV) and minimum rate of pressure rise ( $dP/dt_{min}$ ) ( $p < 0.05$ ). However, the training program was able to decrease resting HR, increase LVSP and decrease  $dP/dt_{min}$  in the MI group ( $p < 0.05$ ). The amplitude of contraction and relaxation time were not affected by MI. However, MI animals showed increased time to peak of cell contraction compared to sham animals ( $p < 0.05$ ), but no difference between groups IMSD and IMEX was observed. It is concluded that low-intensity aerobic training initiated 24 hours after MI for a period of 5 weeks did not worsen cardiac remodeling and attenuated the deleterious effects of MI on hemodynamic parameters.

## 1. Introdução

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Em 2008, estimou-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardíacas, representando 30% de todas as mortes globais. Mais de 80% das mortes cardiovasculares ocorrem em países de baixa e média renda e quase igualmente em homens e mulheres. Em 2030, estima-se que 25 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares, principalmente de doenças isquêmicas e cerebrovasculares (OMS, 2011).

Em 2010, as doenças isquêmicas do coração foram responsáveis por mais de 99 mil óbitos no Brasil (DATASUS, 2011). Entre as doenças isquêmicas do coração, destaca-se o infarto agudo do miocárdio (IM).

Apesar dos inúmeros avanços terapêuticos, o IM é responsável por aproximadamente 60 mil óbitos por ano no Brasil, sendo considerada a principal causa de morte no país (Piegas et al., 2009). De acordo com a IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do IM (2009), comorbidades como fumo, obesidade, *diabetes mellitus*, hipertensão, níveis elevados de colesterol, história familiar de doenças cardiovasculares e sedentarismo aumentam o risco de ocorrência desta patologia.

O IM é definido basicamente como morte de cardiomiócitos causada por isquemia prolongada (Davies, 2000). De forma geral, a isquemia pode surgir a partir de uma interrupção no fluxo sanguíneo coronariano e frequentemente ocorre em indivíduos que já possuem doença cardíaca coronária aterosclerótica subjacente. A placa aterosclerótica pode causar coágulo sanguíneo local (trombo) e ocluir a artéria. A presença da aterosclerose e o processo trombótico subsequente são os determinantes mais comuns do IM (Factor e Kirk, 1990; Thygesen et al., 2012).

O modelo do infarto do miocárdio no rato é uma das estratégias mais utilizadas para o melhor entendimento da complexidade de alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana. Entre outros fatores, esse modelo é usado em decorrência da similaridade com as alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto em humanos (Fishbein et al., 1978b; Klocke et al., 2007; Zornoff et al., 2009).

O remodelamento cardíaco inicia-se logo após a oclusão da artéria coronária. A isquemia resulta em perda de cardiomiócitos por apoptose e necrose e desencadeia rapidamente um processo reparativo. Em 24 horas, a necrose muscular torna-se evidente, acompanhada inicialmente por infiltração de neutrófilos e, posteriormente, por linfócitos e monócitos. A partir deste período, o processo de necrose predomina e se estende até aproximadamente 7 dias. O final do período inflamatório se caracteriza pela rápida elevação do número de fibroblastos no tecido, bem como por um aumento acentuado na produção de fibras colágenas (Fishbein et al., 1978b).

A fibrose caracteriza o início do processo de cicatrização e estabilização do infarto. Após 3 a 4 dias da oclusão coronariana, inicia-se o acúmulo de células semelhantes aos fibroblastos, mas com actina em sua composição, os miofibroblastos. Os miofibroblastos são fibroblastos modificados pelo fator beta de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) secretado pelos monócitos e responsáveis pela síntese de colágeno I e III na região infartada o que aumenta progressivamente a rigidez da parede. (Fishbein et al., 1978; Whittaker et al., 1991; Jugdutt et al., 2003). No rato, o processo de cicatrização se completa 3 a 4 semanas após a oclusão coronariana (Fishbein et al., 1978b; Whittaker et al., 1991; Jugdutt et al., 2003; Holmes et al., 2005).

Na fase aguda do IM, o colágeno intersticial é intensamente degradado, o que contribui para o deslizamento dos miócitos, afinamento da parede atingida e dilatação da cavidade. Devido à expansão do IM, o ventrículo assume configuração esférica. Na fase tardia, a dilatação cavitária é consequência do processo de hipertrofia excêntrica que envolve ambos os ventrículos e parece se manifestar como adaptação às novas situações de carga (Sutton et al., 2000; Zornoff et al., 1997; Zornoff et al., 2009).

Na medida em que o IM progride, o processo de remodelação cardíaca conduz a importantes alterações como, perda de tecido contrátil, expansão do infarto, maior deposição de colágeno, aumento da massa cardíaca, hipertrofia e dilatação ventricular, que contribuem para uma menor força de contração e distúrbios hemodinâmicos (Pfeffer et al., 1985, Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000; Zornoff et al., 1997; Xu et al., 2008).

*In vivo*, foi reportado que o IM experimental em modelo animal ocasiona redução em diversas variáveis funcionais como: débito cardíaco (DC), fração

de ejeção (FE), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), taxa máxima de elevação de pressão ( $dP/dt_{máx}$ ) e taxa máxima de queda de pressão ( $dP/dt_{min}$ ). Paralelamente ocorre elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) (Pfeffer et al., 1991; Fletcher et al., 1981; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008). É importante ressaltar que o processo de remodelação é extremamente complexo, implicando em alterações genéticas, celulares e moleculares (Pfeffer et al., 1985; Pfeffer et al., 1990; Zornoff et al., 1997; Cohn et al., 2000).

Em nível celular, a perda da função cardíaca após o IM pode estar associada com o comprometimento da capacidade contrátil intrínseca do miocárdio (Holt et al., 1998; Zhang et al., 1999; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010).

Estudos com cardiomiócitos isolados de animais com IM demonstraram que a amplitude de contração pode estar reduzida (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). Essas alterações podem ocorrer em resposta a modificações no transiente intracelular global de cálcio (transiente de  $[Ca^{+2}]_i$ ) e na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Holt et al., 1998; Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007; Ait Mou et al., 2008; Bito et al., 2010).

Além disso, o tempo de contração celular pode apresentar-se aumentado (Wisloff et al., 2002; Bito et al., 2010). Essa alteração pode estar relacionada com a redução na expressão de proteínas regulatórias do influxo de  $Ca^{+2}$  para o citosol, tais como os receptores de rianodina tipo 2 ( $RyR_2$ ) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) (Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007) e o trocador de sódio/cálcio (NCX) do sarcolema (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007). Da mesma forma, o tempo de relaxamento celular pode estar aumentado após o IM (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002). Esse resultado pode estar relacionado com alterações na expressão de proteínas responsáveis pela remoção do  $Ca^{+2}$  do citosol, tais como redução na expressão da  $Ca^{+2}$  ATPase do RS (SERCA2) (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008) e do NCX (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007).

Contudo, estudos prévios demonstraram que há possibilidade de ocorrer comprometimento da função sistólica da câmara ventricular mesmo quando o estado inotrópico de fibras miocárdicas encontra-se normal (Stuveret et al., 1994; Chandrashekhar et al., 1999; Anand, 2002; Peron et al., 2006).

O exercício físico, por sua vez, têm se destacado como terapia não farmacológica para a prevenção de doença coronariana e para a reabilitação dos pacientes já acometidos. Na prática clínica, a reabilitação de pacientes na fase aguda do IM com exercícios regulares visa reduzir os efeitos prejudiciais do repouso prolongado e diminuir a permanência hospitalar (Piegas et al., 2009; Santos-Hiss et al., 2011). Em longo prazo, os benefícios incluem diminuição das re-internações, melhorias no desempenho cardíaco, tolerância aos esforços, na saúde e na qualidade de vida e reduz a morbidade e mortalidade dos pacientes em todas as fases da doença (Paffenbarger et al., 1993; Blair et al., 1995, Belardinelli et al., 1999, Jolliffe et al., 2001; Silva et al., 2002).

Assim como em humanos, os principais benefícios do exercício físico aeróbico regular após o IM (>4 semanas) em modelo experimental incluem: melhoria na função ventricular esquerda (Ait Mou et al., 2008), redução da congestão pulmonar (Portes e Tucci, 2006; Portes et al., 2009) e aumento na tolerância aos esforços físicos (Rondon et al., 2006; Zanchi et al., 2008). Além disso, o treinamento físico aeróbico após o IM (>4 semanas) promove diversas adaptações celulares e moleculares favoráveis no músculo cardíaco, tais como, melhoria na contratilidade dos cardiomiócitos (Zhang et al., 2000a; Wisloff et al., 2002; Song et al., 2004; Ait Mou et al., 2008) aumento na expressão da SERCA2 (Wisloff et al., 2002; Jorge et al., 2011) e do NCX (Zhang et al., 2000a; Wisloff et al., 2002; Song et al., 2004), normalização do transiente de  $Ca^{+2}$  (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 2000b; Ait Mou et al., 2008) e restauração da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Wisloff et al., 2002; Ait Mou et al., 2008).

Entretanto, os efeitos do treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade iniciado 24 horas após o IM sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos não são completamente conhecidos.

Estudos com modelo de IM experimental em ratos demonstraram que o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade iniciado nos primeiros estágios

da cicatrização pós IM (entre 24 horas e 7 dias após o IM) executado 60 min/dia por um período de 8 ou mais semanas é capaz de aumentar a capacidade aeróbica, reduzir a mortalidade (Jorge et al., 2011) e o tamanho do infarto (Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011), além de atenuar a deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente (Waard et al. 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011) e recuperar a função cardíaca, por meio do aumento da fração de ejeção (FE), porcentagem de encurtamento, PSVE e atenuação da PDFVE (Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011).

Embora a atenuação dos efeitos deletérios do processo de remodelamento em resposta ao exercício físico seja muito importante para a melhora da função contrátil, muitos autores sugerem que parte dessa melhora deve-se ao aumento da capacidade contrátil intrínseca dos cardiomiócitos (Ait Mou et al., 2008; Wisloff et al., 2002; Song et al., 2004; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). Há evidências de que o treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade em esteira rolante, realizado em ratos IM após o período de cicatrização (>4 semanas), é efetivo em corrigir alterações patológicas e induzir melhorias na função cardíaca e na contratilidade de cardiomiócitos (Leosco et al., 2008; Ait Mou et al., 2008).

Contudo, existem poucos estudos dedicados à análise dos efeitos do treinamento físico iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós IM sobre a capacidade contrátil intrínseca dos cardiomiócitos de animais infartados (de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). Recentemente, Bito et al. (2010) mostraram que camundongos submetidos a treinamento físico com corrida voluntária iniciado 24 horas após a indução do IM, por 8 semanas, não obtiveram alterações na amplitude de contração de cardiomiócitos e no tempo para o pico de contração e relaxamento celular. Todavia, os efeitos do treinamento físico aeróbico em esteira rolante iniciado 24 horas após IM sobre as propriedades mecânicas do cardiomiócitos de ratos não são conhecidos.

Considerando que o treinamento físico com exercício aeróbico de baixa intensidade promove melhorias na função cardíaca (Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011) e na contratilidade de cardiomiócitos em modelo experimental de IM em ratos (Leosco et al., 2008; Ait Mou et al., 2008), e que a cicatrização após o IM neste modelo experimental está completa em 4 semanas (Fishbein, 1978b; Whittaker et al., 1991; Jugdutt et al., 2003; Holmes

et al., 2005), hipotetiza-se que o exercício físico aeróbico de baixa intensidade em esteira rolante realizado durante o período de cicatrização após o IM, ou seja, iniciado nos primeiros estágios da remodelação pós IM (24 horas após IM) e até que a cicatrização esteja completa (5 semanas), possa atenuar as possíveis alterações na estrutura e função do miocárdio e dos cardiomiócitos de ratos com IM.

Desse modo, o presente estudo foi desenvolvido para verificar os efeitos do treinamento com exercício aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após a cirurgia isquêmica sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos submetidos ao IM experimental.

## **2. Objetivo Geral**

Investigar os efeitos do treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após a cirurgia isquêmica sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos submetidos ao IM experimental.

### **2.1. Objetivos específicos**

Verificar se treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após o IM experimental especificamente:

- a) Compromete a sobrevivência;
- b) Atenua a intolerância ao exercício;
- c) Atenua a congestão pulmonar;
- d) Atenua o tamanho do infarto;
- e) Reduz a deposição de colágeno no miocárdio remanescente;
- f) Atenua a hipertrofia cardíaca;
- g) Atenua alterações hemodinâmicas provocadas pelo IM;
- h) Previne possíveis alterações nas propriedades mecânicas dos cardiomiócitos isolados;

### **3. Revisão de Literatura**

O IM ocorre quando uma artéria coronária é obstruída, causando a morte das células isquêmicas e a perda da função contrátil. Este evento conduz a um processo adaptativo de remodelação cardíaca que resulta em declínio da capacidade funcional do coração e conseqüente aparecimento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e/ou morte súbita (Pfeffer et al., 1990; Cohn 2000; Zornoff et al., 2009).

Nesta revisão serão abordados os seguintes temas:

- O modelo de infarto experimental induzido por oclusão coronariana;
- A remodelação cardíaca após o infarto;
- Efeitos do IM sobre a contratilidade do miocárdio e cardiomiócitos; e
- Benefícios do exercício físico regular realizado após o IM ao miocárdio e cardiomiócitos.

#### **3.1. O modelo de infarto experimental induzido por oclusão coronariana**

O modelo do infarto do miocárdio no rato é uma das estratégias mais utilizadas para o melhor entendimento da complexidade de alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana. Entre outros fatores, esse modelo é usado em decorrência da similaridade com as alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto em humanos (Fishbein et al., 1978b; Klocke et al., 2007).

O modelo de infarto agudo do miocárdio experimental pela oclusão da coronária esquerda no rato foi descrito inicialmente por Heimbürger, em 1946 (Heimbürger, 1946). Com o passar dos anos, a técnica foi modificada progressivamente por Johns e Olson (1954). Na década de 60, Selye et al. (1960), propuseram uma técnica de oclusão coronariana em ratos, confiável e rápida e relataram os primeiros achados decorrentes do IM.

A ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda tem sido o método mais utilizado na indução do IM (Selye et al., 1960). Esse procedimento induz uma região cicatricial bem determinada histologicamente, o que torna possível sua quantificação e comparação com o desempenho ventricular (área cicatricial/área do VE). Além disso, os valores referentes ao tamanho do infarto através do método ecocardiográfico são similares aos histológicos (Nozawa et

al., 2006). As linhagens mais frequentemente utilizadas são Sprague-Dawley e Wistar (Litwin, 1995; Klocke et al., 2007).

Um dos aspectos mais relevantes desse modelo relaciona-se com o tamanho do infarto. A oclusão da artéria coronária no rato resulta em IM com tamanho (extensão da lesão em relação à área do ventrículo esquerdo) variado. Além de ser determinante para a grande variabilidade na mortalidade após a cirurgia, o tamanho do infarto é considerado determinante crítico da repercussão funcional no coração. Assim, o IM tem sido caracterizado de acordo com seu tamanho: pequenos (inferiores a 20% do VE), moderados (20-39%) e grandes (acima de 40%) (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991). Desse modo, propõe-se que ratos com infartos menores que 30% não implicam em anormalidades hemodinâmicas. Animais com infartos moderados podem apresentar valores hemodinâmicos basais normais, mas reduzida capacidade de gerar pressão. Por fim, ratos com infartos grandes apresentam insuficiência cardíaca (IC), com elevadas pressões de enchimento e redução do DC (Pfeffer et al., 1979). Portanto, esse modelo propicia o estudo de diferentes graus de disfunção ventricular.

Vale destacar, existem diversas variáveis clínicas não invasivas e anatomofisiológicas que podem ser utilizadas para o diagnóstico de IC nesse modelo, dentre as quais destacam-se: congestão pulmonar e hepática, presença de hipertrofia do ventrículo direito (Zornoff et al., 2009; Tucci et al., 2011), perda de peso corporal (Faria et al., 2011) e intolerância ao exercício (Bayat et al., 2002; Trueblood et al., 2005).

O modelo de IM experimental no rato é largamente utilizado principalmente por ser de baixo custo, proporcionar um número significativo de amostras e a cirurgia é extremamente rápida, com duração variando de 2 a 5 minutos. Outro aspecto é que devido às características do metabolismo, as etapas envolvidas na evolução do infarto como, por exemplo, necrose, cicatrização e alterações anatomofisiológicas ocorrem rapidamente, o que diminui o tempo de observação dos estudos (Fishbein et al., 1978; Klocke et al., 2007).

Por fim, as alterações fisiopatológicas decorrentes do IM são semelhantes às alterações que ocorrem nos humanos (Fishbein et al., 1978; Klocke et al., 2007). Por essa razão, o modelo experimental de IM tem sido

ferramenta essencial para compreender o processo fisiopatológico que se estabelece após oclusão coronariana e para analisar a remodelação que ocorre no músculo cardíaco.

### **3.2. A remodelação cardíaca após o infarto**

Os miócitos representam cerca de 30% do número total de células miocárdicas. Além do papel fundamental dos cardiomiócitos na geometria e função do coração, a matriz extracelular (MEC) representa a estrutura organizadora e de sustentação da estrutura miocárdica que controla a contração. Esta estrutura é formada por macromoléculas, em sua grande parte, os fibroblastos, as quais incluem proteínas fibrosas, de dois tipos funcionais, colágeno e elastina, e moléculas multiadesivas tais como proteoglicana e fibronectina (Cleutjens, 1995). Entre cardiomiócitos, nervos e vasos sanguíneos, o interstício que sustenta todas essas estruturas, é composto principalmente pelo tecido conectivo. Nesse tecido existe a predominância de colágeno e de fibronectina, além de laminina e elastina em pequenas proporções. As fibras de colágeno encontradas são predominantemente dos tipos I e III. Um apropriado balanço de síntese e degradação de colágeno é requerido para manutenção da estrutura do miocárdio (Weber et al., 1999). A síntese e a degradação de colágeno são reguladas por vários fatores, tais como, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMP) (Jugdutt, 2003; Holmes et al., 2005; Xu et al., 2008).

A remodelação pós-infarto é um fenômeno que se inicia logo após a oclusão coronariana e desencadeia rapidamente um processo reparativo. Miócitos cardíacos, fibroblastos e MEC desempenham papéis críticos durante o processo de remodelação. A sequência de eventos de reparo pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (Jugdutt et al., 2009). De uma forma geral, o processo cicatricial envolve uma complexa sequência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual e função cardíaca após o IM.

Após a oclusão de uma artéria coronária ou de um dos seus maiores ramos, o desbalanço entre a oferta e a demanda por oxigênio e nutrientes no miocárdio, bem como o acúmulo de metabólitos tóxicos, provoca a morte dos

cardiomiócitos. Em poucos minutos após a oclusão, inicia-se o processo de morte celular que aumenta progressivamente até 6 horas após o infarto (Holmes et al., 2005).

As MMPs são proteinases que atuam na degradação da MEC. Essas enzimas são reguladas pelas TIMPs, os quais inibem sua atividade, permitindo o acúmulo de colágeno no miocárdio. Estudos anteriores mostraram que a ativação da MMP pode ser identificada 1 hora após a oclusão coronariana e cerca de 50% do colágeno encontra-se degradado 3 horas após o IM (Holmes et al., 2005). Essa atividade proteolítica cessa uma semana após o infarto (Sun et al., 2002).

Simultaneamente à atividade proteolítica, outras alterações importantes são identificadas. Em 24 horas a necrose muscular torna-se evidente, acompanhada inicialmente por infiltração de células inflamatórias como neutrófilos e, posteriormente, por linfócitos e monócitos. O início dessa fase inflamatória é caracterizado pelo enrijecimento da região isquêmica, provocado pelo edema na parede do miocárdio, enquanto seu final se caracteriza pela rápida elevação do número de fibroblastos no tecido, bem como por um aumento acentuado na produção de fibras de colágeno (Fishbein et al., 1978b).

A fibrose caracteriza o início do processo de cicatrização e estabilização do infarto. Após 3 a 4 dias da oclusão coronariana, inicia-se o acúmulo de células semelhantes aos fibroblastos, mas com actina em sua composição, os miofibroblastos. Os miofibroblastos são fibroblastos modificados pelo TGF- $\beta$  secretado pelos monócitos, e são responsáveis pela síntese de colágeno I e III na região infartada o que aumenta progressivamente a rigidez da parede. Os colágenos I e III são os tipos predominantes, sendo que o colágeno III forma uma rede para a deposição subsequente das fibras longas e altamente organizadas de colágeno I (Fishbein et al., 1978; Whittaker et al., 1991; Jugdutt et al., 2003). O processo de cicatrização estaria completo 3 a 4 semanas após a oclusão coronariana (Fishbein et al., 1978b; Whittaker et al., 1991; Holmes et al., 2005; Zornoff et al., 2009).

Têm-se descrito dois mecanismos de aumento da síntese de colágeno, que correspondem à fibrose reparativa e a reativa. A reparativa seria o mecanismo clássico que se segue à necrose celular e à consequente reação inflamatória e a fibrose reativa ocorre nas áreas que não foram afetadas de

diretamente pela isquemia tecidual caracterizado pelo acúmulo de colágeno nessa região (Jugdutt et al., 2003). Existe ampla documentação de que, após o IM, deposição de colágeno (fibrose) pode ser observada em áreas não infartadas três dias após o IM. Nessa condição, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular (Weber et al., 1999; Xu et al., 2008; 2008a).

Na fase aguda do IM, o colágeno intersticial é intensamente degradado, o que contribui para o afinamento da área atingida e dilatação da cavidade. Essa dilatação ventricular aguda, caracterizada por afinamento e distensão da parede infartada, é denominada expansão do infarto (Hammerman et al., 1983; Whittaker et al., 1991). Após 72 horas após o evento agudo, a remodelação envolve o coração como um todo. A inflamação, reabsorção de tecido necrótico e formação da cicatriz seguem estimulando a expansão da zona infartada. Em seguida, ocorre hipertrofia dos cardiomiócitos por sobrecarga volumétrica da área não infartada perda de miócitos, fibrose reativa, com distorção da geometria ventricular (forma elíptica). Na fase tardia (após semanas ou meses), é evidente a hipertrofia da musculatura remanescente, dilatação ventricular e a modificação na geometria assumindo uma forma esférica (Sutton et al., 2000 Zornoff et al., 1997; 2009).

Inicialmente, a hipertrofia se desenvolve de forma a retornar o estresse parietal ao normal. Entretanto, a sobrecarga de volume crônica aumenta a tensão diastólica (pré – carga) e determina que sarcômeros adicionais sejam dispostos em série, levando a miócitos mais longos e à dilatação ventricular, caracterizando a hipertrofia do tipo excêntrica. A dilatação cardíaca ajuda a manter o volume ejetado (mecanismo de Frank-Starling), embora aumente a tensão sistólica (pós – carga) (Sutton et al., 2000; Zornoff et al., 1997; 2009).

O resultado final dessa sequência de eventos é uma degradação gradual do desempenho cardíaco influenciado pelo aumento progressivo da ativação neuro-humoral (Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000; Sutton et al., 2000; Zornoff et al., 1997; 2009).

A ativação neuro-humoral representa basicamente o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). De modo geral, no início da lesão miocárdica, a ativação aguda do sistema nervoso simpático ocorre como resposta adaptativa e tem como finalidade a restauração ou manutenção dos níveis pressóricos e do

débito cardíaco. Cronicamente, entretanto, a redução da função sistólica pode gerar aumento na atividade simpática (Middlekauff et al., 1998).

A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) aumenta em todas as regiões do coração infartado, particularmente no tecido da cicatricial, levando a concentrações locais elevadas de Angiotensina II (Ang II) (Busatto et al., 1997; de Resende et al., 2006). A Ang II, agindo através de receptores de Angiotensina II do tipo 1 (AT1), provoca a produção de aldosterona. A produção local de Ang II e a aldosterona são os principais mediadores de hipertrofia de miócitos e fibrose cardíaca. Estudos prévios mostraram que a inibição da ECA em ratos infartados reduz a mortalidade, atenua a fibrose reativa, a hipertrofia de miócitos e a progressão para a insuficiência cardíaca (Pfeffer et al., 1985; Busatto et al., 1997; de Resende et al., 2006; Mill et al., 1994).

Essas mudanças no tamanho, massa e geometria ventricular caracterizam, clinicamente, o processo de remodelação cardíaca após o infarto. É importante ressaltar que o processo de remodelação é extremamente complexo, implicando em alterações genéticas, celulares e moleculares (Pfeffer et al., 1985; 1990; Zornoff et al., 1997; Cohn et al., 2000).

Pelo exposto, a remodelação ventricular envolve uma série de alterações. Inicialmente, esse processo pode ser adaptativo, mas, em longo prazo, uma das consequências da remodelação é o aparecimento progressivo da disfunção ventricular. Como consequências hemodinâmicas decorrentes da remodelação cardíaca, ocorre redução em diversas variáveis funcionais como: FE, DC, PSVE,  $dP/dt_{máx}$  e  $dP/dt_{mín}$ . Paralelamente, ocorre aumento da PDFVE (Pfeffer et al., 1979; Litwin et al., 1994; Epifânio et al., 2005; Peron et al., 2006). Portanto, o IM causa disfunção tanto sistólica como diastólica.

### **3.3. Efeitos do IM sobre a contratilidade do miocárdio e cardiomiócitos**

A perda de tecido miocárdico após o IM causa uma sobrecarga intensa e conduz a um processo adaptativo de remodelação cardíaca colaborando para uma menor força de contração e distúrbios hemodinâmicos (Pfeffer et al., 1985, Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000; Zornoff et al., 1997; Xu et al., 2008).

Estudos *in vivo* em modelo animal demonstraram que após o IM é comum ocorrer redução da FE, no DC e na PSVE, além de aumento da PDFVE

(Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008).

Além disso, autores reportaram que o decréscimo no desempenho cardíaco após o IM pode estar relacionado a alterações na capacidade contrátil intrínseca do miocárdio (Holt et al., 1998; Zhang et al., 2000a; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). Estudos demonstraram que, quando presente, a perda da função contrátil dos miócitos cardíacos está relacionada a alterações em moléculas envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração (Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007).

O mecanismo pelo qual um estímulo externo (potencial de ação cardíaco) é convertido em ativação do aparato contrátil no interior da célula muscular cardíaca, com a consequente geração de força, é denominado processo de acoplamento excitação-contração (AEC). A contração cardíaca depende da elevação e diminuição cíclica da concentração citoplasmática do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . A cascata de eventos necessária para a elevação da concentração citoplasmática deste íon inicia-se com o potencial de ação. Este ativa a abertura de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) tipo L. A entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  nas células ativa os RyR2 presentes na membrana do RS, o que resulta em liberação do  $\text{Ca}^{+2}$  armazenado nesse compartimento celular. A combinação da entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  e a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo RS provocam o aumento da concentração intracelular de cálcio, permitindo a ligação do  $\text{Ca}^{+2}$  à troponina C, o que ativa o processo de contração celular. Desta forma, a contratilidade cardíaca depende das proteínas e canais envolvidos no processo de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$ . A modulação de suas funções altera o produto final, ou seja, a produção de força pelo cardiomiócito. Por outro lado, para que o relaxamento ocorra a  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  deve ser reduzida, o que provocará a dissociação do  $\text{Ca}^{+2}$  da troponina C. O relaxamento do músculo cardíaco depende de proteínas responsáveis pela diminuição da concentração citoplasmática deste íon. O transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  para fora do citosol, é realizado pela SERCA2, NCX,  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase presente no sarcolema e transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial (Bers, 2002).

Alguns estudos sugerem que a perda da função contrátil de corações infartados está relacionada com alterações na contratilidade dos cardiomiócitos (Holt et al. 1998; Zhang et al., 2000a; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al.,

2002; de Waard et al., 2007, Bito et al., 2010) mas ainda existem controvérsias (Stuveret et al., 1994; Chandrashekar et al., 1999; Anand, 2002; Peron et al., 2006). Por exemplo, os efeitos do IM sobre a amplitude de contração celular são contraditórios. Em alguns estudos, a amplitude de contração mostrou-se inalterada (Cheung et al., 1994; Anand et al., 1997) e em outros reduzida (Li et al., 1995; Holt et al., 1998; Bito et al., 2010).

Há sugestões também que no coração infartado o tempo de contração celular pode ser aumentado (Loennechen et al., 2002; Holt et al., 1998) ou permanecer inalterado (Wisloff et al., 2002, Bito et al., 2010). Da mesma forma, o tempo de relaxamento celular tem se mostrado aumentado (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002) ou inalterado (Anand et al., 1997 e Bito et al., 2010).

A diminuição na amplitude de contração de cardiomiócitos de animais infartados pode ser explicada pela redução no transiente de  $Ca^{+2}$  (Holt et al., 1998) e na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; Ait Mou et al., 2008). Além disso, cardiomiócitos de animais infartados apresentam um aumento no tempo para remoção do  $Ca^{+2}$  do citosol (Holt et al., 1998; Ait Mou et al., 2008; Ahlers et al., 2005; Mackiewicz et al., 2008), o que reflete em aumento do tempo de relaxamento celular.

Em relação à sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  em animais infartados, alguns estudos reportaram redução (Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007), enquanto outros pesquisadores não observaram alteração (Yamaguchi et al., 1997; Ait Mou et al., 2008).

De acordo com Bers (2002), a remoção do  $Ca^{+2}$  citosólico acontece por quatro vias, as quais contribuem de maneira quantitativamente diferente. Em ratos, a SERCA2 é a principal via, contribuindo com a remoção de 92% do  $Ca^{+2}$  presente do citosol. O NCX remove cerca de 7%, enquanto a  $Ca^{+2}$  ATPase do sarcolema e o uniportador de  $Ca^{+2}$  mitocondrial participam juntos da remoção de apenas 1% do  $Ca^{+2}$  do citosol.

Por sua vez, a homeostase de algumas dessas vias de remoção do  $Ca^{+2}$  são alteradas pelo IM. Devido a uma menor atividade da SERCA2, a captação de  $Ca^{+2}$  pelo RS é reduzida nos miócitos de animais infartados (Mackiewicz et al., 2008). Além disso, a expressão dessas proteínas foi menor nesses animais,

em comparação aos controles (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007).

A densidade da proteína NCX foi menor nos corações acometidos pelo IM que nos controles (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007), o que pode comprometer a remoção do  $\text{Ca}^{+2}$  do citosol. Em contraste, a atividade da  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase no sarcolema parece não ser alterada pelo IM (Dixon et al., 1992).

Vale ainda destacar que alguns autores consideram a possibilidade de haver comprometimento da função sistólica da câmara ventricular mesmo quando o estado inotrópico de fibras miocárdicas encontra-se normal (Stuveret al., 1994; Chandrashekar et al., 1999; Anand, 2002; Peron et al., 2006). Desse modo, o próprio processo de remodelação, pelas mudanças geométricas ocorridas, poderia comprometer a função global do coração (Anand, 2002; Peron et al., 2006). Além disso, o IM de pequenas dimensões provoca pouca repercussão para o miocárdio e, portanto, em geral, não afeta o inotropismo (Pfeffer et al., 1991; Peron et al., 2006).

As diferenças nos resultados encontrados podem ser explicadas por variações nas condições experimentais encontradas nos diferentes estudos (Zhang et al., 1999; Peron et al., 2006). Dessa forma, o modelo animal utilizado, o tamanho do infarto, a seleção dos miócitos de acordo com a região do miocárdio, e tempo decorrido desde a oclusão da coronária, são alguns fatores capazes de modular as repercussões funcionais para o miocárdio remanescente a um IM e estes foram distintos entre os diversos trabalhos avaliados.

#### **3.4. Benefícios do exercício físico regular realizado após o IM ao miocárdio e cardiomiócitos**

O exercício físico se destaca como terapia não farmacológica para a prevenção de doença coronariana e para a reabilitação dos pacientes já acometidos (Giannuzzi et al., 1997; Kim et al., 2011). Além disso, praticantes de atividade física regular apresentam menor incidência de IM quando comparados com pessoas sedentárias (Ignarro et al., 2007).

O exercício físico regular melhora a função cardíaca, promove a saúde e a qualidade de vida, e reduz a morbidade e mortalidade em pacientes com

doença coronariana e insuficiência cardíaca em todas as fases da doença (Paffenbarger et al. 1993, Blair et al. 1995, Belardinelli et al. 1999, Jolliffe et al. 2001, Silva et al., 2002).

Os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico regular pós IM vêm sendo demonstrados tanto em humanos (Cohn et al., 1993; Giannuzzi et al., 1997; Silva et al., 2002; Kim et al., 2011) quanto em modelos animais (de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011).

Assim como em humanos, os principais benefícios do exercício físico aeróbico regular após o IM em modelo experimental incluem: redução da hiperatividade nervosa simpática (Cohn et al., 1993; Rondon et al., 2006; Jorge et al., 2011), melhoria na função ventricular esquerda (Giannuzzi et al., 1997; Kim et al., 2011; Xu et al., 2008;), redução da congestão pulmonar (Portes e Tucci, 2006; Portes et al., 2009), aumento da tolerância aos esforços físicos (Silva et al., 2002; Rondon et al., 2006; Zanchi et al., 2008) e mudanças estruturais e metabólicas na musculatura esquelética (Rondon et al., 2006; Jorge et al., 2011; Cohn et al., 1993; Pina et al., 2004).

Além disso, o treinamento físico aeróbico após o IM promove diversas adaptações celulares e moleculares favoráveis no músculo cardíaco, tais como, melhoria na contratilidade dos cardiomiócitos (Zhang et al, 2000a; Wisloff et al., 2002; Song et al., 2004; Ait Mou et al., 2008) na expressão da SERCA2 (Wisloff et al., 2002; Jorge et al., 2011) além da recuperação da homeostase do  $Ca^{+2}$  (Zhang et al., 1998; 2000; Ait Mou et al., 2008) e da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Ait Mou et al., 2008).

Os benefícios do treinamento físico aeróbico após o IM estão bem documentados. Entretanto, nas últimas décadas a influência do exercício físico aeróbico iniciado precocemente após o IM sobre o remodelamento e a função ventricular tem sido questionada.

Nesse sentido, estudos sobre os efeitos do treinamento físico aeróbico iniciado precocemente após o IM sobre a remodelação e função ventricular pós IM, tanto em humanos (Jugdutt et al., 1988; Jette et al., 1991; Giannuzzi et al., 1997; Haykowsky et al. 2011) quanto em modelo animal (Kloner e Kloner, 1983; Hammerman et al., 1983; Hochman et al., 1986; Gaudron et al., 1994; de

Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011) têm se mostrado contraditórios.

Em um estudo pioneiro, Jugdutt et al. (1988), demonstraram que pacientes com IM extenso de parede anterior submetidos a um treinamento físico de baixa intensidade (durante 12 semanas), iniciado 3-4 meses após o IM, levou a dano miocárdial adicional. A avaliação pelo ecocardiograma (ECO) bidimensional demonstrou adelgaçamento da parede, expansão da área do infarto, assinergia e redução adicional da FE no grupo treinado com disfunção ventricular.

Por outro lado, Jette et al. (1991), estudaram pacientes com IM anterior extenso e menos de 3 meses de evolução. Os pacientes participaram de um programa de reabilitação com exercícios aeróbico (70 a 80% da frequência cardíaca (FC) de pico) e duração de 4 semanas. Os resultados mostraram que não houve mudança significativa nas medidas hemodinâmicas e o treinamento físico aeróbico não causou deterioração adicional da função ventricular esquerda.

Giannuzzi et al. (1997), evidenciaram que após um IM pequeno, o treinamento físico aeróbico de moderada intensidade iniciado 3-4 semanas após o IM (80% da FC pico, 30min/dia) durante 6 meses atenuou o processo de remodelação cardíaca desfavorável o que melhorou a função global e regional ao longo do tempo.

Em uma recente meta-análise envolvendo 1029 estudos, dos 12 estudos selecionados, em pacientes clinicamente estáveis pós-IM, o treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade teve efeito benéfico sobre a função e remodelação cardíaca e os maiores benefícios foram observados quando o programa de exercícios foi iniciado por volta de 1 semana após o IM e estendeu-se mais que 3 meses (Haykowsky et al. 2011).

Portanto, se o exercício físico deve ser iniciado imediatamente, dias, semanas ou meses após o IM, especialmente após grandes infartos merece estudos aprofundados.

Semelhante a estudos clínicos humanos, o treinamento físico aeróbico iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós IM em modelo animal são controversos. Estudos anteriores mostraram que o treinamento físico com natação iniciado precocemente após o IM em ratos, afeta de forma

desfavorável o remodelamento cardíaco. Por exemplo, Kloner e Kloner, (1983) e Hammerman et al., (1983) demonstraram que o treinamento físico em natação iniciado 24 horas após o IM em ratos com grandes infartos (45 min/dia) durante 7 dias, não alterou o tamanho do infarto, mas foi relatado maior afinamento e dilatação da região cicatricial, ou seja, expansão da área infartada.

Gaudron et al. (1994) demonstraram que o treinamento físico em natação de alta intensidade (90 min/dia, 6 dias/semana) iniciado 4 dias após o IM em ratos Wistar com grandes infartos (>35% do VE), durante 8 semanas, não alterou o tamanho do infarto, mas mostrou-se agravar o processo de remodelação cardíaca, pois causou aumento na hipertrofia, massa relativa do VE, dilatação global severa do VE, expansão do infarto e alterações na geometria ventricular, repercutindo desfavoravelmente na sobrevivência destes animais.

Em contraste, o treinamento físico em esteira rolante iniciado no dia da oclusão coronária (60 min a 10 m/min), durante 7 dias (16 m/min, 90 min/dia) em ratas Sprague-Dawley com pequenos infartos (24% do VE), não resultou em efeito deletério sobre a remodelação cardíaca (Hochman et al., 1986). Além disso, de Waard et al. (2007) relataram que o treinamento físico com corrida voluntária em camundongos ( $\pm 4$  milhas/dia) por 8 semanas, não alterou o tamanho do infarto e não afetou o remodelamento ventricular.

Por outro lado, estudos recentes demonstraram que o treinamento físico aeróbico em esteira rolante iniciado precocemente (entre 24 horas e 7 dias) após o IM, foi capaz de alterar o tamanho do infarto. Por exemplo, Wu et al., 2009, relataram que o treinamento físico aeróbico em esteira rolante de alta intensidade (12m/min, 10° inclinação, 60min/dia), iniciado 24 horas após o IM em camundongos, com duração de 3 dias, foi suficiente para reduzir o tamanho do infarto. Da mesma forma, Jorge et al. (2011) reportaram que o treinamento físico de baixa intensidade em esteira rolante (60 min, 5 dias/semana, 50–70%  $VO_{2max}$ ) iniciado 7 dias após o IM em ratos Wistar, durante 12 semanas, reduziu o tamanho do infarto. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pela redução do tamanho do IM em resposta ao treinamento físico estão a melhoria no fluxo coronário e a elevação dos níveis proteicos e do mRNA do

VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Wu et al., 2009; Jorge et al., 2011).

Em relação à sobrevivência após o IM, Gaudron et al., (1994) demonstraram que a taxa de mortalidade aumentou entre os ratos Wistar com grandes infartos submetidos a treinamento de natação de alta intensidade (90 min/dia, 6 dias/semana, durante 8 semanas), 4 dias após a cirurgia isquêmica.

Em camundongos com grandes infartos, de Waard et al. (2007) mostraram que o treinamento físico em corrida voluntária ( $\pm 4$  milhas/dia) iniciado 24 horas após o IM, por 8 semanas, não comprometeu a sobrevivência após o IM.

Porém, estudo recente em ratos com IM que iniciaram o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade (60 min, 50–70%  $VO_{2max}$ ), 7 dias após o IM durante 12 semanas, reduziu a taxa de mortalidade (Jorge et al., 2011). Estes autores propõem que o efeito benéfico do treinamento físico está associado ao controle neural do sistema cardiovascular, em que a redução no efluxo simpático e consequente restauração do balanço simpático-vagal contribuem diretamente para a redução da morbidade e mortalidade nos animais IM exercitados.

Além disso, trabalhos demonstram que o exercício físico aeróbico de baixa intensidade iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós IM, pode reduzir a deposição de colágeno (fibrose reativa) no miocárdio sobrevivente. Essa redução da fibrose reativa diminui a rigidez no miocárdio e está associada à melhora da função cardíaca de corações infartados (Waard et al. 2007; Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011). Propõe-se que a diminuição da deposição de colágeno em animais IM promovida pelo treinamento físico aeróbico está relacionada a dois fatores: melhor balanço entre síntese e degradação da MEC e inibição de componentes do sistema renina-angiotensina (Xu et al., 2008; 2008a).

As MMPs são proteinases que atuam na degradação da MEC. Essas enzimas são reguladas pelos TIMPs, inibidores teciduais de MMPs, os quais inibem sua atividade, permitindo o acúmulo de colágeno no miocárdio. Xu et al. (2008), relataram que o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade em esteira rolante (16m/min, 50min/dia, 5 dias/semana, 5° de inclinação) iniciado 7 dias após o IM durante 8 semanas, reduziu a fibrose tecidual no miocárdio.

Esses autores evidenciaram que os ratos IM treinados apresentaram diminuição na concentração de TIMP-1 permitindo maior atividade das MMPs. Além disso, demonstram que a redução do estresse cardíaco também pode estar relacionada com a atenuação do sistema renina-angiotensina em resposta ao exercício físico. Este mesmo grupo demonstrou que animais exercitados 7 dias após o IM (16m/min, 50min/dia, 5 dias/semana, 5º de inclinação) durante 8 semanas, apresentaram diminuição da concentração de receptores de angiotensina II do tipo 1 e de RNAm da enzima conversora de angiotensina (Xu et al. 2008a).

Estudos *in vivo* em modelo animal de IM têm demonstrado que o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós IM (7 dias) promove recuperação da função cardíaca, por meio da elevação da PSVE, FE e na porcentagem de encurtamento bem como atenuação da PDFVE (Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011).

Além de estar associado à melhora da função cardíaca, o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade após o IM (iniciado 3-4 semanas após o IM) está relacionado à melhoria na capacidade de realização de esforço físico (Rondon et al., 2006; Zanchi et al., 2008) e conseqüente atenuação da congestão pulmonar (Portes e Tucci, 2006 e Portes et al., 2009).

Embora a atenuação dos efeitos deletérios do processo de remodelamento em resposta ao exercício físico seja muito importante para a melhora da função contrátil, muitos autores sugerem que parte dessa melhora deve-se ao aumento da capacidade contrátil intrínseca dos cardiomiócitos (Leosco et al., 2008; Mou et al., 2008; Wisloff et al. 2002; Song et al., 2004; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010).

Há evidências de que o treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade em esteira rolante, realizado em ratos IM após o período de cicatrização (>4 semanas), é efetivo em corrigir alterações patológicas e induzir melhorias na função cardíaca e na contratilidade de cardiomiócitos (Leosco et al., 2008; Mou et al., 2008).

Contudo, existem poucos estudos e os que existem são contraditórios quanto aos efeitos do treinamento físico iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós-IM sobre a capacidade contrátil intrínseca dos cardiomiócitos de animais infartados (de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). Recentemente,

Bitto et al. (2010), mostraram que camundongos submetidos a treinamento físico com corrida voluntária iniciado 24 horas após a indução do IM, por 8 semanas, não obtiveram alterações no transiente de cálcio, no tempo para o pico de contração e relaxamento celular, mas tiveram a amplitude de contração de cardiomiócitos similar aos dos seus controles normais apesar de não ser significativo.

Em função destas observações, não foi encontrado na literatura estudos que avaliaram a influência do treinamento físico de baixa intensidade em esteira rolante iniciado 24 horas após IM, com a duração de 35 dias, na função contrátil do miocárdio e dos cardiomiócitos de ratos com IM experimental.

Portanto, considerando que o treinamento físico com exercício aeróbico de baixa intensidade promove melhorias na função cardíaca (Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011) e na contratilidade de cardiomiócitos em modelo experimental de IM (Leosco et al., 2008; Ait Mou et al., 2008), e que a cicatrização após o IM neste modelo experimental está completa 28 dias após o IM (Fishbein, 1978b; Whittaker et al., 1991; Holmes et al., 2005) especula-se que o exercício físico aeróbico de baixa intensidade iniciado nos primeiros estágios da cicatrização (24 horas após IM) e durante 35 dias possa atenuar as alterações que o IM provoca na estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos Wistar IM.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Animais e desenho experimental

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa sob o protocolo nº 22/2012) (Anexo 1).

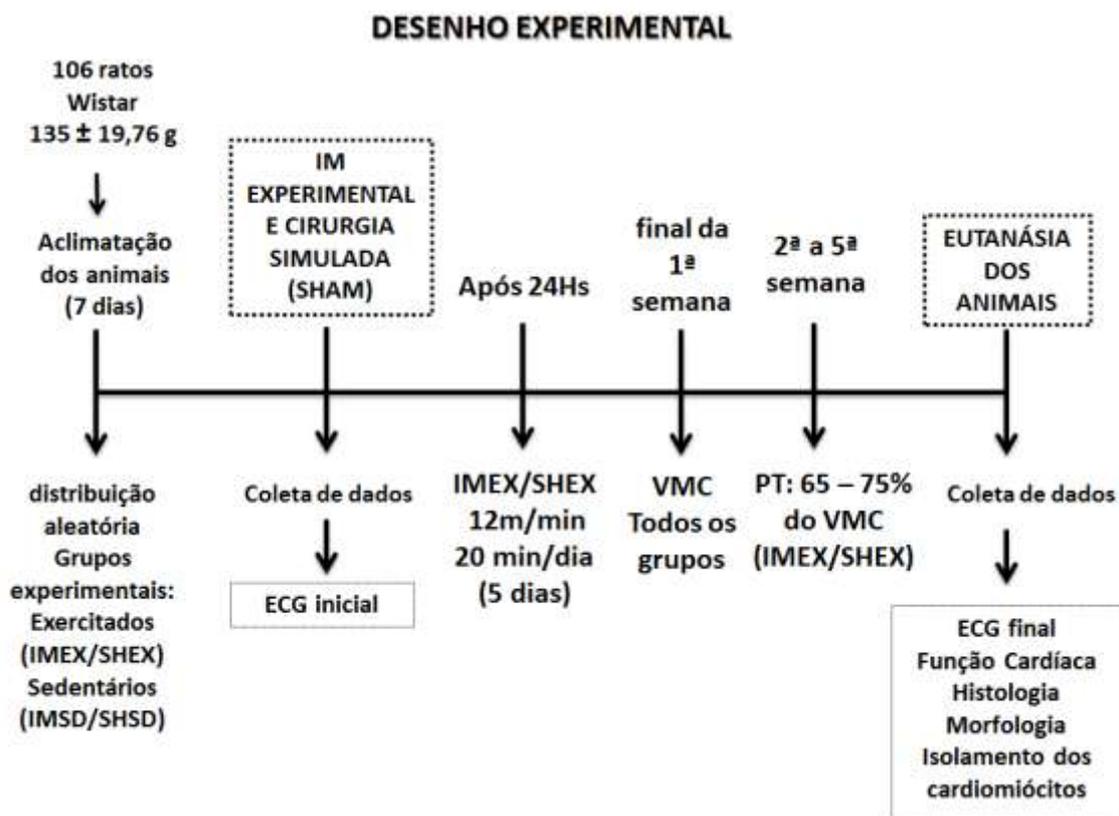
Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 30 dias de idade e peso corporal  $135 \pm 19,76$  g. Nessa faixa de peso, o rato é considerado adulto jovem, situa-se numa fase evolutiva caracterizada por crescimento lento e apresenta mortalidade cirúrgica menor que animais mais velhos (Zornoff et al., 2009). Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Após aclimação de sete dias (Figura 1), os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Sham Sedentário (SHSD, n=15): animais submetidos à cirurgia simulada (esternotomia mediana, pericardiotomia, sem ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda – ACADE) e não submetidos ao programa de corrida em esteira;
- Sham Exercitado (SHEX, n=15): animais submetidos à cirurgia simulada e submetidos ao programa de corrida em esteira por 5 semanas;
- Infartado Sedentário (IMSD, n=15): animais submetidos à ligadura da ACADE (IM) e não submetidos ao programa de corrida em esteira;
- Infartado Exercitado (IMSD, n=15): animais submetidos à ligadura da ACADE (IM) e ao programa de corrida em esteira por 5 semanas.

Os animais foram alojados caixas de polietileno, em grupos de cinco animais por caixa, receberam ração comercial para roedores, água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura média de 22°C e regime de

luminosidade de doze horas de escuridão e doze horas de claridade. O peso corporal foi obtido no início e ao final das 5 semanas de experimento utilizando-se balança eletrônica digital (AS5500C, Marte Balanças e Equipamentos, SP, Brasil).



**Figura 1.** Desenho esquemático experimental. IM= Infarto do miocárdio; VMC= velocidade máxima de corrida em esteira; PT= Programa de treinamento; IMEX: infartado exercitado; IMSD: infartado sedentário; SHEX: Sham exercitado; SHSD: Sham sedentário;

## 4.2. Indução do Infarto do Miocárdio

### 4.2.1. Anestesia

No pré-operatório imediato, foi administrada antibioticoterapia (enrofloxacina 10 mg/kg, IP, dose única). Os animais foram anestesiados em câmara de indução com isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1L/minuto. Posteriormente, foram posicionados em decúbito dorsal para proceder-se a intubação endotraqueal. A frequência de 20 movimentos respiratórios/minuto e a ausência de tônus mandibular serviram de parâmetros para determinar o momento ideal da intubação, por meio de um sistema para

pequenos animais composto de fibra ótica (BioLite, BioTex, Houston, TX) e um cateter intravenoso de 16 a 18 gauges e 2,54 cm de comprimento adaptado como sonda. Na sequência, os animais foram submetidos à ventilação por pressão positiva intermitente (Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilators, Harvard Apparatus, Massachusetts) e a frequência respiratória estabelecida entre 50 e 60 movimentos/minuto, com pressão inspiratória entre 16 e 18 cmH<sub>2</sub>O e relação inspiração/expiração de 1:1. A anestesia foi mantida com isoflurano diluído em oxigênio 100%, com concentração ajustada para manter o plano anestésico adequado.

#### **4.2.2. Toracotomia e infarto do miocárdio**

Os animais foram mantidos em decúbito dorsal com os quatro membros imobilizados sobre uma caixa de polietileno, seguido de ampla tricotomia da região torácica e antissepsia com povidine tópico.

O acesso à cavidade torácica deu-se mediante esternotomia mediana de aproximadamente 2 cm de extensão, mantendo-se intactos o manúbrio e o xifoide. Em seguida, afastou-se gentilmente os pulmões com o auxílio de um cotonete umedecido para facilitar a visualização, e o pericárdio foi então seccionado expondo o coração. A identificação do local para realização da ligadura da ACADE foi feita tendo como referência o apêndice atrial esquerdo. A ligadura foi feita criteriosamente a uma distância de aproximadamente 2 mm do apêndice atrial esquerdo, com fio monofilamentar 6-0. O ponto foi profundo o suficiente para assegurar que a ACADE fosse bloqueada, sendo que o empalidecimento da região inferior do coração serviu como referência para confirmar a ligadura. O eletrocardiograma (ECG), na derivação DII (PowerLab device, ML865, ADInstruments, São Paulo) foi realizado para documentar as alterações eletrofisiológicas decorrentes da ligadura da ACADE em dois momentos, basal e imediatamente após o IM.

A cavidade torácica foi fechada por duas camadas de suturas náilon 4-0 muscular e pele. Antes de completar a última sutura do tórax uma pressão positiva ao final da expiração foi exercida e mantida por aproximadamente 2 segundos com a finalidade de expandir os pulmões ao máximo. No transoperatório, a temperatura corporal foi mantida em 37,5°C, por meio da

transferência de calor oriundo de bolsas de água aquecidas e colocadas dentro da caixa usada para contenção.

#### 4.2.3. Cuidados pós-operatórios

Cotonetes foram utilizados para secar eventuais sangramentos, e para análise da perda volêmica por hemorragia no procedimento cirúrgico, subtraiu-se o peso do cotonete encharcado com sangue do peso do cotonete seco. Um cotonete encharcado com sangue pesou 0,227 mg. Um mililitro de sangue equivale a aproximadamente 1,06 gramas ([http://en.wikipedia.org/wiki/Blood\\_alcohol\\_content](http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_alcohol_content)). Portanto, 0,227 mg foi equivalente a 0,240 mL de sangue. A reposição volêmica foi instituída com solução de cloreto de sódio 0,9% (Isofarma, CE, Brasil) e o volume repostado foi igual ao volume de sangue perdido, administrado intraperitonealmente ao final da cirurgia.

Os animais foram continuamente monitorados com ECG no transoperatório. O infarto do miocárdio foi considerado bem sucedido após identificação da elevação do segmento ST (Figura 8).

O tubo orotraqueal foi removido após a estabilização da respiração espontânea e antes do animal ganhar consciência. A recuperação da anestesia transcorreu com os animais em uma caixa de madeira customizada com temperatura controlada por termostato, entre 37,5°C e 39°C. Depois, foram colocados em caixas individuais onde receberam ração e água *ad libitum*.

Analgesia com tramadol (Fort Dodge, Campinas) na dose de 4 mg/kg foi administrada por via intraperitoneal imediatamente após a cirurgia e em intervalos de seis horas, durante as 20 horas subsequentes. Atropina (Sintofarma, SP, Brasil) na dose de 1 mg/kg foi administrada por via subcutânea quando os animais apresentaram evidência de secreção pulmonar na recuperação.

A simulação da cirurgia realizada no grupo SHAM (SH) consistiu do mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura da ACADE.

As cirurgias cardíacas, bem como as avaliações eletrocardiográficas e da função cardíaca, foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa.

### **4.3. Adaptação à esteira**

Todos os ratos foram submetidos a um período de adaptação para se familiarizarem com o protocolo de corrida caminhando diariamente à velocidade de 5 m/min, 5 min/dia e 0° de inclinação, cinco dias consecutivos, durante o período de aclimatação (item 4.1).

### **4.4. Exercício físico após o IM**

Vinte e quatro horas após indução do IM e da cirurgia simulada, os animais dos grupos IMEX e SHEX foram colocados na esteira rolante com 5° de inclinação, por um período de 20 minutos, onde correram à velocidade de 12m/min durante 5 dias consecutivos. No 6° dia, os animais foram submetidos à avaliação da tolerância ao esforço físico (TTF inicial).

### **4.5. Avaliação da capacidade ao esforço físico**

A intolerância ao esforço físico foi estimada por meio da capacidade máxima de esforço físico, avaliado em teste de exercício progressivo com protocolo escalonado, 5 dias após o IM e à cirurgia simulada em todos os grupos experimentais (TTF inicial).

A capacidade máxima de esforço foi quantificada pelo tempo total do teste até a fadiga em minutos (TTF, min). O teste foi realizado em uma esteira rolante elétrica (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais iniciaram a corrida à velocidade de 10 m/min, 5° de inclinação, e a velocidade da esteira foi aumentando em 1 m/min a cada 3 minutos até a fadiga (adaptado de Lacerda, 2006). A fadiga foi determinada quando o animal se recusava a continuar mesmo após estimulação manual, ou quando o animal se mostrava incapaz de manter o ritmo na esteira (Trueblood et al., 2004). A velocidade máxima de corrida (VMC) obtida neste teste foi utilizada para calcular a intensidade de corrida adotada no programa de treinamento (%VMC, m/min). A capacidade máxima de esforço físico foi estimada ao final da primeira semana (TTF inicial) e da quinta semana de experimento (TTF final).

#### 4.6. Programa de treinamento

O programa de treinamento foi realizado em uma esteira rolante elétrica (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), a 5° de inclinação, 5 dias por semana (segunda a sexta-feira), 60 minutos por dia, durante 5 semanas. A duração da sessão de treinamento e a velocidade de corrida foram aumentadas progressivamente para alcançar 65-75% da velocidade máxima de corrida (VMC), ao final da 2ª semana de treinamento. Esta intensidade foi mantida até o final do programa de treinamento de 5 semanas (tabela 1) (adaptado de Hochman e Healy, 1986).

Os animais dos grupos não treinados em esteira rolante (SHSD, IMSD) foram igualmente manuseados e colocados na esteira rolante 3 dias/semana, 10 min/dia, 5° de inclinação, à velocidade de 5 m/min.

Quarenta e oito horas após o último teste de tolerância ao esforço (TTF final), os animais foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica e da função cardíaca (item 4.6 e 4.7).

O programa de treinamento foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício – BIOEX localizado no departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1. Programa de treinamento em esteira rolante

Semanas	Duração (min)	Intensidade (VMC)	Velocidade, Inclinação
Primeira (TTF inicial)	20	50%	12 m/min, 5°
Segunda	20 – 60	65 - 75%	15±2 m/min, 5°
Terceira	60	65 - 75%	15±2 m/min, 5°
Quarta	60	65 - 75%	15±2 m/min, 5°
Quinta (TTF final)	60	65 - 75%	15±2 m/min, 5°

(min)= duração em minutos; (VMC)= velocidade máxima de corrida; (TTF) = tempo total do teste até a fadiga.

#### 4.7. Avaliação eletrocardiográfica (ECG)

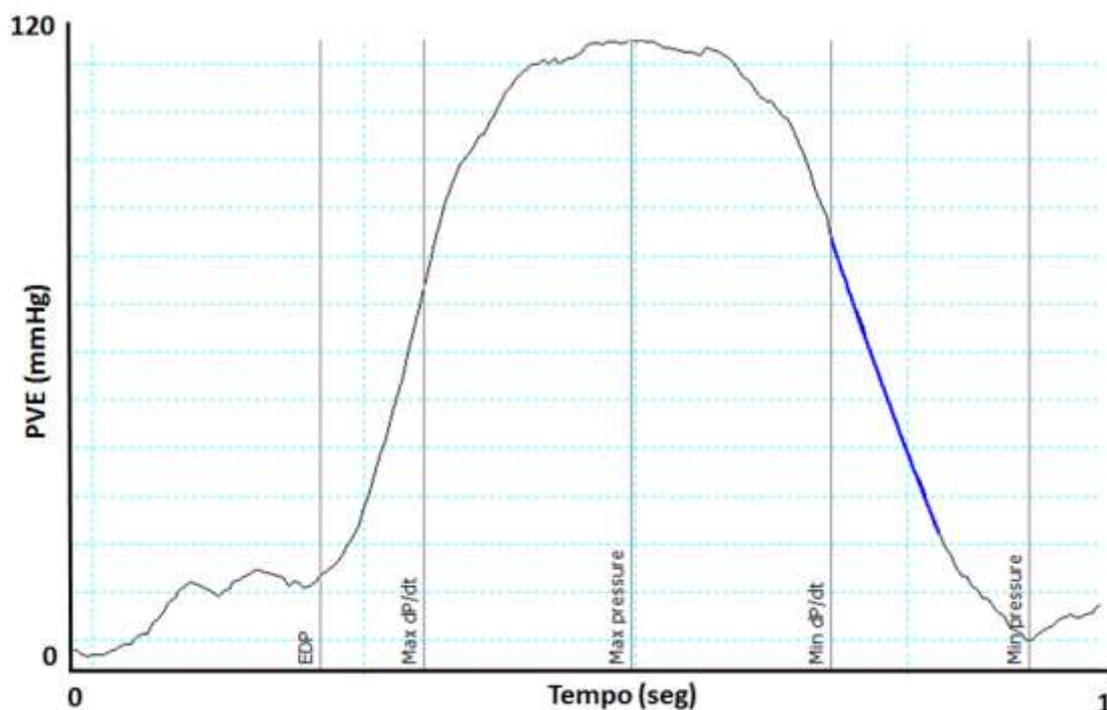
Quarenta e oito horas após o último TTF, vinte animais foram superficialmente anestesiados com isoflurano, para realização do ECG. Eletrocardiogramas foram registrados na derivação DII, em decúbito dorsal, por

dois minutos. Posteriormente, os traçados eletrocardiográficos foram analisados quanto aos seguintes parâmetros: amplitude da onda P (mV), intervalo PR (ms), duração do complexo QRS (ms), intervalo QT (ms), intervalo QT corrigido (QTc) (ms) para FC usando a fórmula de Bazett (QTc- Bazett), presença da onda Q e alterações do segmento ST. As medidas foram realizadas a partir de um segmento de 5 segundos consecutivos livre de artefatos. A média obtida deste período foi utilizada para comparação antes e após o programa de treinamento (IM vs. IMEX).

#### **4.8. Avaliação da função cardíaca**

Imediatamente após aquisição do ECG, o plano anestésico foi aprofundado e uma segunda toracotomia foi realizada para avaliação da função ventricular esquerda. Um cateter de 22 gauges preenchido com solução fisiológica 0,9% heparinizada ( $50 \text{ UI. mL}^{-1}$ ) foi inserido no epicárdio apical do ventrículo esquerdo (VE) e conectado ao transdutor de pressão arterial e este a um sistema de registro computadorizado (Powerlab modelo MLT0380, ADInstruments).

Aguardaram-se 2 minutos para estabilização dos parâmetros hemodinâmicos. Os sinais de pressão ventricular esquerda foram registrados com frequência amostral de 1,000 samples/s e analisados. As variáveis FC, PSVE, PDFVE,  $dP/dt_{\text{max}}$  e  $dP/dt_{\text{min}}$  foram analisadas e comparadas entre os grupos após considerar a média de cinco ciclos cardíacos subsequentes e livres de artefatos. Os registros foram digitalizados para posterior análise usando o software LabChart v.7. (ADInstruments INC, Austrália) conforme demonstrado na Figura 2.



**Figura 2.** Registro típico de uma curva de pressão do VE, mostrando os pontos de análise. EDP = pressão diastólica final do VE (mmHg); Max dP/dt = taxa máxima de elevação da pressão (mmHg/s); Max pressure = pressão sistólica do VE (mmHg); **Min dP/dt = taxa mínima de declínio da pressão** do VE (mmHg/s); Min pressure = pressão diastólica do VE (mmHg); PVE = pressão do VE (mmHg); seg = segundos.

#### 4.9. Avaliação da hipertrofia e da insuficiência cardíaca congestiva (ICC)

Após efetuar as medidas de pressão procedeu-se a eutanásia por sobredose anestésica de isoflurano. Os corações foram retirados e lavados com solução fisiológica, pesados e dissecados. Os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). O peso do coração, o peso relativo do coração (Libonati et al., 2003) e o peso relativo do ventrículo esquerdo (Portes e Tucci, 2006) foram utilizados como índices de hipertrofia cardíaca.

Para determinar se os ratos com IM desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva (ICC), foi avaliado o teor de água no pulmão. O conteúdo hídrico dos órgãos foi obtido a partir dos seus pesos úmidos e secos. O peso úmido foi obtido em balança de alta precisão, logo após a remoção do órgão da cavidade torácica e dissecação dos tecidos anexos. Esses pulmões foram identificados, levados para uma estufa (MA035, Marconi Equipamentos, SP, Brasil) para desidratação a 65°C por 7 horas e novamente pesados (conforme

Yeğinsu, 2010). Obtidos os pesos secos do pulmão, o teor de água (%H<sub>2</sub>O) de cada órgão foi definido pela equação (conforme descrito por Portes e Tucci 2006):

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (\text{P úmido} - \text{P seco}) / \text{P úmido} \times 100$$

O tamanho do coração foi calculado por mensurações do eixo longitudinal e transversal com paquímetro. Para calcular o volume cardíaco, o órgão foi submerso em proveta graduada e preenchido com volume de solução fisiológica, precisamente determinado. O volume de água deslocado foi equivalente ao volume do órgão.

#### **4.10. Avaliação histológica**

Os corações removidos foram avaliados quanto ao tamanho do infarto, conteúdo de colágeno e área do cardiomiócito no ventrículo esquerdo.

Cada coração foi cortado em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3mm) e base. O anel mediano foi fixado em formalina de Carson 10% (por 48 horas), incluídos em parafina e submetidos ao tratamento histológico convencional.

Posteriormente, as secções foram cortadas em 5 µm de espessura, com intervalo de 100 µm, utilizando um micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha). Foram montadas duas lâminas histológicas contendo de 2 a 3 cortes.

Os cortes histológicos corados por hematoxilina – eosina (HE) foram utilizados para aferição das áreas de secção transversa dos miócitos do ventrículo esquerdo, empregando-se microscópio (Olympus BX 53; Tokio, Japan) acoplado a câmera digital (Olympus DP 73; Tokio, Japan) por meio do aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tokio, Japan). Dez imagens do ventrículo esquerdo foram capturadas de cada animal, com objetiva de 10x. As imagens foram analisadas com auxílio do programa Image - Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Após a calibração, utilizou-se a ferramenta “create polygon feature” para determinar a área dos cardiomiócitos. Foram mensuradas 50 a 60 células e os cardiomiócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma redonda, núcleo visível no

centro da célula. As áreas médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

As lâminas coradas por *picrosirius red* (Junqueira et al. 1979) foram utilizadas para aferir a quantidade de colágeno intersticial nas regiões do septo interventricular (SI), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). As lâminas foram observadas em microscópio com luz polarizada (Olympus BX 53; Tokio, Japan). Três imagens do VE, VD e SI foram capturadas, com objetiva de 10x, através de câmera digital (Olympus DP 73; Tokio, Japan) utilizando-se o aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tokio, Japan). As imagens foram analisadas com auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Após a calibração, utilizou-se a ferramenta “*intensity range selection*” para determinar as cores de interesse para as medições. As fibras espessas que sob luz polarizada manifestavam coloração laranja-vermelha foram consideradas colágeno tipo I (Junqueira et al, 1978) e maduras (Whittaker P., 1995). A média da área ocupada pelo colágeno foi dividida pela média da área total da imagem e os resultados calculados em percentagem das fibras por área total.

Adicionalmente, as lâminas coradas por *picrosirius red* foram utilizadas para análise do tamanho do infarto. Para isto, foi utilizado um scanner (HP deskjet F380, EUA) para captura das imagens dos cortes, com aumento de 600dpi e com dimensões de 2 cm de altura e 2 cm de largura. As imagens foram analisadas com auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Após a calibração, utilizou-se a ferramenta “*create trace feature*” para determinar os seguintes perímetros: CEN = perímetro da cicatriz endocárdica; PEN = perímetro endocárdico total; CEP = perímetro da cicatriz epicárdica; PEP = perímetro epicárdico total. O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado utilizando a seguinte fórmula (Mulder et al., 2002):

$$(CEN + CEP / PEN + PEP) \times 100$$

O tamanho do infarto foi calculado como média total de todos os cortes dentro de cada grupo (IMSD e IMEX).

Os cortes histológicos bem como a coloração das lâminas foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

#### **4.11. Avaliação da função contrátil dos cardiomiócitos**

Vinte animais foram utilizados para a avaliação da função contrátil de cardiomiócitos isolados, conforme metodologia descrita abaixo.

##### **4.11.1. Isolamento dos cardiomiócitos**

Após eutanásia por decapitação em guilhotina (EB 271, Insight, São Paulo, Brasil) para remoção cirúrgica do coração as cartilagens costocodrais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido cranialmente. Após exposição da cavidade torácica, as veias cava cranial e caudal, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago e parte dos pulmões foram seccionados sucessivamente até a remoção em bloco do coração. Logo após a remoção, o coração foi colocado em um béquer contendo uma solução nutritiva (solução A, item 4.11.2). Após estes procedimentos o coração pesado em balança de precisão (modelo AG 200, Gehaka, Brasil), foi transferido para uma placa de vidro, e a artéria aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura de microcirurgia na altura do tronco braquicefálico, fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável adaptada como cânula, e acoplada a uma seringa de 1 ml que foi fixada a um sistema de *Langendorff* customizado a 37°C, com controle manual da perfusão por gravidade usando-se uma torneira de três vias. A seguir o coração foi perfundido com uma solução de isolamento, contendo 750 µM de CaCl<sub>2</sub> (solução A) em fluxo constante, até que os vasos coronários estivessem limpos de sangue. Em seguida, trocou-se a perfusão para uma solução livre de cálcio, contendo 0,1 mM de *EGTA* (solução B item 4.10.2), durante 6 min, para destruição das bandas escalariformes entre os cardiomiócitos. Em seguida, o coração foi perfundido com uma solução contendo 1 mg.mL<sup>-1</sup> de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) e 100 µM de CaCl<sub>2</sub> (solução C item 4.10.2), durante 25 min, para a destruição das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O<sub>2</sub> 100% – White Martins, Brasil) e mantidas a 37°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados. O ventrículo direito foi removido e o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular. Os músculos papilares e a região da cicatriz do infarto (tecido fibrótico) foram removidos manualmente da superfície do

ventrículo esquerdo. Foi utilizada apenas a região do miocárdio remanescente ao infarto. Logo após, as amostras foram colocadas em frascos contendo 5 ml da solução enzimática (colagenase), suplementada com 1% de albumina sérica bovina (solução D item 4.10.2). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 min, em “banho-maria” a 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O<sub>2</sub> 100% – White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30s. O sobrenadante foi removido e as células foram suspensas na solução 750 µM de CaCl<sub>2</sub> (solução A item 4.11.2). Em seguida, as células foram armazenadas em placas de petri a 5°C, até serem utilizadas. Durante os experimentos com cardiomiócitos isolados somente as células tolerantes ao Ca<sup>2+</sup>, quiescentes e apresentando formato e estrias transversais bem definidas foram utilizadas. Os registros foram sempre feitos entre uma e seis horas após o isolamento.

#### **4.11.2. Soluções de isolamento**

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos ventriculares foram feitas usando-se uma solução básica com água milli-Q e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl<sub>2</sub> (1,43) – 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; (HEPES) (5) – 0,062 g/l; glicose (10) – 1,8 g/l; taurina (20) – 2,38 g/l; creatina (10) – 1,3 g/l; pH = 7,3; temperatura ambiente.

*Solução A:* Para a solução de isolamento contendo Ca<sup>2+</sup>, foram adicionados 375 µL de CaCl<sub>2</sub> (1 M) em 500 mL da solução básica.

*Solução B:* Para a solução de isolamento livre de Ca<sup>2+</sup>, foram adicionados 250 µL de EGTA (100 mM) em 250 ml da solução básica.

*Solução C:* Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase e 15 µL de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) em 20 ml da solução básica.

*Solução D:* Para a solução com 1% de albumina bovina, foram adicionados 500 mg de albumina sérica bovina em 5 ml de solução básica. Após o isolamento, 1 ml de solução com albumina foi adicionado para cada 10 ml da solução enzimática C.

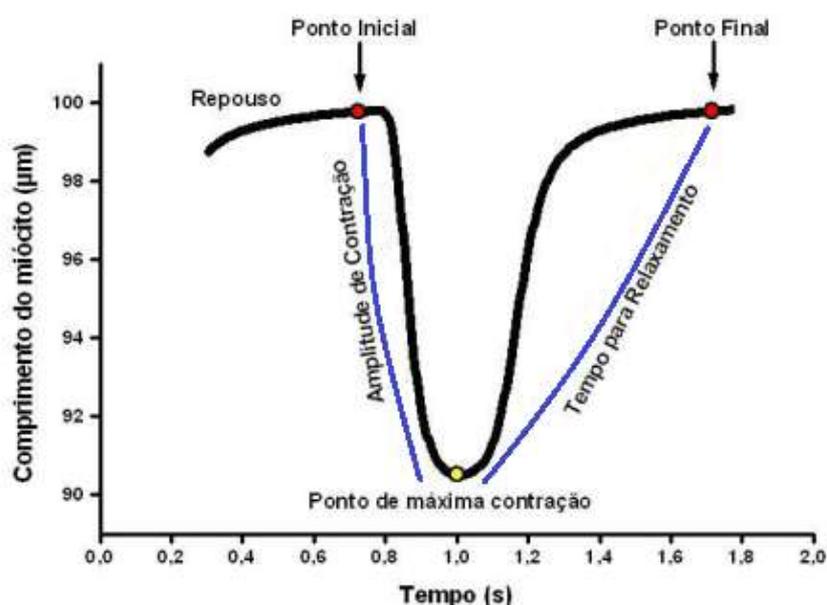
#### **4.11.3. Solução tampão HEPES**

Durante a análise da mecânica de contração, os miócitos cardíacos foram banhados com a solução de perfusão tampão HEPES contendo (em mM): solução estoque: NaCl (113) – 65,99 g/L; HEPES (5) – 11,9 g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1) – 1,42 g/L; MgSO<sub>4</sub> (1) – 2,46 g/L; KCl (5) – 3,72 g/L; solução sopa: Na acetato (20) – 16,4 g/100 ml; glicose (10) – 18,1 g/100ml; insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 ml. Para fazer um litro desta solução, foram adicionados 100 ml da solução estoque, 10 ml da solução sopa e 1 ml de CaCl<sub>2</sub> (1) em água mili-Q. Esta solução foi equilibrada para um pH=7,4 e mantida em temperatura ambiente.

#### **4.11.4. Mensuração da contração celular**

A contração celular foi mensurada por meio de um sistema de detecção de bordas (Contractility system, Ionoptix, EUA), baseado na medida de alterações no comprimento dos cardiomiócitos, conforme descrito anteriormente (Prímola-Gomes et al., 2009). Em resumo, os cardiomiócitos foram acomodados numa câmara experimental montada em um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão) e banhados por solução de perfusão tampão HEPES, em temperatura de 37°C. Os cardiomiócitos foram visualizados em um monitor com aumento de 400x por meio de uma de uma câmera CCD (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio. As células foram visualizadas por um sistema de captura de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA - frequência de 240 Hz) onde as bordas transversais (direita e esquerda) das células foram identificadas pelo sistema quando os cardiomiócitos foram estimulados externamente na frequência de 1 Hz (10 Volts, duração de 5 ms) por um par de eletrodos de aço, acoplado nos dois lados internos da câmara experimental, usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). As bordas dos cardiomiócitos, em movimento de encurtamento e relaxamento em resposta aos estímulos foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Contractility system, Ionoptix, EUA), e armazenados para análise posterior. Dez a 15 contrações consecutivas foram utilizadas para analisar as propriedades mecânicas de uma determinada célula.

Os resultados gerados foram analisados por meio de um programa customizado e desenvolvido na plataforma MatLab®. As variáveis analisadas pelo programa foram: amplitude de contração (variação percentual do comprimento celular em relação ao repouso, % encurtamento); tempo até o pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a amplitude máxima de contração, ms); tempo até 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento, ms); Os principais parâmetros avaliados são ilustrados na figura 3.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo das propriedades mecânicas analisadas.

A mensuração da função contrátil dos cardiomiócitos foi realizada no Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX), no departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

#### 4.12. Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal foram comparados pela análise de variância de duas entradas (*ANOVA two way*) pois havia o interesse na interação entre grupos (IM vs. SH) e entre as condições (SD e EX). Comparações entre os grupos experimentais usando *ANOVA Two-Way* seguidas do teste *post hoc* de Tukey foram feitas considerando-se as seguintes variáveis: peso corporal final, peso cardíaco, pesos relativo do

coração e dos ventrículos (direito e esquerdo, individualmente), área celular do miócito, volume cardíaco, dimensões do miocárdio (transversal e longitudinal), teor hídrico pulmonar, conteúdo de colágeno e avaliação da função cardíaca.

Para avaliar as diferenças entre a capacidade de corrida dos animais exercitados e não exercitados e para tamanho do infarto foi utilizado o teste t para amostras independentes. Para os parâmetros eletrocardiográficos, foi utilizado o teste t pareado (antes da cirurgia (basal) vs. após o IM) e para amostras independentes (IM vs. IMEX).

Os dados referentes aos parâmetros da função contrátil dos cardiomiócitos não apresentaram distribuição normal. Diante disso, foi utilizada a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos.

Os dados foram apresentados na forma de média (M)  $\pm$  desvio padrão (DP). O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ . Foram utilizados os programas *SigmaPlot*, v.11.0 e *GraphPad Prism 5*.

## 5. Resultados

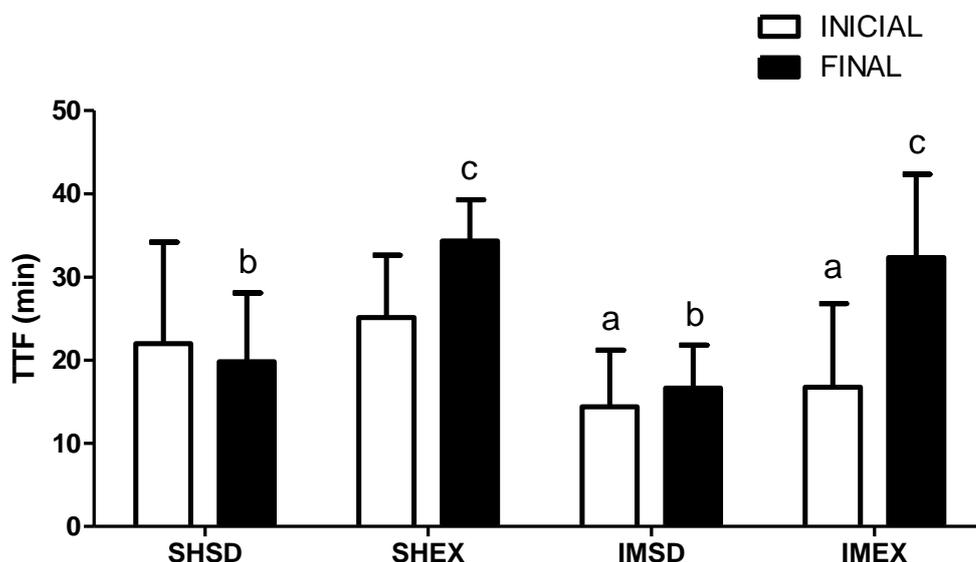
### 5.1. Mortalidade/Sobrevivência

Observou-se que dos sessenta e quatro animais submetidos à cirurgia de indução do infarto dezoito (29,7%) não sobreviveram ao procedimento. Dos quarenta e dois ratos submetidos à cirurgia simulada, onze (26%) não sobreviveram. Não houve mortalidade após a recuperação anestésica, durante o período crônico pós-IM ou durante o programa de corrida aplicado. A baixa taxa de mortalidade no presente estudo dificultou a análise da sobrevivência estatisticamente.

### 5.2. Indicadores de Insuficiência Cardíaca

#### 5.2.1. Avaliação da tolerância ao esforço físico

A figura 4 apresenta o TTF inicial e final de todos os grupos experimentais. O TTF inicial dos animais com IM foram menores que nos animais Sham. Ao final de 5 semanas, o TTF dos animais IM exercitados aumentou quando comparado ao grupo IM não exercitado (IMEX:  $32 \pm 5$  min vs IMSD:  $17 \pm 5$  min;  $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Tempo total de exercício até a fadiga (TTF, min) obtido no teste de esforço físico. INICIAL: TTF no início do programa de corrida. FINAL: TTF ao final do programa de corrida. Dados expressos em Média  $\pm$  DP ( $p < 0,05$ ). (a)  $p < 0,05$  vs. Sham. (b)  $p < 0,05$  vs. SHEX. (c)  $p < 0,05$  vs. IMSD.

O aumento no TTF nos animais IM submetidos ao programa de corrida indica melhora na tolerância ao exercício físico. Como esperado, entre os animais sham, os exercitados exibiram maior TTF que o seu controle (SHEX:  $34 \pm 10$  min vs. SHSD:  $20 \pm 8$  min;  $p < 0,05$ ). Cabe ressaltar que a tolerância ao esforço nos animais IMEX alcançou os valores observados nos animais do grupo com cirurgia simulada e exercitados (SHEX:  $34 \pm 10$  vs. IMEX:  $32 \pm 5$  min).

Não ocorreram óbitos durante o teste ou imediatamente após o teste, assim, embora seja um teste de característica máxima, pode ser usado no modelo experimental de IM.

### **5.2.2. Avaliação da Congestão pulmonar**

O teor de água no pulmão dos animais submetidos ao infarto foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em comparação com os ratos submetidos à cirurgia simulada (IM:  $80 \pm 1,6\%$  vs. SH:  $78,0 \pm 0,8\%$ ). Não houve diferença estatística ao se comparar os animais infartados exercitados e sedentários (IMSD:  $80,1 \pm 1,6\%$  vs. IMEX:  $79,8 \pm 1,5\%$ ).

Estes resultados indicam que os animais Sham configuram a mínima variabilidade do teor de água do pulmão dentro dos parâmetros de normalidade:  $78,0 \pm 0,8\%$  (Tucci et al., 2011). Os animais IM apresentaram maior congestão pulmonar em relação aos animais Sham e o programa de treinamento físico aplicado não foi capaz de atenuar o acúmulo deste líquido no pulmão.

### **5.3. Indicadores de Remodelamento Cardíaco**

Foram realizadas análises morfológicas e histomorfométricas com o intuito de avaliar o remodelamento cardíaco neste modelo animal. Foram avaliadas: peso do coração, peso do coração corrigido pelo peso corporal, peso ventricular esquerdo corrigido pelo peso corporal, área do cardiomiócito, tamanho do infarto e fração de colágeno cardíaco na área livre de infarto do ventrículo esquerdo, ventrículo direito e septo interventricular.

### 5.3.1. Peso corporal, do coração e dos ventrículos e características morfológicas do miocárdio.

O peso corporal inicial (PCI) e final (PCF), peso do coração (PC), peso relativo do coração (PC/PCF), peso relativo do ventrículo esquerdo (VE/PCF), peso relativo do ventrículo direito (VD/PCF), tamanho do coração no eixo longitudinal (TL) e transversal (TT), volume cardíaco (VC) e teor de água no pulmão (%H<sub>2</sub>O) estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal, do coração e dos ventrículos, características morfológicas do miocárdio e teor de água nos pulmões.

	SHSD (n=5)	SHEX (n=5)	IMSD (n=5)	IMEX (n=5)
PCI (g)	146 ± 15,8	142 ± 13,0	136 ± 16,8	130 ± 5,8
PCF (g)	312 ± 15,6	322 ± 26	328 ± 16	321 ± 36,6
PC (g)	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,3*	2,0 ± 0,4*
PC/PCF (mg/g)	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,7	5,7 ± 1,0*	6,1 ± 1,1*
VE/PCF (mg/g)	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,4	4,0 ± 0,5*	4,6 ± 1,1**
VD/PCF (mg/g)	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,3
VC (ml)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,4*	1,2 ± 0,0*
TL (mm)	16,0 ± 0,5	15,2 ± 0,9	17,2 ± 0,6*	17,3 ± 0,7*
TT (mm)	13,7 ± 0,6	13,1 ± 0,8	14,2 ± 0,9	14,5 ± 1,8
%H <sub>2</sub> O	78,0 ± 0,8	78,0 ± 0,8	80,1 ± 1,6*	79,8 ± 1,5*

Controle sedentário (SHSD), Controle exercitado (SHEX), Infartado sedentário (IMSD), Infartado exercitado (IMEX), peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF), peso do coração (PC), peso relativo do coração (PC/PCF), peso relativo do ventrículo esquerdo (VE/PCF), peso relativo do ventrículo direito (VD/PCF), tamanho do coração no eixo longitudinal (TL) e transversal (TT), Teor de água no pulmão (%H<sub>2</sub>O), Volume cardíaco (VC). n, número de animais. \* p < 0,05 vs. Sham. # p < 0,05 vs. SHEX. ANOVA, seguido do teste de Tukey (p < 0,05).

Ao final das 5 semanas, o peso corporal não foi significativamente diferente entre os grupos demonstrando que nem o IM e nem o programa de corrida afetaram este parâmetro (Tabela 2).

O peso do coração e o peso relativo do coração foram maiores (p < 0,01) nos ratos do grupo IM quando comparados ao grupo Sham (IM vs. SH). Ao se comparar os animais IM o programa de corrida aplicado não alterou estes parâmetros (IMEX vs. IMSD).

O peso relativo do VE não foi diferente entre os animais submetidos ao IM (IMEX vs. IMSD). Os animais do grupo IM apresentaram maior peso relativo do VE quando comparados ao grupo Sham (IM vs. SH). Entre os exercitados, os animais do grupo IMEX exibiram peso relativo do VE significativamente maior que os animais do grupo SHEX (Tabela 2).

O peso do VD não foi diferente entre os grupos. A igualdade de pesos do VD sugere que a repercussão hemodinâmica do IM, nesse período, não chegou a acarretar hipertensão pulmonar capaz de induzir hipertrofia expressiva da massa miocárdica do VD.

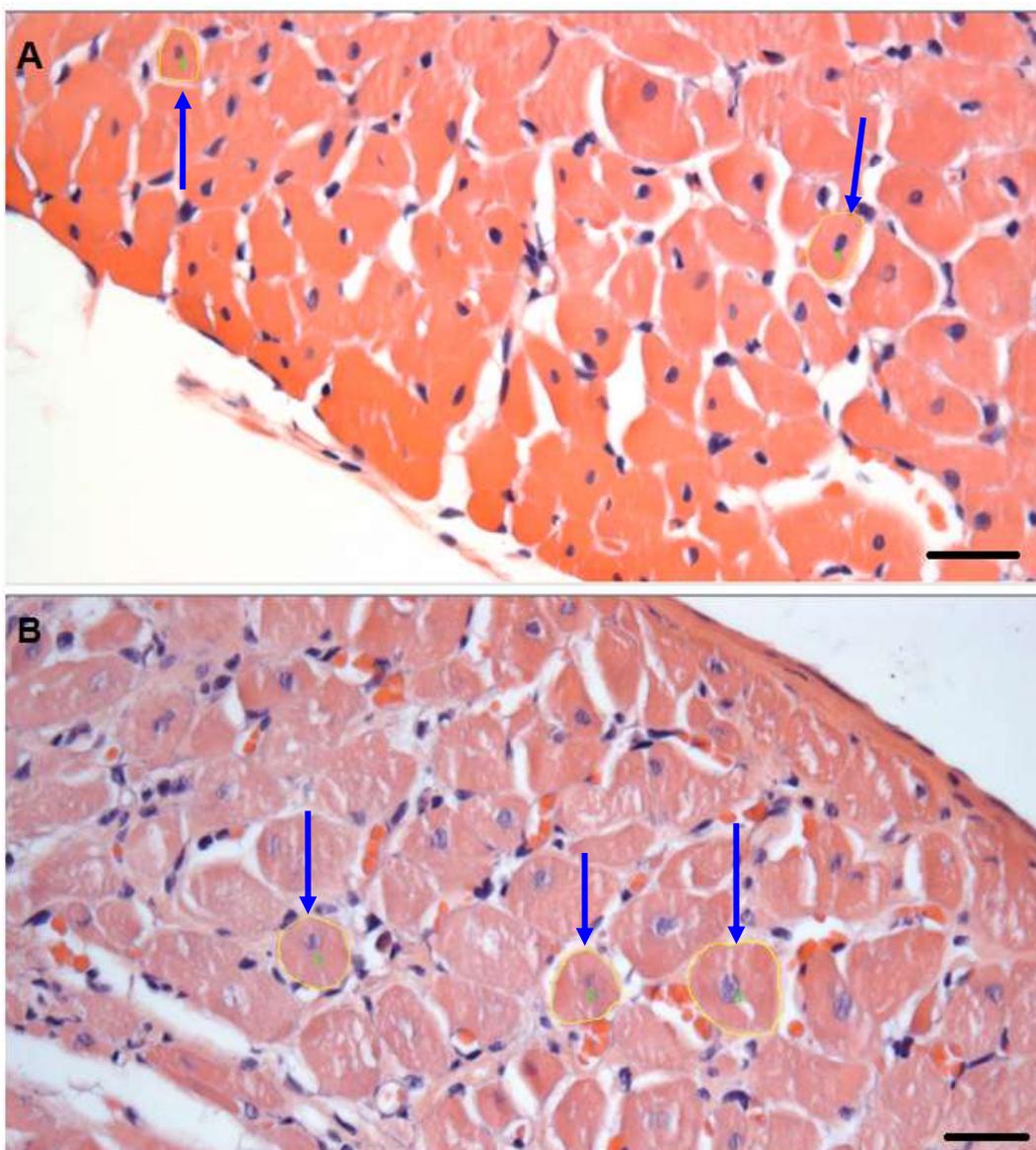
Em relação ao tamanho do coração, observa-se que o comprimento longitudinal do coração dos animais do grupo IM foi maior ( $p < 0,01$ ) em comparação ao dos animais submetidos à cirurgia simulada (IM vs. SH). Ao analisar o comprimento transversal, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2).

A análise do volume cardíaco evidencia que o programa de corrida não alterou este parâmetro nos animais com IM (IMEX vs. IMSD). Contudo, entre os animais sedentários, aqueles com IMSD exibiram maior volume cardíaco que os animais do grupo SHSD (IM vs. SH) (Tabela 2).

### **5.3.2. Área do cardiomiócito**

Para a medida da área celular transversa foram selecionados apenas os cardiomiócitos com forma redonda e núcleo visível no centro da célula, conforme apresentado pela figura 5.

No presente estudo, verificou-se que, ao se comparar os grupos IM vs. SH, as áreas seccionais dos miócitos dos ventrículos esquerdos dos animais IM (IMSD:  $412,2 \pm 127,0 \mu\text{m}^2$ ; IMEX:  $416,1 \pm 141,3 \mu\text{m}^2$ ) foram maiores ( $p < 0,05$ ) que nos ratos dos grupos SH (SHSD:  $347,2 \pm 78,08 \mu\text{m}^2$ ; SHEX:  $344,6 \pm 106,3 \mu\text{m}^2$ ). Ao se comparar os animais exercitados (IMEX vs. SHEX), as áreas seccionais dos miócitos dos VE dos animais IMEX foram maiores ( $p < 0,05$ ) do que nos animais SHEX. O mesmo ocorreu ao se comparar os animais não exercitados (IMSD vs. SHSD), onde o grupo IMSD apresentou miócitos com maiores áreas ( $p < 0,05$ ). Ao se comparar os animais IM o programa de corrida aplicado não alterou este parâmetro (IMSD vs. IMEX).

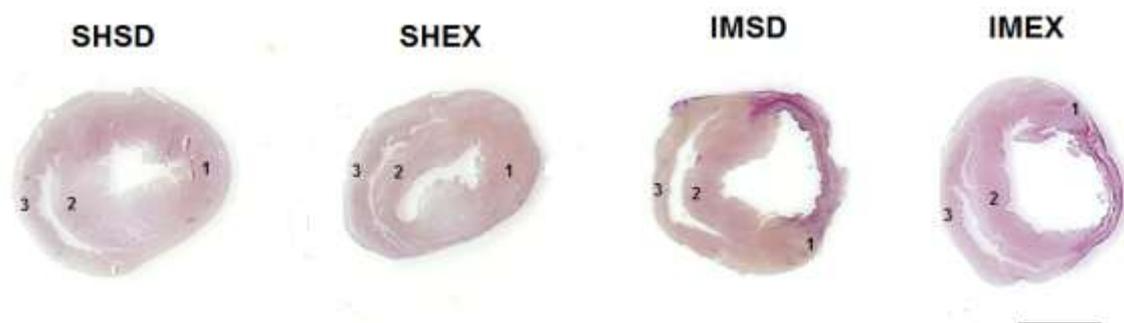


**Figura 5.** Fotomicrografia representativa do corte transversal do VE, corados com hematoxilina – eosina (HE). (A) animal sham. (B) animal IM. Os cardiomiócitos selecionados para a medida da área transversa estão indicados pelas setas. Barra = 100  $\mu$ m.

### 5.3.3. Tamanho do infarto (%)

Verificou-se, no presente estudo, que o tamanho do infarto foi de  $37 \pm 9\%$  nos animais IMSD e  $36 \pm 15\%$  nos animais IMEX. A ligadura da ACADE induziu infartos de tamanho moderado e apresentaram similaridade na porcentagem da área de infarto.

A Figura 6 apresenta imagens de cortes transversais dos corações dos grupos estudados. Essas imagens ilustram o adelgaçamento da parede livre do VE resultante da ligadura da ACADE cinco semanas após o IM.



**Figura 6.** Fotomicrografias representativas da região medial dos corações em corte transversal corados com *picrossírius red*. A região infartada apresenta-se corada em vermelho. Barra = 200  $\mu$ m. (1) parede livre do VE. (2) Septo interventricular (SI). (3) Ventrículo direito (VD). SHSD, controle sedentário. SHEX controle exercitado. IMSD, infartado sedentário. IMEX, infartado exercitado. Notar o adelgaçamento da parede livre do VE isquêmica.

#### 5.3.4. Conteúdo de Colágeno

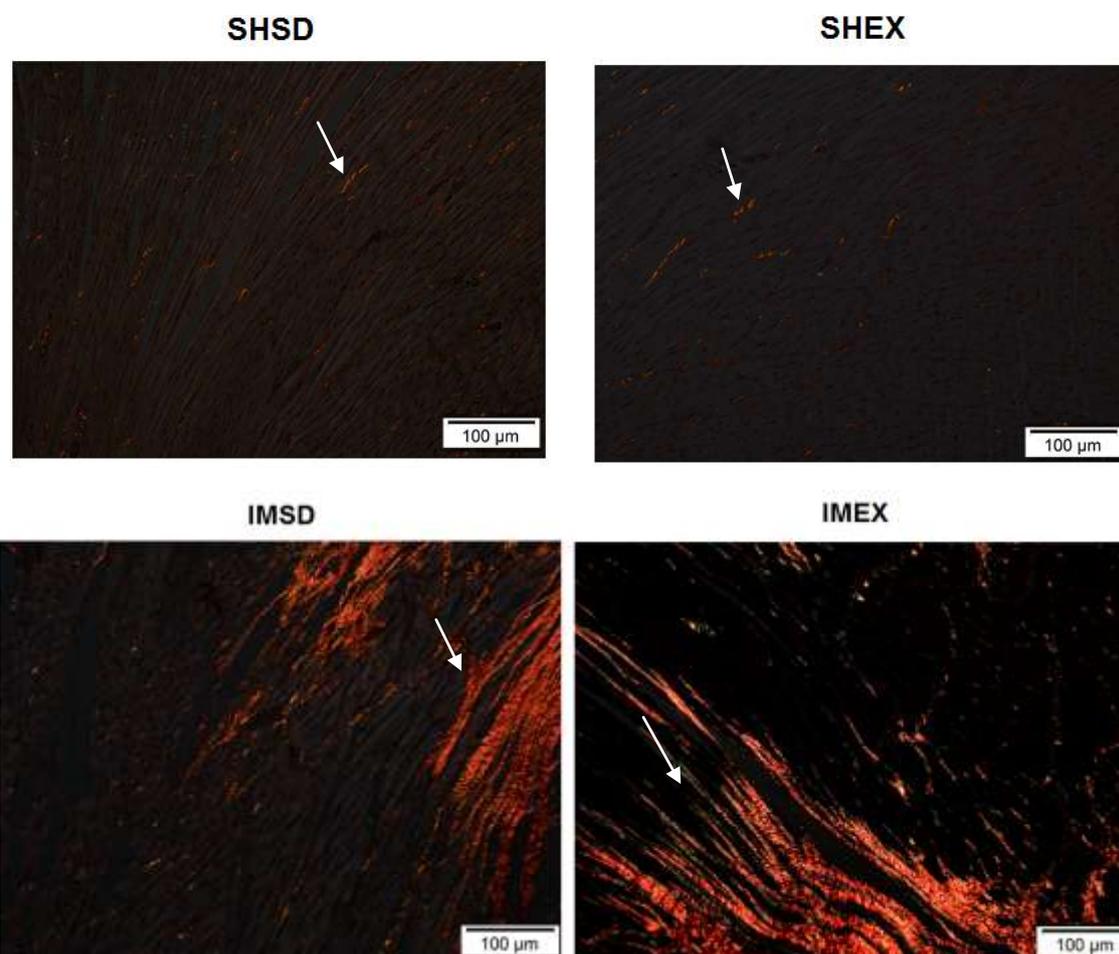
O grupo IM apresentou maior quantidade de colágeno tipo I na região remanescente do VE em comparação com o grupo SHAM. Entretanto, em relação às regiões livres do infarto VD e SI, o conteúdo de colágeno tipo I não foi diferente entre os grupos (Tabela 3). O programa de corrida aplicado não alterou a quantidade de colágeno depositada no VE, VD e SI dos animais infartados (IMEX vs. IMSD).

Tabela 3. Quantidade de colágeno tipo I no miocárdio.

Áreas	SHSD (n=5)	SHEX (n=5)	IMSD (n=5)	IMEX (n=5)
VE (%)	0,48 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	11,2 $\pm$ 4,1 <sup>b</sup>	10,8 $\pm$ 6,6 <sup>b</sup>
VD (%)	0,38 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
SI (%)	0,33 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,29 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>

Controle sedentário (SHSD), Controle exercitado (SHEX), Infartado sedentário (IMSD), Infartado exercitado (IMEX), ventrículo esquerdo (VE), Ventrículo direito (VD), Septo interventricular (SI), n = número de animais. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A figura 7 apresenta o VE de todos os grupos experimentais corados com *picrossírius red* e demonstra o colágeno tipo I em tons de vermelho alaranjado.



**Figura 7.** Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo corados com *picrossírius red*. A região infartada apresenta-se corada em vermelho. O fundo escuro compreende regiões de músculo cardíaco e áreas intersticiais não ocupadas pelo colágeno. Setas brancas indicam colágeno tipo I. SHSD, controle sedentário. SHEX controle exercitado. IMSD, infartado sedentário. IMEX, infartado exercitado.

#### 5.4. Eletrocardiograma

O infarto do miocárdio foi considerado bem sucedido após identificação da elevação dos segmentos ST no eletrocardiograma de superfície (Figura 8) e visualização do empalidecimento da região do miocárdio acometida.



**Figura 8.** Esquema representativo do eletrocardiograma. (A) animal SHAM e (B) animal IM na derivação DII.

Adicionalmente verificou-se prolongamento dos intervalos QT, QTc e da onda T, aumento na amplitude das ondas Q e T, e redução da amplitude da onda S, evidenciando as alterações desencadeadas pelo IM (tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia de indução do IM.

Parâmetros	Antes da cirurgia (Basal)	Imediatamente após IM
Intervalo RR (ms)	143,9 ± 13,4	147,7 ± 11,8
Intervalo PR (ms)	50,4 ± 5,1	48,9 ± 4,9
Onda P (ms)	18,3 ± 4,7	17,1 ± 5,6
Complexo QRS (ms)	14,0 ± 2,7	14,5 ± 4,0
Intervalo QT (ms)	59,1 ± 12,2	67,6 ± 14,2*
Intervalo QTc <sub>(Bazett)</sub> (ms)	156,4 ± 33,2	175,8 ± 35,8*
Onda T (ms)	31,9 ± 12,8	36,2 ± 14,1*
Amplitude P (mV)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Amplitude Q (mV)	-0,02 ± 0,0	-0,03 ± 0,0*
Amplitude R (mV)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Amplitude S (mV)	-0,3 ± 0,1	-0,2 ± 0,2*
Segmento ST (mV)	0,07 ± 0,0	0,10 ± 0,1*
Amplitude T (mV)	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1*

Os dados são expressos em média ± DP de 43 animais. \* diferente de Basal, p < 0,05.

Entretanto, ao final do programa de corrida, não foram encontradas diferenças nos mesmos parâmetros avaliados (tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros eletrocardiográficos dos animais com IM antes e após o programa de corrida.

Parâmetros	IMSD (n=5)	IMEX (n=5)
Intervalo RR (ms)	161,0 ± 17,7	148,0 ± 15,2
Intervalo PR (ms)	52,0 ± 2,6	53,7 ± 6,5
Onda P (ms)	19,0 ± 1,7	19,4 ± 2,5
Complexo QRS (ms)	18,3 ± 3,5	14,9 ± 3,8
Intervalo QT (ms)	57,8 ± 6,9	44,2 ± 8,9
Intervalo QTc <sub>(Bazett)</sub> (ms)	115,0 ± 37,8	114,6 ± 67,4
Onda T (ms)	21,0 ± 18,2	19,6 ± 22,0
Amplitude P (mV)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Amplitude Q (mV)	-0,01 ± 0,0	-0,05 ± 0,0
Amplitude R (mV)	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Amplitude S (mV)	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,1
Segmento ST (mV)	0,02 ± 0,0	-0,001 ± 0,0
Amplitude T (mV)	0,07 ± 0,0	0,05 ± 0,0

Os dados são expressos em média ± DP. IMSD, Infartado Sedentário; IMEX, Infartado Exercitado.

### 5.5. Função cardíaca

A tabela 6 apresenta os parâmetros hemodinâmicos analisados ao final do protocolo experimental.

Os animais do grupo IMEX exibiram redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores da frequência cardíaca (FC) em relação aos animais dos grupos IMSD, mas não foi diferente do grupo SHEX. A FC dos animais IMSD e SHSD não foram diferentes entre si. Entre os animais Sham, os exercitados apresentam menores valores de FC ( $p < 0,05$ ). Isso indica que o treinamento físico foi benéfico, pois a FC dos animais IM exercitados apresentou valores similares ao grupo Sham exercitado. Além disso, o treinamento físico também reduziu a FC nos animais Sham exercitados.

Tabela 6. Parâmetros hemodinâmicos dos animais.

Parâmetros	SHSD (n=5)	SHEX (n=5)	IMSD (n=5)	IMEX (n=5)
FC (bpm)	375 ± 6	348 ± 6 <sup>b</sup>	372 ± 6	343 ± 6 <sup>a</sup>
PSVE (mmHg)	92 ± 12	106 ± 5	67 ± 9 <sup>*b</sup>	86 ± 11 <sup>*a#</sup>
PDFVE(mmHg)	14 ± 1	9 ± 2	23 ± 13 <sup>*</sup>	16 ± 2 <sup>*</sup>
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	2780 ± 173	3508 ± 594	1812 ± 1075 <sup>*</sup>	2530 ± 827 <sup>*</sup>
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-2178 ± 57	-2461 ± 267	-1450 ± 819 <sup>b</sup>	-2601 ± 628 <sup>a</sup>

Controle sedentário (SHSD), Controle exercitado (SHEX), Infartado sedentário (IMSD), Infartado exercitado (IMEX), PSVE= pressão sistólica do ventrículo esquerdo, FC= frequência cardíaca; PDFVE= pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; dP/dt<sub>max</sub> = taxa máxima de elevação da pressão; dP/dt<sub>min</sub> = taxa mínima de declínio de pressão. bpm= batimentos por minuto. n = numero de animais. \* p< 0,05 vs. Sham. <sup>a</sup> p< 0,05 vs. IMSD; <sup>#</sup> p< 0,05 vs. SHEX. <sup>b</sup> p< 0,05 vs. SHSD. ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A PSVE foi menor para os grupos com IM (IMEX e IMSD) (p<0,05) do que para os animais sham (SHEX e SHSD). O programa de corrida aumentou a PSVE dos animais IM exercitados (p<0,05) em relação aos animais IM sedentários. Entretanto, dentre os animais exercitados (IMEX vs SHEX), o grupo infartado apresentou menor PSVE que o grupo sham (p<0,05). O mesmo ocorreu ao se comparar os animais não exercitados (SHSD vs. IMSD).

Em relação à dP/dt<sub>máx</sub>, ao se comparar os grupos IM vs SH, os animais IM (IMSD e IMEX) apresentaram médias menores (p<0,05) que os ratos dos grupos SH (SHSD e SHEX). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos IM (IMEX vs. IMSD) e entre os grupos SH (SHEX vs. SHSD) para este parâmetro.

Os animais com IM (IMEX e IMSD) mostraram maiores valores de PDFVE em comparação aos animais SH (SHSD e SHEX). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos IM (IMEX vs. IMSD) para este parâmetro.

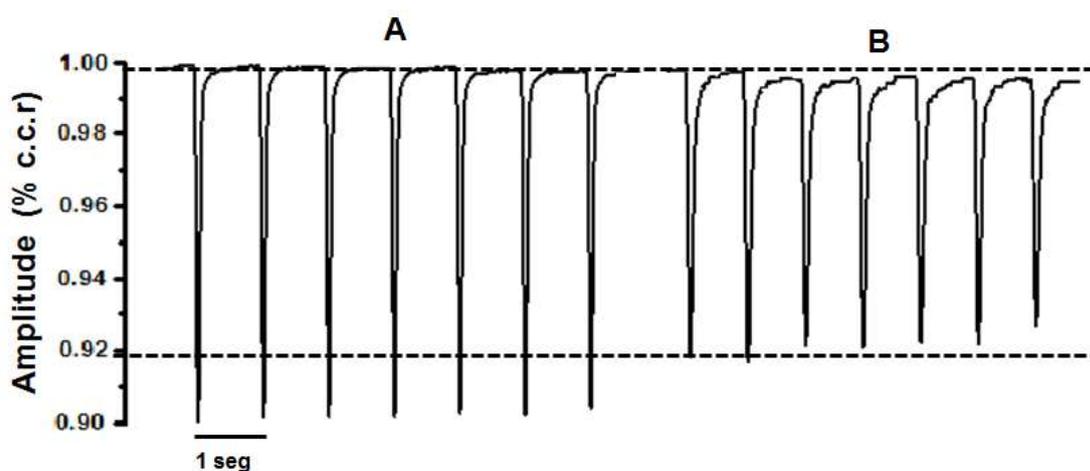
Com relação à dP/dt<sub>mín</sub>, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos (IM vs SH). Entretanto, os animais IMSD apresentaram maiores valores (p<0,05) em relação aos animais SHSD. Os animais IMEX apresentaram menores valores (p<0,05) que os animais IMSD. Porém, não houve diferença estatística entre os animais exercitados (IMEX vs. SHEX). Da

mesma forma, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos SH (SHEX e SHSD).

## 5.6. Avaliação das propriedades mecânicas dos cardiomiócitos

### 5.6.1. Amplitude de contração celular e tempo para o pico de contração e relaxamento celular

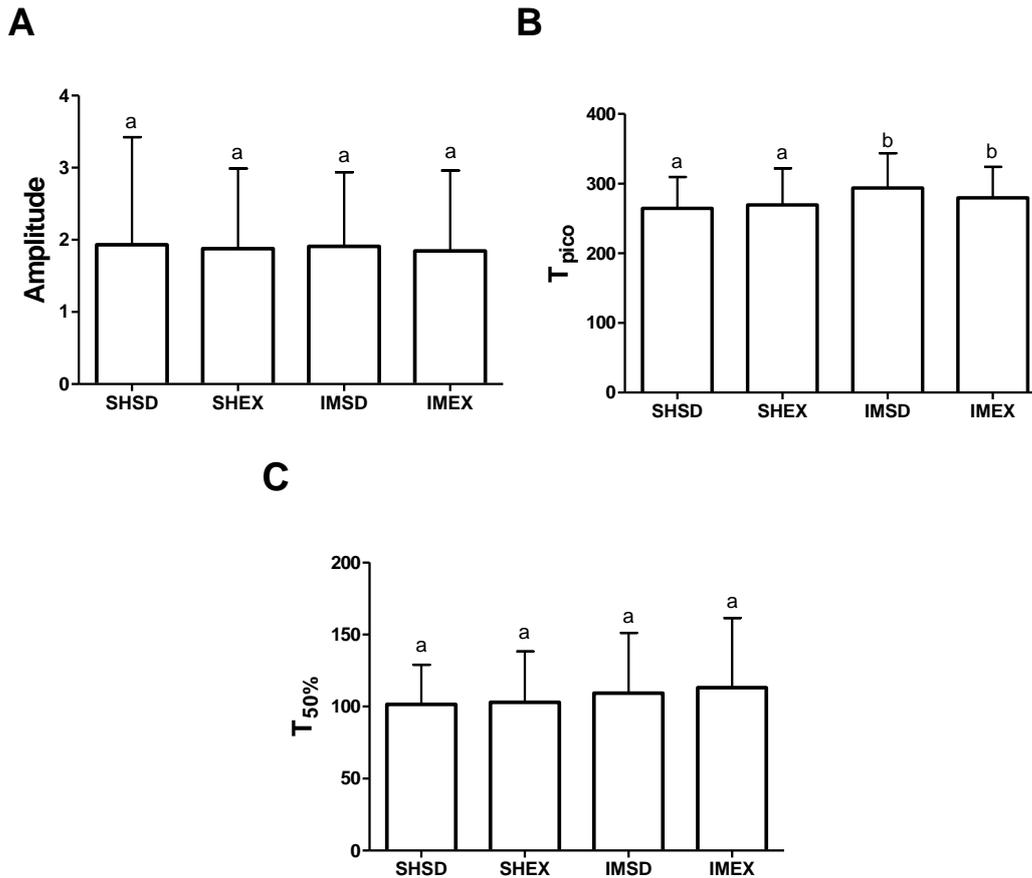
A figura 9 representa traçados típicos de contração dos cardiomiócitos de animais Sham e IM.



**Figura 9.** Traçados representativos da contração de cardiomiócitos. (A) animal SHAM e (B) animal IM. (% c.c.r: **porcentagem de encurtamento celular em repouso**).

A Figura 10 apresenta a amplitude de contração, o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% de relaxamento de miócitos isolados do ventrículo esquerdo.

Verificou-se que a amplitude de contração dos cardiomiócitos não foi significativamente diferente entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 10 A). Tanto o IM quanto o programa de corrida não afetaram a amplitude de contração celular.



**Figura 10.** Propriedades mecânicas dos cardiomiócitos. **(A) Amplitude: porcentagem de encurtamento celular em repouso.** (B) T<sub>pico</sub>: Tempo para o pico de contração. (C) T<sub>50%</sub>: Tempo para 50% de relaxamento (ms). SHSD, Sham sedentário (n= 66 células); SHEX, Sham exercitado (n= 57 células); IMSD, Infartado Sedentário (n= 56 células); IMEX, Infartado Exercitado (n= 64 células), Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Dunn, p<0,05.

Todavia, os animais com IM (IMSD e IMEX) apresentaram aumento significativo no tempo para o pico de contração, se comparados aos animais Sham (SHSD e SHEX) (Figura 10 B). Entre os animais com IM, todavia, o programa de corrida não alterou o tempo para o pico de contração (IMEX vs. IMSD). Da mesma forma, entre os animais Sham, o programa de corrida não alterou o tempo para o pico de contração (SHSD vs. SHEX).

O tempo para 50% de relaxamento não foi diferente entre os grupos (p>0,05). Tanto o IM quanto o programa de corrida não afetaram o tempo para 50% de relaxamento (Figura 10 C).

## 6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após a cirurgia isquêmica, sobre a estrutura e função do miocárdio e cardiomiócitos de ratos submetidos ao IM experimental. Os resultados evidenciaram dano e funcional nos ratos submetidos à cirurgia de oclusão coronária. Os ratos com IM apresentaram menor capacidade ao esforço físico demonstrado pelo TTF. Além disso, foi observado aumento no teor de água nos pulmões, aumento na massa e volume cardíaco, hipertrofia do cardiomiócito e maior deposição de tecido fibroso cardíaco. *In vivo*, a avaliação funcional hemodinâmica demonstrou redução da PSVE e na  $dP/dt_{máx}$  e elevação da PDFVE e na  $dP/dt_{min}$ . *In vitro*, a avaliação do cardiomiócito isolado mostrou aumento no tempo para o pico da contração celular, apesar de não alterar a amplitude de contração e o tempo de relaxamento dos miócitos cardíacos.

No entanto, os resultados mais importantes deste estudo foram os benefícios do protocolo de treinamento físico aeróbico utilizado. O exercício físico em esteira rolante de baixa intensidade iniciado 24 horas após o IM não comprometeu a sobrevivência. Além disso, o treinamento físico aumentou a capacidade ao esforço físico, não agravou o processo de remodelamento cardíaco, reduziu a FC de repouso, aumentou a PSVE e atenuou a  $dP/dt_{min}$  dos animais IM exercitados.

### 6.1. Mortalidade/sobrevivência

No presente estudo, a média de mortalidade verificada após a cirurgia de indução do IM situou-se em 29,7%. Esta taxa situa-se bem abaixo do que se encontra frequentemente na literatura, entre 40% e 60% nas primeiras 24 horas após a oclusão coronária (Zornoff et al., 2009). Entre as causas de morte nesse período destacam-se fatores relacionados ao procedimento cirúrgico, como pneumotórax e depressão respiratória (Pfeffer et al., 1979; Litwin, 1995) e a alta prevalência de arritmias malignas (Opitz et al., 1995). Em relação ao período crônico pós-IM, a mortalidade encontrada nesse modelo é extremamente variável, sendo que o principal determinante desse evento é o tamanho do infarto (Pfeffer et al., 1985).

A relativa baixa mortalidade encontrada no atual estudo pode ser atribuída aos cuidados para prevenir o pneumotórax, à idade (30 dias), o peso corporal ( $135 \pm 19,76$  g), ao bom estado de saúde dos animais e finalmente, à intensificação dos cuidados pós-operatórios.

Neste estudo, não houve óbitos no grupo de animais que foram submetidos ao exercício físico 24 horas após o IM e durante o programa de corrida aplicado por 5 semanas. Diferente destes achados, Gaudron et al. (1994) relataram que a taxa de mortalidade aumentou entre os ratos com grandes infartos e submetidos ao treinamento de natação vigoroso (90 min/dia, 6 dias/semana, durante 8 semanas) iniciado 4 dias após a cirurgia isquêmica. Os dados do presente estudo estão de acordo com os do estudo de Waard et al. (2007) e confirmam que o exercício físico iniciado 24 horas após o IM não compromete a sobrevivência após o IM.

Por outro lado, Jorge et al. (2011) reportaram que o treinamento físico de baixa intensidade (60 min, 50–70%  $VO_{2max}$ , 12 semanas) em esteira rolante iniciado 7 dias após o IM, aumentou a sobrevivência dos animais IM. Estes autores mostraram que o efeito benéfico do treinamento físico está associado ao controle neural do sistema cardiovascular, em que a redução no efluxo simpático e consequente restauração do balanço simpático-vagal contribuem diretamente para a redução da morbidade e mortalidade nos animais IM exercitados.

Além disso, tem sido proposto que o aumento na mortalidade no estudo de Gaudron et al. (1994) poderia ser atribuída pelos efeitos do treinamento com natação. Esta modalidade é conhecida por ter respostas diferentes daqueles da esteira rolante, complicado por fatores como o reflexo de mergulho, estresse mental e episódios de hipóxia associados ao mergulho (Lundeberg et al., 1998; Ait Mou et al., 2008).

Em humanos, a reabilitação de pacientes na fase aguda do IM com mobilização precoce visa reduzir os efeitos prejudiciais do repouso prolongado e diminuir a permanência hospitalar. Em longo prazo, os benefícios incluem diminuição das re-internações, melhorias no desempenho cardíaco, tolerância aos esforços e na qualidade de vida, e reduz a morbidade e mortalidade dos pacientes em todas as fases da doença (Paffenbarger et al., 1993, Blair et al., 1995, Belardinelli et al., 1999, Jolliffe et al. 2001; Silva et al., 2002).

## **6.2. Tolerância ao esforço físico e insuficiência cardíaca**

Na tentativa de verificar o estabelecimento da insuficiência cardíaca nos animais com IM, avaliou-se previamente a intolerância ao esforço físico por meio do teste de capacidade máxima ao esforço. Assim como em outros estudos (Bayat et al., 2002; Trueblood et al., 2005), os animais dos grupos IM apresentaram sinais de fadiga antes dos grupos Sham, evidenciada pela diminuição no TTF.

Em pacientes com IM, a intolerância ao exercício é uma manifestação clínica comum e se correlaciona com o grau de disfunção cardíaca e a severidade da doença (Jikuhara et al., 1997; Negrão & Middlekauff, 2008).

Da mesma forma, em modelo experimental de IM, a redução na capacidade funcional ao exercício físico também está relacionada com a severidade da disfunção ventricular pós-infarto. Essa disfunção, dependendo da área do VE lesado (tamanho do infarto), pode induzir redução no débito cardíaco (DC) e promover uma diminuição no fluxo de sangue para os músculos esqueléticos envolvidos no exercício, antecedendo o aparecimento da fadiga (Musch et al., 1992; Rolim et al., 2006).

Por outro lado, o teste de capacidade máxima realizado ao final do protocolo experimental, mostrou que o programa de corrida em esteira empregado promoveu benefícios aos animais exercitados. Como esperado, entre os animais Sham, os exercitados exibiram aumento de 70% no TTF em relação aos seus controles. Nos animais com IM exercitados este aumento foi de 88% em relação aos animais com IM sedentários. O aumento no TTF nos animais com e sem IM submetidos ao programa de corrida indica melhora na tolerância ao exercício físico, assim como a efetividade do programa de treinamento aplicado. Sugere-se que o aumento no TTF nos grupos treinados no presente estudo pode estar associado à normalização no DC e/ou nos fluxos sanguíneos regionais.

O protocolo de esforço físico utilizado neste estudo apresenta correlação significativa com a medida direta do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) em ratos, conforme evidenciado por Prímola-Gomes et al. (2009). Dessa forma, a melhora na capacidade máxima de exercício observada no presente estudo sugere uma evolução na capacidade aeróbica desses animais.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos em que o exercício físico aeróbico de baixa a moderada intensidade aumenta a capacidade aeróbica e a tolerância ao esforço em humanos pós-IM (Belardinelli et al., 1999; Silva et al., 2002) e em modelo experimental de IM (Rondon et al., 2006; Zanchi et al., 2008; Jorge et al., 2011).

Vale destacar que o aumento da tolerância à realização do exercício físico não depende exclusivamente da melhora da função cardíaca, mas da associação de um melhor desempenho cardíaco com adaptações benéficas em alvos não cardíacos. Essas adaptações incluem melhoria na resposta vasodilatadora no endotélio vascular, na normalização do débito cardíaco e na resposta ventilatória, assim como modificações na musculatura esquelética (Pina et al., 2004, Jorge et al., 2011).

A redução da capacidade para realizar exercícios em pacientes IM também está diretamente relacionada com as alterações pulmonares decorrentes da congestão pulmonar: fadiga associada ao edema, e dispneia, que conduz a prejuízo nas trocas gasosas (Remo et al., 2005; Figueroa et al., 2006).

De fato, a formação de edema pulmonar é outro fator que acompanha a progressão da disfunção ventricular. Este sintoma clínico, presente tanto em humanos (Remo et al., 2005; Figueroa et al., 2006), quanto em modelos experimentais de IM (Portes e Tucci., 2006; Portes et al., 2009; Tucci, 2011) reflete o acúmulo de líquido nos pulmões como consequência da incapacidade do VE em bombear quantidades adequadas de sangue para o resto do corpo. Em geral, quando o VE falha, ocorre obstrução do retorno venoso, provocando acúmulo de sangue nos vasos pulmonares. O aumento da pressão venosa pulmonar favorece o extravasamento de água do sangue, que se acumula principalmente dentro dos alvéolos (Figueroa et al., 2006). No presente estudo, observou-se que os animais com IM apresentaram maior teor de água nos pulmões e o treinamento físico iniciado precocemente ao IM, durante 5 semanas, não foi capaz de atenuar o acúmulo deste líquido nos pulmões. Deste modo, considera-se que os animais utilizados em nosso estudo apresentaram sinais de insuficiência cardíaca secundária ao IM e que o período de treinamento físico foi insuficiente para influenciar positivamente este parâmetro.

Até o presente momento, não é de conhecimento do autor estudos que relatam a interação entre ratos com IM, exercício físico logo após o IM, e teor de água nos pulmões. Todavia, Portes e Tucci (2006) e Portes et al. (2009) avaliaram o treinamento físico em natação iniciado 3 e 4 semanas após o IM em ratos, por 8 semanas, respectivamente. Porém, em ambos, o treinamento mostrou-se benéfico na atenuação do teor de água pulmonar apenas nos ratos com grandes infartos.

Após o IM, a perda progressiva de cardiomiócitos e, conseqüentemente, a sua substituição por tecido fibroso torna esta região eletricamente inativa (Miranda et al., 2007; Xu et al., 2008). A causa mais comum de mortalidade em pacientes após IM é a morte súbita cardíaca devido a eventos arrítmicos (Kalapura et al., 2003).

As características eletrocardiográficas do IM são bem definidas em humanos. Na prática clínica hospitalar, o exame eletrocardiográfico (ECG) de superfície (ECG padrão de 12 derivações) é o centro do processo decisório inicial em pacientes com suspeita de infarto. Além dos sintomas sugestivos (dor torácica) alterações como supradesnivelamento do segmento ST e aparecimento de uma nova onda Q são indicativos para o diagnóstico de IM (Piegas et al., 2009). O ECG é também comumente utilizado na monitoração do teste ergométrico de esforço para identificar arritmias desenvolvidas ao esforço físico e prognosticar doença arterial coronária.

No atual estudo, as alterações eletrocardiográficas no grupo infartado foram evidentes após a cirurgia de oclusão da ACADE. Nossos dados estão de acordo com outros estudos em que apontam o eletrocardiograma (ECG) como um método não invasivo capaz de identificar a presença do IM após a oclusão da artéria coronária (Miranda et al., 2007; Tucci, 2011; Pimentel et al., 2012).

Entretanto, ao final do protocolo experimental, não foram encontradas diferenças entre os animais IM sedentários e exercitados nos mesmos parâmetros avaliados. Isso pode ser explicado, em parte, pela diferença no número de animais utilizado no início (n=43) e ao final (n=5) do período experimental. O ECG sem alterações não exclui, contudo, a presença do IM, que foi confirmado pela histologia desses mesmos animais. Portanto, embora o eletrocardiograma identifique a presença da zona inativa dependente do IM, o

ECG não é o melhor método para quantificá-la (Miranda et al., 2007, Tucci, 2011).

Para um programa de reabilitação com exercícios físicos após o IM, o ECG é uma das variáveis utilizadas para estratificação de risco. Por exemplo, pacientes que sofreram infarto e após um período de recuperação apresentam ECG sugestivo de uma nova isquemia, são contraindicados a iniciarem um programa de reabilitação cardíaca com exercícios físicos (Piegas et al., 2004; 2009; Leite et al., 2008; Hiss et al., 2012).

Por outro lado, estudo clínico mostrou que em pacientes estáveis pós-IM, o programa de reabilitação com treinamento físico aeróbico (8 semanas após o IM, por 12 semanas) reduziu de maneira significativa a dispersão do intervalo QT e JT, e da frequência cardíaca, corrigindo estes índices. De acordo com Kalapura et al. (2003), estes resultados evidenciaram que reabilitação com treinamento físico após o IM pode reduzir os riscos subsequentes de arritmias ventriculares e morte cardíaca súbita.

### **6.3. Remodelamento cardíaco**

Em relação ao remodelamento cardíaco e ao tamanho da lesão isquêmica, sabe-se que na medida em que o IM progride, importantes alterações como, perda de tecido contrátil, expansão do infarto, maior deposição de colágeno, aumento da massa cardíaca, hipertrofia e dilatação ventricular, contribuem para o estabelecimento da disfunção ventricular (Pfeffer et al., 1985, Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000; Zornoff et al., 1997; Xu et al., 2008).

Na literatura, o IM tem sua severidade caracterizada de acordo com seu tamanho: inferiores a 20% do VE – pequenos; de 20-39% - moderados; maiores que 40% - grandes (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991; Portes e Tucci, 2006). Apesar de a remodelação incidir em diferentes tamanhos de lesão isquêmica, sua predominância é observada em infartos de maior tamanho. Da mesma maneira, parece haver, como pré-requisito, tamanho mínimo de lesão (16%-20%) para que ocorra a remodelação (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991; Zornoff et al., 2009). No presente estudo, observou-se que o tamanho do infarto nos animais submetidos à ligadura da

coronária foi em torno de 36% do VE, o que consolida a ideia de existir a disfunção ventricular.

Os efeitos do treinamento físico aeróbico iniciado nos primeiros estágios da cicatrização pós IM sobre o tamanho do infarto e a remodelação cardíaca ainda são controversos. Estudos prévios (Kloner e Kloner, 1983; Hammerman et al., 1983) demonstraram que o treinamento físico em natação iniciado 24 horas após o IM em ratos Wistar (45 min/dia) durante 7 dias, não alterou o tamanho do infarto, porém, nestes estudos, foi relatado maior adelgaçamento e distensão da região cicatricial, ou seja, expansão da área infartada.

Em contraste, o treinamento físico em esteira rolante de intensidade moderada (90 min/dia), iniciado no dia da oclusão coronária, durante 7 dias, em ratas Sprague-Dawley com pequenos infartos (24% do VE), não foi observado nenhum efeito deletério sobre o tamanho, expansão do infarto ou na geometria ventricular (Hochman et al., 1986).

Gaudron et al. (1994), mostraram que o treinamento físico em natação de alta intensidade (90 min/dia, 6 dias/semana) iniciado 4 dias após o IM em ratos Wistar com grandes infartos (>35% do VE), durante 8 semanas, não atenuou o tamanho do infarto, mas mostrou-se agravar o processo de remodelação cardíaca, pois causou dilatação global severa do VE, adelgaçamento da cicatriz e alterações na geometria ventricular, repercutindo desfavoravelmente na sobrevivência destes animais.

Em camundongos, o treinamento físico de corrida voluntária iniciado 24 horas após o IM, durante 8 semanas ( $\pm 4$  milhas/dia) não alterou o tamanho do infarto (de Waard et al., 2007). Da mesma forma, no presente estudo, observou-se que o programa de treinamento aeróbico de baixa intensidade em esteira rolante iniciado 24 horas após o IM, por 5 semanas, não afetou o tamanho do infarto nos animais.

Todavia, estudos recentes demonstraram resultados diferentes. Por exemplo, Rodrigues et al. (2011) relataram que o treinamento físico em natação de curta duração (10 min/dia, durante 7 dias) iniciado 7 dias após o IM em ratos Wistar, não atenuou o processo de remodelamento verificado na fase aguda da lesão isquêmica.

Por outro lado, Wu et al. (2009) relataram que o treinamento físico de alta intensidade em esteira rolante, iniciado 24 horas após o IM em

camundongos (12 m/min, 10° inclinação, 60 min/dia) e realizado durante 3 dias foi suficiente para reduzir o tamanho do infarto ( $18\pm 3\%$ ) em relação ao grupo IM sedentário ( $29\pm 7\%$ ).

Adicionalmente, Jorge et al. (2011) reportaram que o treinamento físico de baixa intensidade em esteira rolante (60 min, 50–70%  $VO_{2max}$ ) iniciado 7 dias após o IM em ratos Wistar com infartos moderados ( $34\pm 5\%$ ), durante 90 dias, reduziu o tamanho do infarto ( $19\pm 6\%$ ). Estes estudos sugerem que a melhoria no fluxo coronário bem como a elevação dos níveis proteicos e do mRNA de VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) promovidos pelo treinamento físico aeróbico são os possíveis mecanismos responsáveis pela redução no tamanho do IM.

Portanto, parece que as características inerentes ao modelo animal, o tamanho do infarto, a modalidade, intensidade, tempo e duração do treinamento físico são fatores capazes de modular os efeitos do treinamento físico sobre o tamanho e a expansão do infarto.

As mudanças estruturais no VE não estão restritas à área infartada, mas também às áreas remanescentes ao IM. Miócitos cardíacos, fibroblastos, e matriz extracelular desempenham papéis críticos durante o processo de remodelação cardíaca. De forma geral, esse processo tem como objetivo substituir os cardiomiócitos mortos por uma cicatriz constituída basicamente de colágeno (Xu et al., 2008). Após o IM ocorre ativação das MMPs, enzimas responsáveis pela degradação do colágeno. Essas enzimas são reguladas pelas TIMPs, os quais inibem sua atividade, permitindo o acúmulo de colágeno no miocárdio.

No presente estudo, a medida do conteúdo de colágeno intersticial do VE mostrou aumento de colágeno tipo I nas áreas remotas ao infarto. Esse quadro reflete a progressão da disfunção ventricular, uma vez que o processo de remodelação cardíaca caracteriza-se principalmente pelo acúmulo excessivo de colágeno tipo I na região não infartada. Essa fibrose reativa é responsável pela rigidez tecidual e por interrupção das propriedades elétricas e mecânicas do coração, o que conduz a falha cardíaca (Xu et al., 2008).

Por outro lado, o programa de corrida aplicado no presente estudo, iniciado 24 horas após IM, não foi capaz de reduzir a quantidade de colágeno tipo I intersticial no VE dos animais com IM. Em contraste ao que foi observado

aqui, de Waard et al. (2007) reportaram que o treinamento físico com corrida voluntária, iniciado 24 horas após a indução do IM e realizado por 8 semanas, foi efetivo em reduzir a fração de colágeno nas áreas remotas ao IM em camundongos.

A diminuição da deposição de colágeno em animais IM promovida pelo exercício físico parece estar relacionada com o melhor balanço entre síntese e degradação da MEC e com a inibição de componentes do sistema renina-angiotensina (Xu et al., 2008; 2008a). Xu et al. (2008) relataram que o treinamento físico em esteira (16 m/min, 5º inc., 50 min/dia) iniciado 1 semana após o IM e realizado por 8 semanas reduziu a fibrose tecidual no miocárdio de ratos. Esses autores evidenciaram que os ratos com IM treinados apresentaram diminuição na concentração de TIMP-1, o que resultou em maior atividade das MMPs e aumento da degradação do colágeno.

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) também é um fator importante após o IM. A atividade da ECA aumenta no tecido cicatricial e conduz a um aumento nas concentrações de Angiotensina II (Busatto et al., 1997; Resende e Mill., 2002). Em outro estudo, Xu et al. (2008a) mostraram que ratos IM exercitados 1 semana após o IM (16 m/min, 5º inc., 50 min/dia) durante 8 semanas apresentaram redução na concentração de receptores de AT1 e de RNAm da ECA em resposta ao treinamento físico, o que atenuou a fibrose.

A divergência entre os resultados deste trabalho e os estudos citados anteriormente pode ser atribuída ao período de duração do programa de treinamento físico aplicado. Os estudos mostraram que o treinamento físico por um período de tempo prolongado foi mais efetivo para a obtenção de benefícios após o IM (de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011). Assim, sugere-se que o período de treinamento físico utilizado no presente estudo (5 semanas) não tenha sido suficiente para atenuar a quantidade de colágeno das áreas remotas do miocárdio de ratos IM exercitados.

Paralelamente à perda de cardiomiócitos, fibrose reativa e formação da cicatriz, ocorre hipertrofia do miócito e distorção da geometria ventricular por sobrecarga de volume da área não infartada (Anversa et al., 1985, Anversa et al., 1991). A hipertrofia ventricular apresentada por corações acometidos pelo

IM é de característica excêntrica, e ocorre em contraposição ao aumento do estresse parietal na diástole, uma adaptação que permite a manutenção da função ventricular, mas progressivamente conduz à dilatação ventricular crônica (Zornoff et al., 1997; Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000).

Os dados obtidos no presente estudo referentes ao peso do coração, peso relativo do coração e peso relativo do ventrículo esquerdo sugerem que esta patologia promoveu hipertrofia cardíaca. Entretanto, a complexa interação de eventos, tais como, a reabsorção do tecido necrótico e a quantidade de colágeno da cicatriz, pode interferir no peso do ventrículo infartado de modo a não refletir real crescimento celular (Epifânio et al., 2005; Zornoff et al., 2006; Zornoff et al., 2009). Dessa forma, a medida da área celular transversa tem sido uma ferramenta utilizada para avaliação do grau de hipertrofia do cardiomiócito nesse modelo experimental de IM (Epifânio et al., 2005; Zornoff et al., 2006). De fato, nossos resultados demonstraram aumento na área celular dos cardiomiócitos dos animais IM. Portanto, pode-se considerar que o aumento na área celular associado ao aumento do volume cardíaco, peso do coração, peso relativo do coração e peso relativo do ventrículo esquerdo, evidenciam que o IM promoveu hipertrofia do músculo cardíaco.

Conforme mencionado anteriormente, alguns estudos mostraram que o treinamento físico em natação iniciado precocemente ao IM pode agravar o processo de remodelação cardíaca provocando hipertrofia e dilatação ventricular (Kloner e Kloner, 1983; Gaudron et al., 1994). Todavia, nossos dados estão de acordo com de Waard et al. (2007) em que o programa de corrida em esteira rolante iniciado 24 horas após IM não atenuou mas também não agravou o remodelamento ventricular, pois a hipertrofia do cardiomiócito, o conteúdo de colágeno e o tamanho do infarto não foram alterados nos animais IM exercitados.

Deste modo, a modalidade do treinamento físico pode ser um fator importante sobre a remodelação cardíaca. Conforme citado anteriormente, os treinamentos em esteira e em natação impõem diferentes formas de estresse cardiovascular. A natação é complicada por fatores relacionados ao reflexo de mergulho e episódios de hipóxia, que causam estresse mental e hipóxico no coração (Hochman et al., 1986; Lundeborg et al., 1998; Ait Mou et al., 2008).

Assim como em modelo animal, existem divergências nos resultados de estudos com humanos. Jugdutt et al. (1988) avaliaram por ecocardiograma (ECO) bidimensional pacientes com IM extenso de parede anterior submetidos a um treinamento físico de baixa intensidade (durante 12 semanas), iniciado 3-4 meses após o IM. O treinamento físico levou a dano miocárdial adicional incluindo adelgaçamento de parede, expansão da área do infarto, assinergia e redução adicional da FE.

Por outro lado, Jette et al. (1991) estudaram pacientes com IM anterior extenso, em torno de 3 meses após o IM, por ECO bidimensional. Os pacientes participaram de um programa de reabilitação com exercícios aeróbico (70 a 80% da FC) de pico e duração de 4 semanas. Os resultados mostraram que não houve mudança significativa nos volumes sistólico final e diastólico final, e na FE. Em contrapartida, o treinamento físico aeróbico não ocasionou deterioração adicional da função ventricular esquerda.

Giannuzzi et al. (1997) relataram que em pacientes estáveis pós IM, o treinamento físico aeróbico iniciado 3-4 semanas após o IM (80% da FC pico, 30min/dia) durante 6 meses, não promoveu mudança significativa no volume sistólico e diastólico final, mas aumentou a FE. Ao contrário do grupo não treinado, os pacientes que participaram do programa de treinamento não apresentaram aumento dos volumes ventriculares, sugerindo uma possível atenuação do processo de remodelação cardíaca induzido pelo treinamento físico.

Da mesma forma que os estudos com modelo animal, as divergências nos resultados de estudos com humanos podem ser atribuídas a fatores ligados à heterogeneidade dos pacientes (presença, tipo e severidade do infarto, medicação) e aos diferentes programas de treinamento físico adotado.

#### **6.4. Função cardíaca**

Nossos dados mostraram que os animais com IM apresentaram FC elevada, redução da PSVE e menor  $dP/dt_{\text{máx}}$ , bem como elevação da PDFVE e da  $dP/dt_{\text{min}}$ . Em conjunto os dados indicam disfunção sistólica e diastólica do VE e indicam a efetividade da técnica de infarto experimental usada aqui e serviram como parâmetro de comparação do desempenho cardíaco entre os grupos de estudo.

As consequências hemodinâmicas decorrentes do remodelamento cardíaco em modelo de infarto experimental são conhecidas. Eventos como hipotensão, queda na FE, redução da PSVE,  $dP/dt_{máx}$  e  $dP/dt_{mín}$ , bem como elevação da PDFVE, são achados constantes neste modelo (Fletcher et al., 1981; Pfeffer et al., 1991; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011).

Alguns autores sugerem que a morte de tecido cardíaco e o acúmulo de tecido fibroso no miocárdio sobrevivente causado pelo IM contribuem para a disfunção sistólica e diastólica do VE (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991; Xu et al., 2008, Jorge et al., 2011). De fato, a disfunção ventricular esquerda observada nos animais IM do presente estudo pode ser consequência da perda de tecido cardíaco decorrente do processo isquêmico, visto que ao final do período experimental a dimensão do infarto foi em torno de 35% do VE. Conforme mencionado anteriormente, além da formação de uma cicatriz na região infartada, há um aumento na deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente, o que torna o músculo cardíaco mais rígido e resistente ao estiramento. Além disso, a disfunção contrátil pós-IM tem sido associada à disfunção autonômica cardiovascular (Jorge et al., 2011).

Estudos anteriores demonstraram que o treinamento físico iniciado precocemente após o IM promove melhoria na função cardíaca, por meio do aumento da PSVE e na  $dP/dt_{máx}$ , FE e fração de encurtamento em modelo experimental de IM (de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011). De fato, observou-se no presente estudo que o programa de corrida atenuou os efeitos deletérios desta patologia, pois houve redução da FC, aumento da PSVE e melhoria do índice de relaxamento ( $dP/dt_{mín}$ ) do VE dos animais com IM exercitados.

Neste sentido, similar aos achados do presente estudo, Jorge et al. (2011) reportaram que o treinamento físico em esteira (60 min, 50–70%  $VO_{2max}$ ) iniciado uma semana após o IM, por 12 semanas, normalizou a função sistólica e diastólica no miocárdio de ratos com IM. Estes autores demonstraram que o programa de treinamento físico reduziu a resistência vascular periférica bem como restaurou o controle autonômico cardiovascular e estes fatores contribuíram diretamente para a melhoria na função cardíaca.

Sugere-se que a redução da FC de repouso dos animais exercitados (IM e SH) do presente estudo, pode estar associada à melhoria no controle autonômico nos animais IM exercitados e comprova o benefício do programa de exercícios físicos nos animais normais. Além disso, supõe-se que a melhoria na função cardíaca pode ser o ponto chave para explicar a melhora na capacidade ao esforço físico observada nos animais estudados.

Em uma recente meta-análise envolvendo 1029 estudos, foram selecionados 12 estudos caracterizados por pacientes com IM recente ( $\leq 3$  meses), clinicamente estáveis e que utilizaram programa de treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade. A meta-regressão identificou que quanto menor o tempo de início e mais prolongado o programa de treinamento após o IM, maiores são os efeitos benéficos sobre a fração de ejeção, volume sistólico final e volume diastólico final. Com base nestes estudos, foi concluído que o treinamento físico tem efeito benéfico sobre a função e remodelação cardíaca e os maiores benefícios são observados quando o programa de exercícios é iniciado por volta de 1 semana após o IM e se estende por período de tempo superior a 3 meses (Haykowsky et al., 2011).

### **6.5. Função contrátil dos cardiomiócitos**

Estudos com modelo de IM experimental demonstraram que a disfunção ventricular está associada com o comprometimento da capacidade contrátil intrínseca do miocárdio (Holt et al. 1998; Zhang et al., 2000a; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007, Bito et al., 2010). Neste sentido, no presente estudo, observou-se que o IM causou prolongamento no tempo para o pico contração celular, apesar de não alterar a amplitude de contração e o tempo para 50% de relaxamento dos miócitos cardíacos.

O aumento no tempo para o pico de contração observado nos cardiomiócitos dos animais com IM, em relação ao sham, indica que o IM prejudicou a mecânica de contração do VE. De fato, este aumento no tempo para o pico de contração pode explicar, pelo menos em parte, alterações observadas *in vivo* já citadas neste estudo, tais como a redução na pressão sistólica e no índice de contratilidade ( $dP/dt_{m\acute{a}x}$ ) do VE dos animais infartados.

Achados similares foram apresentados por Holt et al. (1998) em cardiomiócitos de ratos 6 semanas após o IM. Da mesma forma, Loennechen

et al. (2002) reportaram que o tempo para o pico de contração celular dos miócitos isolados do VE estava aumentado na primeira e quarta semanas após o IM. Em contrapartida, Wisloff et al. (2002), reportaram que o tempo para o pico de contração não foi alterado na oitava semana após o IM em ratos. Bito et al. (2010) também reportam que o tempo para o pico de contração de miócitos cardíacos de camundongos estava inalterado 8 semanas após o IM.

A alteração no tempo para o pico de contração nos miócitos dos animais IM pode estar relacionada com alterações na disponibilidade de  $Ca^{+2}$  durante o acoplamento excitação-contração. Alguns autores observaram redução da expressão das proteínas regulatórias importantes no influxo de  $Ca^{+2}$  para o citosol, como os  $RyR_2$  presentes na membrana do RS (Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007). Apesar destes parâmetros não terem sido mensurados no presente estudo, sabe-se que a redução no influxo de  $Ca^{+2}$  no cardiomiócito diminui a quantidade desse íon disponível para ativar os  $RyR_2$ , o que aumenta o tempo para liberação do  $Ca^{+2}$  do RS e, portanto, aumenta o tempo da contração celular (Bers, 2002).

No presente estudo, a amplitude de contração dos cardiomiócitos não foi afetada pelo IM. Estudos prévios em animais com IM demonstraram que a amplitude de contração celular apresenta resultados contraditórios. Alguns estudos a amplitude de contração inalterada (Cheung et al., 1994; Anand et al., 1997) enquanto em outros mostra-se reduzida (Li et al., 1995; Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010). A redução na amplitude de contração de cardiomiócitos de animais infartados pode ser explicada por alterações no transiente de  $Ca^{+2}$  e na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Holt et al., 1998; Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; Ait Mou et al., 2008).

Alguns estudos prévios reportaram que a amplitude do transiente de  $Ca^{+2}$  estava aumentada em resposta ao IM e este aumento pode estar relacionado com a redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  (Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007). É possível que o aumento no transiente de  $Ca^{+2}$  durante a contração celular funcione como um mecanismo compensatório da perda de sensibilidade dos miofilamentos.

Por outro lado, Holt et al. (1998) demonstraram que a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$  não foi alterada pelo IM e sugerem que a redução da

amplitude de contração em cardiomiócitos de animais IM pode ser devido a uma redução no transiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , ou seja, redução no fluxo de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico durante a contração celular. Sugere-se que a ausência de diferenças na amplitude de contração entre os animais infartados do presente estudo pode estar relacionada com a ausência na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{+2}$ .

O tempo para 50% do relaxamento dos miócitos cardíacos de animais com IM não foi diferente dos Sham no presente estudo. Em contraste, outros estudos mostraram que o tempo para o relaxamento em miócitos cardíacos de animais IM estava aumentado (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002). Entretanto, Anand et al. (1997) e Bito et al. (2010), não encontraram diferenças no tempo de relaxamento dos cardiomiócitos em animais com IM, quando comparados a seus controles Sham.

O tempo de relaxamento dos cardiomiócitos está relacionado à eficiência das vias de remoção do  $\text{Ca}^{+2}$  do citosol. Foi reportado que a captação de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo retículo sarcoplasmático é reduzida nos cardiomiócitos de animais infartados, devido a uma menor atividade da SERCA2 (Mackiewicz et al., 2008). O nível desta proteína também foi menor nesses animais (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007). Além disso, a densidade do NCX foi menor em corações IM. (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007). Apesar destas vias não terem sido mensuradas no presente estudo, parece que o IM não promoveu alterações nas vias de remoção do  $\text{Ca}^{+2}$  do citosol dos miócitos do VE dos animais com IM.

Em relação aos efeitos do treinamento físico iniciado 24 horas após o IM sobre as propriedades mecânicas dos cardiomiócitos, observou-se que o programa de corrida aplicado aqui não alterou a amplitude, o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% de relaxamento celular.

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Bito et al. (2010) que utilizaram outro modelo de exercício, animal e tempo de experimento. Eles mostraram que a corrida voluntária iniciada 24 horas após a indução do IM, com duração de 8 semanas, não foi efetiva em causar alterações nestes mesmos parâmetros em camundongos com IM. Os autores explicam este resultado, pela ausência de diferenças na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Por outro lado, de Waard et al. (2007) mostraram que o treinamento físico com corrida voluntária iniciado 24 horas após a indução do IM em camundongos, por 8 semanas, foi efetivo em reduzir os efeitos desta patologia sobre a amplitude de contração de cardiomiócitos, em comparação aos controles sedentários. Segundo os autores, o efeito benéfico do exercício está associado à recuperação da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$ .

É possível que a intensidade (baixa a moderada) e a duração do treinamento físico aplicado (5 semanas), tenha sido insuficiente para induzir adaptações celulares detectáveis por meio dos métodos de avaliação utilizados *in vitro*.

A intensidade do treinamento utilizada 24 horas após o IM, no presente estudo, foi escolhida com base na observação de que a maioria dos ratos não podiam tolerar maiores velocidades (ou seja, eles exibiram angústia respiratória ou se recusavam a correr). Nosso protocolo foi semelhante à intensidade de treinamento empregada em outros estudos com este modelo experimental de IM, nos quais havia evidências que o treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada foi efetivo induziu melhorias na função cardíaca (Xu et al., 2008; 2008a; Jorge et al., 2011) e na contratilidade de cardiomiócitos (Leosco et al., 2008; Ait Mou et al., 2008). Com relação à duração do treinamento, uma das hipóteses do nosso trabalho era de que o treinamento físico iniciado nos primeiros estágios e realizado até o final do processo de cicatrização (5 semanas), poderia ser suficiente para atenuar as possíveis alterações sobre a contratilidade de cardiomiócitos de ratos IM.

Vale ainda destacar que, alguns autores consideram a possibilidade de haver comprometimento da função sistólica da câmara ventricular mesmo quando o estado inotrópico de fibras miocárdicas encontra-se normal (Stuver et al., 1994; Anand et al., 1997; Chandrashekhar et al., 1999; Anand, 2002; Peron et al., 2006). Estudos prévios verificaram que a contratilidade do miocárdio dos animais infartados não apresentava alterações. Esse fenômeno ocorria apesar da presença de dilatação ventricular esquerda estar acompanhado de sinais de insuficiência cardíaca, como congestão pulmonar. Os autores concluíram que, apesar da capacidade intrínseca do músculo na geração de força ser igual entre os animais com e sem IM, os ratos infartados apresentavam função ventricular reduzida. Desse modo, o próprio processo de remodelamento, pelas

mudanças geométricas ocorridas, poderia comprometer a função global do coração (Anand, 2002; Peron et al., 2006).

## **6.6. Considerações e limitações do estudo**

As diferenças entre os resultados do presente e dos demais estudos podem ser explicadas por variações nas condições experimentais dos diferentes estudos. O modelo animal utilizado, o tamanho do infarto, a seleção dos miócitos de acordo com a região do miocárdio, o tipo de preparo utilizado nos estudos *in vitro* (técnica, temperatura, concentração de cálcio, frequência de estimulação, entre outros) e o tempo decorrido desde a oclusão da artéria coronária, são fatores capazes de modular as alterações estruturais e funcionais acarretadas ao miocárdio remanescente ao IM (Zhang et al., 1999; Peron et al., 2006).

Existem evidências de que o IM de pequenas dimensões acarreta pouca repercussão para o miocárdio e, portanto, em geral, não afetam o inotropismo (Pfeffer et al., 1991; Peron et al., 2006). Uma limitação do presente estudo foi à ausência da análise ecocardiográfica, através da qual seria possível a avaliação do tamanho do infarto. De fato, os animais com IM utilizados para a análise da contratilidade dos cardiomiócitos isolados não foram os mesmos utilizados na análise histológica. Portanto, é possível que estes animais apresentavam infartos pequenos a moderados ou infartos não-transmurais.

Com relação à região do miocárdio de onde os cardiomiócitos foram isolados, ainda existem controvérsias sobre as condições da capacidade contrátil do miocárdio remanescente após o IM. Alguns estudos demonstraram que a amplitude de contração de miócitos isolados da região remota ao infarto mostrou-se reduzida (Holt et al., 1998; Wisloff et al., 2002). Segundo Melillo et al. (1996) e Loennechen et al. (2002), células isoladas de regiões adjacentes ao IM têm capacidade de encurtamento reduzida ao passo que cardiomiócitos provenientes da região distante do infarto mantêm a capacidade de encurtamento normal. No presente estudo, utilizou-se miócitos da região remanescente ao IM. Ou seja, a cicatriz do infarto foi removida e o restante do tecido do VE foi utilizado para o isolamento dos miócitos. De fato, considera-se que este procedimento possa ter contribuído para a grande variabilidade nos dados relativos às propriedades mecânicas dos cardiomiócitos, evidenciada

pelo valor elevado do desvio-padrão em todos os parâmetros analisados *in vitro* (em torno de 38,54% da média).

Por fim, neste trabalho, verificaram-se alguns benefícios do treinamento aeróbico de baixa intensidade com corrida em esteira iniciado 24 horas após o IM experimental, com duração de 5 semanas, sobre as alterações deletérias na função contrátil do miocárdio promovidas pelo IM, o que confirma parcialmente a hipótese do estudo. Porém, os resultados obtidos *in vitro* sobre o remodelamento adverso do miocárdio, assim como sobre a contratilidade dos cardiomiócitos foram inconclusivos. Esses achados são importantes para o entendimento dos benefícios deste tipo de exercício físico para o músculo cardíaco em indivíduos após o infarto do miocárdio. Todavia, sugerem-se novos estudos para que sejam investigados os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de remodelamento do miocárdio pós-infarto nas condições de exercitado e não exercitado.

## **7. Conclusão**

Concluiu-se, com base nos resultados apresentados nestas condições experimentais, que o treinamento aeróbico de baixa intensidade com corrida em esteira iniciado 24 horas após o IM experimental, realizado por 5 semanas: não compromete a sobrevivência; aumenta a tolerância ao esforço físico; não atenua a congestão pulmonar; não altera o tamanho do infarto; não reduz a deposição de colágeno no miocárdio remanescente; não altera a hipertrofia cardíaca; atenua modificações adversas de parâmetros hemodinâmicos; e não afeta as propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados da região remanescente do ventrículo esquerdo.

## 8. Referências Bibliográficas

Ait Mou Y, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischemic heart failure. Cardiovasc Res. 2009; 81(3):555-64.

Ahlers BA, Song J, Wang J, Zhang XQ, Carl LL, Tadros GM, Rothblum LI, Cheung JY. Effects of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>+2</sup> - ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. J Appl Physiol. 2005; 98(6):2169-76.

Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahash AJ, Gupta S, John R, Popescu F, Chandrashekhar Y. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. Circulation. 1997; 96(11):3974-84.

Anand IS. Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction. J Card Fail. 2002; 8 (Suppl): S401-8.

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. Am J Physiol. 1985; 248: H876-82.

Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. Am J Cardiol. 1991; 68:D7-16.

Bayat H, Swaney JS, Ander AN, Dalton N, Kennedy BP, Hammond HK, et al. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. Basic Res Cardiol. 2002; 97(3):206-13.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002; 415 (6868):198-205.

Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G. & Purcaro, A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. Circulation. 1999; 99(9):1173-82.

Bito V, de Waard MC, Biesmans L, Lenaerts I, Ozdemir S, van Deel E, Abdel-Mottaleb Y, Driesen R, Holemans P, Duncker DJ, Sipido KR. Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodelling or hypertrophy. Cardiovasc Res. 2010; 86(1):72-81.

Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. Braz J Med Biol Res 1997; 30:679-687. 28.

Blair, S.N., Kohl, H.W., Barlow, C.E., Paffenbarger, R.S., Gibbons, L.W. & Macera, C.A. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. JAMA. 1995; 273(14):1093-8

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. J Appl Physiol 2003; 95:2510–2518.

Chandrashekhar Y, Prahash AJ, Sen S, Gupta S, Anand IS. Cardiomyocytes from hearts with left ventricular dysfunction after ischemia reperfusion do not manifest contractile abnormalities. J Am Coll Cardiol 1999; 34:594-602.

Cheung, J. Y., T. I. Musch, H. Misawa, A. Semanchick, M. Elensky, R. V. Yelamarty, and R. L. Moore. Impaired cardiac function in rats with healed myocardial infarction: cellular vs. myocardial mechanisms. Am J Physiol. 1994; 266:C29-36.

Chul Kim, M.D., Duk You Kim, M.D., Dong Woo Lee, M.D. The Impact of Early Regular Cardiac Rehabilitation Program on Myocardial Function after Acute Myocardial Infarction. Ann Rehabil Med 2011; 35: 535-540.

Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. J Mol Cell Cardiol 1995; 27:1281–92.

Coats AJ. Exercise training in heart failure. Curr Control Trials Cardiovasc Med. 2000; 1(3): 155–160.

Cohn JN, Johnson GR, Shabetai R, Loeb H, Tristani F, Rector T, Smith R, Fletcher R, for the V-HeFT VA Cooperative Studies Group. Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in HF. Circulation 1993; 87(Suppl. VI):5–16.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling: concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling: behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35(3):569-82.

Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. Heart 2000; 83 : 361 – 6.

de Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. Life Sci 2006; 78 : 3066 – 3073

de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbiens HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers JM, Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. Circ Res. 2007 Apr 13;100(7):1079-88.

Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. Sarcolemmal calcium transport in congestive heart failure due to myocardial infarction in rats. Am J Physiol. 1992; 262:H1387-94

Epifânio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade. Arq Bras Cardiol. 2005; 84(1):10-4.

Factor S, Kirk E. Fisiopatologia da Isquemia miocárdica. In: Hust J, Logue R, Rackley C, editors. O coração: Artéria e veias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p. 627-45.

Faria T de O, Baldo MP, Simões MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. Arch Med Res. 2011; 42(4):274-80.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. Chest. 1978; 73: 843-9.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat. Am J Pathol. 1978b; 90: 57-70.

Fletcher PJ, Pfeffer JA, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction: effects on systolic function. Circ Res. 1981; 49: 618-26.

Gaudron P, Hu K, Schamberger R, Budin M, Walter B, Ertl G. Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. Circulation. 1994; 89:402– 412.

Giannuzzi P, Temporelli PL, Corra` U, Gattone M, Giordano A, Tavazzi L. Attenuation of unfavorable remodeling by exercise training in postinfarction patients with left ventricular dysfunction: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction (ELVD) trial. Circulation 1997; 96:1790–1797.

Gupta S, Prahash AJ, Anand IS. Myocyte contractile function is intact in the postinfarct remodeled rat heart despite molecular alterations. Cardiovasc Res. 2000; 48(1):77-88.

Guo X, Chapman D, Dhalla NS. Partial prevention of changes in SR gene expression in congestive heart failure due to myocardial infarction by enalapril or losartan. Mol Cell Biochem. 2003 Dec;254(1-2):163-72.

Figuroa MS, Peters JI. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. Respir Care. 2006 Apr;51(4):403-12.

Hammerman H, Schoen FJ, Kloner RA. Short-term exercise has a prolonged effect on scar formation after experimental acute infarction. J Am Coll Cardiol. 1983; 2(5):979-82.

Haykowsky M, Scott J, Esch B, Schopflocher D, Myers J, Paterson I, Warburton D, Jones L, Clark AM. A meta-analysis of the effects of exercise training on left

ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. Trials. 2011 Apr 4;12:92.

Heimburger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. Arch Surg. 1946; 52: 677-89.

Hiss MDBS, Neves VR, Hiss FC, Silva E, Silva AB, Catai AM. Safety of early physical therapy intervention after acute myocardial infarction. Fisioter Mov. 2012; 25(1):153-63.

Hochman JS, Healy B. Effect of exercise on acute myocardial infarction in rats. J Am Coll Cardiol. 1986; 7:126 –132.

Holmes JW, Borg TK, Cowel JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarction. Ann Rev Biomed Eng. 2005; 7: 223-53.

Holt E, Tønnessen T, Lunde PK, Semb SO, Wasserstrom JA, Sejersted OM, Christensen G. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. J Mol Cell Cardiol. 1998 Aug;30(8):1581-93

Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. Cardiovasc Res. 2007; 73(2):326-40.

Jikuhara T, Sumimoto T, Tarumi N, Yuasa F, Hattori T, Sugiura T, Iwasaka T. Left atrial function as a reliable predictor of exercise capacity in patients with recent myocardial infarction. Chest. 1997 Apr; 111(4): 922-8.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: I. Method of coronary occlusion in small animals. Ann Surg. 1954; 140: 675-82.

Jorge L, Rodrigues B, Rosa KT, Malfitano C, Loureiro TC, Medeiros A, Curi R, Brum PC, Lacchini S, Montano N, De Angelis K, Irigoyen MC. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. Eur Heart J. 2011; 32(7):904-12.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? Circulation. 2003; 108:1395-403.

Jugdutt BI. Limiting fibrosis after myocardial infarction. N Engl J Med. 2009; 360(15):1567-9.

Jugdutt, b. I., michorowski, b. L., kappagoda, c. T. Exercise training after anterior Q wave myocardial infarction: Importance of regional left ventricular function and tomography. J Am Coll Cardiol. 1988; 12(2):362-72..

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. 1979;11(4):447-55.

Kalapura T, Lavie CJ, Jaffrani W, Chilakamarri V, Milani RV. Effects of cardiac rehabilitation and exercise training on indexes of dispersion of ventricular repolarization in patients after acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 2003; 92(3):292-4.

Kloner RA, Kloner JA. The effect of early exercise on myocardial infarct scar formation. Am Heart J. 1983;106:1009 –1013.

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. Cardiovasc Res. 2007; 74: 29-38.

Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar CH, Leite LH, and Coimbra CC. Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. Neurosci Lett. 2006 Dec 20;410(2):152-6.

Leite WA, Gil MA, Lima VC, Luna Filho B, Servantes DM, Paola AA, Oliveira Filho JA. Exercise Testing Early After Myocardial Infarction: Comparison with Echocardiography, Electrocardiographic Monitoring and Coronary Arteriography. Arq Bras Cardiol. 2008;90(3):176-81.

Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, Zincarelli C, Sanzari E, Ciccarelli M, Galasso G, Altobelli GG, Conti V, Matrone G, Cimini V, Ferrara N, Filippelli A, Koch WJ, Rengo F. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. Cardiovasc Res. 2008; 78(2):385-94.

Libonati JR. Exercise and diastolic function after myocardial infarction. Med. Sci. Sports Exerc. 2003; 35: 1471–6. 15.

Litwin SE. The rat model of postinfarction heart failure. Heart Fail. 1995; 11: 182-95.

Loennechen JP, Wisløff U, Falck G, Ellingsen Ø. Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during post-infarction failure in rat. Acta Physiol Scand. 2002 Sep;176(1):17-26.

Lundeberg T, Kohler R, Bucinskaite V, Eriksson SV. Physical Exercise Increases Survival after an Experimental Myocardial Infarction in Rats. Cardiology. 1998; 90:28–31.

Mackiewicz U, Maczewski M, Konior A, Tellez JO, Nowis D, Dobrzynski H, Boyett MR, Lewartowski B. Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-ATPase ability to transport Ca<sup>2+</sup> gradually diminishes after myocardial infarction in the rat. Cardiovasc Res. 2009; 81(3):546-54.

Melillo G, Lima JA, Judd RM, Goldschmidt-Clermont PJ, Silverman HS. Intrinsic myocyte dysfunction and tyrosine kinase pathway activation underlie the impaired wall thickening of adjacent regions during postinfarct left ventricular remodeling. Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1447-58.

Middlekauff, H. R., Mark A. L., The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. Intern Med. 1998; 37(2):112-22.

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE.

Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def> [20/03/2013]

Milanez MC, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Effects of captopril on interstitial collagen in the myocardium after infarction in rats. J Card Fail 1997; 3: 189-197.

Mill JG, Gomes AP, Carrara AB, Gomes MG, Vassallo DV. Influence of chronic captopril therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. Pharmacol Res 1994; 29: 77-88

Mill JG, Milanez MC, de Resende MM, Gomes MG, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2003; 30: 739-744.

Miranda A, Costa-E-Sousa RH, Werneck-De-Castro JPS, Mattos EC Olivares, EL., Ribeiro VP, Silva MG, Goldenberg RCS, Campos-De-Carvalho AC. Time course of echocardiographic and electrocardiographic parameters in myocardial infarct in rats. An Acad Bras Cienc, 2007.

Musch TI, Nguyen CT, Pham HV, Moore RL. Training effects on the regional blood flow response to exercise in myocardial infarcted rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1992; 262(6):H1846-52.

Negrão CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. Heart Fail Rev. 2008; 13(1): 51-60.

Nozawa E, Kanashiro R, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SL, Campos O, Tucci PJ, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. Braz J Med Biol Res. 2006; 39 (5): 687-95.

Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat: continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. Circulation. 1995; 92: 253-61.

Orenstein TL, Parker TG, Butany JW, Goodman JM, Dawood F, Wen WH, et al. Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. J Clin Invest 1995; 96:858-66.

Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. N Engl J Med. 1993; 328(8):538-45.

Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction- - despite congestive heart failure. Arq Bras Cardiol. 2006; 86: 105-12.

Pimentel EB, de Moraes AC, Forechi L, Machado RC, Baldo MP, Mill JG. Kinetics of the electrocardiographic changes after permanent coronary

occlusion in rats: Relationship with infarct size. Pathophysiology. 2012; 19(4):277-81.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 1979; 44:503-12.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steimberg BS, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. Circulation. 1985; 72: 406-12.

Pfeffer Ma, Braunwald E. Ventricular remodelling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990; 81(4):1161-72

Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J. & Braunwald, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. Am J Physiol. 1991; 260:H1406-14.

Piegas, L.S., Feitosa, G., Mattos, L.A., Nicolau, J. C., Rossi Neto, J. M. et al. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio / III Guidelines on the treatment of myocardial acute infarction. Arq. bras. cardiol. 2004; 83(supl.4):1-86.

Piegas, L.S., Feitosa, G., Mattos, L.A., Nicolau, J. C., Rossi Neto, J. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. Arq Bras Cardiol. 2009; 93(6 supl.2):e179-e264.

Pina IL, Daoud S. Exercise and heart failure. Minerva Cardioangiol. 2004; 52 (6): 537-46.

Portes LA, Tucci PJF. O treinamento físico por natação atenua o remodelamento miocárdico e congestão pulmonar em ratas Wistar com insuficiência cardíaca secundária a infarto do miocárdio. Arq Bras Cardiol. 2006; 87: 54-9.

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 infarction. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009; 36: 394-9.

Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Souza MO, Cruz JS, Natali AJ. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. J Appl Physiol. 2009 Aug;107(2):593-8.

Rolim NP, Mattos KC, Brum PC, Baldo MV, Middlekauff HR, Negrao CE. The decreased oxygen uptake during progressive exercise in ischemia-induced

heart failure is due to reduced cardiac output rate. Braz J Med Biol Res. 2006; 39(2): 297-304.

Rodrigues TMA, Vieira AES, Farias RA, Cabral FLD, Costa RV, Andrade ACM, Silva WRT, Melo ACS, Moura TR, Marçal AC. Short-term swimming therapy is not beneficial in an experimental animal model of myocardial infarction. J. Morphol. Sci., 2011, 28(2), p. 91-94

Sallinen, P., S. Manttari, et al. Time course of changes in the expression of DHPR, RyR(2), and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle. Mol Cell Biochem. 2007; 303(1-2):97-103.

Santos-Hiss MDB, Melo RC, Neves VR, Hiss FC, Verzola RM, Silva E, et al. Effects of progressive exercise during phase I cardiac rehabilitation on the heart rate variability of patients with acute myocardial infarction. Disabil Rehabil. 2011;33(10):835-42.

Selye H, Bajusz E, Grassos S, Mendell P. Simple techniques for the surgery occlusion of coronary vessels in the rat. Angiology. 1960; 11: 398-407.

Silva MSV, Bocchi EA, Guimarães GV, Padovani CR, Silva MHGG, Pereira SF, et al. Benefits of exercise training in the treatment of heart failure: Study with a control group. Arq Bras Cardiol. 2002;79:357-62.

Song J, Zhang XQ, Wang J, Carl LL, Ahlers BA, Rothblum LI, Cheung JY. Sprint training improves contractility in postinfarction rat myocytes: role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. J Appl Physiol. 2004 Aug;97(2):484-90.

Stuver TP, Cove CJ, Hood WBJ. Mechanical abnormalities in the rat ischemic heart failure model which lie downstream to cAMP production. J Moll Cell Cardiol 1994; 26:1221-6.

Sun Y, Kiani MF, Postlethwaite AE, Weber KT. Infarct scar as living tissue. Bas Res Cardiol. 2002; 97: 343-7.

Sutton MGS, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction - Pathophysiology and therapy. Circulation 2000; 101: 2981-8.

Remo, EF. Heart failure management. Prevention of pulmonary edema is essential. Adv Nurse Pract. 2005 Dec;13(12):27-8, 30, 62.

Rondon E, Brasileiro-Santos MS, Moreira ED, Rondon MUPB, Mattos KC, Coelho MA, Silva GJJ, Brum PC, Fiorino P, Irigoyen MC, Krieger EM, Middlekauff HR, Negrão CE. Exercise training improves aortic depressor nerve sensitivity in rats with ischemia-induced heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291:2801–2806.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial. Third universal definition of myocardial infarction. Eur Heart J. 2012 Oct; 33(20): 2551 – 67.

Trueblood NA, Inscore PR, Brenner D, Lugassy D, Apstein CS, Sawyer DB, et al. Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288(1):H244-9.

Tucci PJ. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. Arq Bras Cardiol. 2011 May;96(5):420-4.

Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. Dialogues in Cardiovascular Medicine. 1999; 4: 3-19.

Wisloff, U., J. P. Loennechen, et al. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2002 Apr;54(1):162-74.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. Circulation 1991; 84: 2123-2134.

Whittaker P. Unravelling the mysteries of collagen and cicatriz after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 1995; 29: 758-62.

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> [20/03/2013]

Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, Li J, Laham RJ. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;296:389–395.

Xu, X., W. Wan, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. J Mol Cell Cardiol. 2008 Jan;44(1):114-22.

Xu, X., W. Wan, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. Cardiovasc Res. 2008a Jun 1;78(3):523-32

Yamaguchi, F., A. Sanbe, *et al*. Cardiac sarcoplasmic reticular function in rats with chronic heart failure following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 1997 Feb;29(2):753-63.

You Fang Z, Marwick TH. Mechanisms of exercise training in patients with heart failure. Am Heart J. 2003; 145:904 –911.

Yeğinsu A, Ergin M. Determination of optimal drying period in wet to dry weight ratio measurement. Tuberk Toraks. 2010; 58(2):229-30.

Zhang XQ, NG YC, Musch TI, Moore RL, Zelis R, Cheung JY. Sprint training attenuates myocyte hypertrophy and improves Ca<sup>+2</sup> homeostasis in postinfarction myocytes. J Appl Physiol. 1998; 84 (2).

Zhang XQ, Musch TI, Zelis R, Cheung JY. Effects of impaired Ca<sup>2+</sup> homeostasis on contraction in postinfarction myocytes. J Appl Physiol. 1999; 86(3):943-50.

Zhang LQ, Zhang XQ, Musch TI, Moore RL, Cheung JY. Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes. J Appl Physiol. 2000a; 89: 1099-105.

Zhang LQ, Zhang XQ, NG YC, et al. Sprint training normalizes Ca<sup>+2</sup> transients and SR function in postinfarction rat myocytes. J Appl Physiol. 2000b; 89: 38-46.

Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. Arq Bras Cardiol. 1997; 68: 453-60.

Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, Paiva SAR. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. Arq Bras Cardiol. 2006; 86: 276-82.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model. Arq Bras Cardiol 2009; 93(3): 403-408.

Zanchi NE, Bechara LR, Tanaka LY, Debbas V, Bartholomeu T, Ramires PR. Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. Eur J Appl Physiol. 2008 Dec;104(6):1045-52.

## ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA/ UFV certifica que o projeto n.º 22/2012, intitulado "*Efeitos do exercício físico regular associado à terapia com células tronco sobre a estrutura e função do miocárdio de ratos submetidos ao infarto do miocárdio*", do professor Antônio José Natali, do Departamento de Educação Física, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 25/05/2012.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 22/2012, "*Effects of regular physical training associated with stem cell therapy on the myocardial structure and function of rats undergone through experimental myocardial infarction*", is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation/Brazilian of Animal Science Laboratory Society (COBEA/SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on Maio, 25 2012 approved this process.

Viçosa, 25 de maio de 2012

**Professor Cláudio César Fonseca**

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV - CEUA  
Coordenador