

LUIZ HENRIQUE MARCHESI BOZI

**EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO AO
INFARTO DO MIOCÁRDIO SOBRE A MORFOLOGIA E A FUNÇÃO
CONTRÁTIL DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

LUIZ HENRIQUE MARCHESI BOZI

Efeitos de um programa de exercício físico prévio ao infarto do miocárdio sobre a morfologia e a função contrátil do ventrículo esquerdo de ratos

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

Aprovada: 20 de agosto de 2010

Prof. Antônio José Natali
(Co-orientador)

Prof. Thales Nicolau Prímola Gomes
(Co-orientador)

Prof. Paulo Roberto dos Santos Amorim
(Avaliador)

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta
(Avaliador)

Prof^a. Izabel R. S. Costa Maldonado
(Orientadora)

*À memória de meu pai.
À minha família (Dorinha, Taís e Dayane).
Aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força e iluminado meus caminhos durante essa trajetória, tornando possível mais essa conquista em minha vida.

Agradeço à minha mãe Dorinha, por seus conselhos, ensinamentos, amor, apoio, incentivo e por sempre acreditar em mim.

Ao meu pai Henrique, por todo ensinamento, apoio e amor.

À minha irmã Taís, pela amizade, compreensão e amor.

À minha namorada Dayane, pelo apoio, compreensão, amor e por fazer parte da minha vida.

Aos meus demais familiares, tias Águeda e Conceição, tios João e Paceli e primos, Jackson, Bruno, Roger, Alexandre, Wallace, Willian, Alana e Sara, pelo apoio nos momentos difíceis, amor e convívio.

Aos meus “irmãos” Tiago, Diego Valdi, Lucas e Evandro, pela convivência, amizade, apoio e pelos grandes momentos que passamos juntos.

Aos professores Natali, Thales e Izabel, pela orientação, oportunidade, aprendizado, auxílio e exemplo profissional.

Ao amigo Marcelo Baldo, pela convivência e apoio neste trabalho.

Ao professor José Geraldo Mill, pelas análises feitas em seu laboratório.

À grande amiga Marcinha, pelo companheirismo, dedicação e convívio.

Aos meus amigos Rômulo, Arlete, Kenner e Marli, pelos bons momentos de convivência e pela contribuição fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus companheiros de república Rosca, Gaúcho e Calouro, pelas cervejas, companhia e convivência nestes últimos meses.

Aos meus grandes amigos do Biotério Barbara, Miguel, Lucas, Vitor, Felipinho, Ju, Chyntia, “Junson”, Mateus, Karina, Pedro, Aurora, Mayra, Filipe Drummond, Luciano Mandi e os demais que porventura posso ter esquecido. MUITO OBRIGADO pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

À bolsista de iniciação científica Regiane.

Ao Prof. Leonardo Bonato por ter desenvolvido e cedido o programa para análise dos gráficos da contratilidade celulares.

Ao amigo e técnico do laboratório de histologia Alex, por seus ensinamentos e pelo grande auxílio durante as análises.

À Universidade Federal de Viçosa pelos seis anos e meio de muita alegria, estudos e felicidades.

Ao CNPq.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 O INFARTO DO MIOCÁRDIO E SEUS EFEITOS SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR CARDÍACA.....	5
3.2 A CONTRACTILIDADE DE CORAÇÕES ACOMETIDOS PELO IM: IMPLICAÇÕES CELULARES.....	7
3.3 BENEFÍCIOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR REALIZADO ANTES DO INFARTO DO MIOCÁRDIO.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E TRATAMENTO	17
4.2 PROGRAMA DE EXERCÍCIO.....	17
4.3 PROTOCOLO DE CAPACIDADE DE CORRIDA EM ESTEIRA.....	18
4.4 INDUÇÃO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO	19
4.5 COLETA DA AMOSTRA.....	19
4.6 ISOLAMENTO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS.....	20
4.6.1 COMPRIMENTO, LARGURA E VOLUME CELULAR	21
4.6.2 CONTRAÇÃO CELULAR	22
4.6.3 SOLUÇÕES DE ISOLAMENTO	24
4.6.4 SOLUÇÃO DE PERFUSÃO TAMPÃO HEPES.....	25
4.7 REGISTROS HEMODINÂMICOS	26
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 CAPACIDADE DE CORRIDA	30
5.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS	30

5.3	EXTENSÃO DO INFARTO.....	32
5.4	SOBREVIVÊNCIA	34
5.5	CONTEÚDO DE COLÁGENO	34
5.6	DENSIDADE VASCULAR.....	36
5.7	PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DOS MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS	38
5.8	PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS MIÓCITOS CARDÍACOS	40
5.8.1	AMPLITUDE DE CONTRAÇÃO	41
5.8.2	VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO	47
5.8.3	VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO	50
5.9	REPOSTAS HEMODINÂMICAS	53
6.	CONCLUSÃO	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ad libitum - do latim “à vontade”

AMPC – adenosina monofosfato cíclica

ATPase – adenosina trifosfato

°C – temperatura (graus Celsius)

Ca⁺² – cálcio

CaCl₂ – cloreto de cálcio

Cl⁻ – íon cloreto

cm – centímetro

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CO₂ – dióxido de carbono

dias/semana – dias por semana

dP/dt+ - derivada máxima de pressão do ventrículo esquerdo

dP/dt- - derivada mínima de pressão do ventrículo esquerdo

EGTA – ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EPM – erro padrão da média

FCR – frequência cardíaca de repouso

g/l – gramas por litro

CaCl₂ – íon cloreto de cálcio

HCO₃⁻ – íon bicarbonato

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid

hora/dia – hora por dia

HSPs – *Heat Shock* Proteins

Hz – hertz (frequência)

IM – infarto do miocárdio

INF EX – grupo exercitado antes da indução do infarto do miocárdio

INF SED – grupo sedentário com infarto do miocárdio induzido

in vitro – do latim “dentro do vidro”

in vivo – do latim “dentro do vivo”

K⁺ – íon potássio

KCl – cloreto de potássio

L – litro

LVEDP – pressão diastólica final no ventrículo esquerdo

LVSP – pressão sistólica no ventrículo esquerdo

MEC – matriz extracelular cardíaca

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

mm – milímetro

MMPs – metaloproteinases da matriz

ml – mililitro

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio

NCX – trocador de sódio e cálcio

OMS – Organização mundial da Saúde

PAD – pressão arterial diastólica

PAS – pressão arterial sistólica

PL – picolitros

PLB – fosfolambano

RS – retículo sarcoplasmático

RyR2 – receptores de rianodina tipo 2

SHAM – grupo controle com infarto simulado

SERCA2 – ATPase do retículo sarcoplasmático

TIMP (inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz)

VE – ventrículo esquerdo

VO_{2max} – consumo máximo de oxigênio

$[Ca^{+2}]_i$ – concentração de cálcio intracelular

$[Ca^{+2}]_e$ – concentração de cálcio extracelular

RESUMO

BOZI, Luiz Henrique Marchesi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Efeitos de um programa de exercício físico prévio ao infarto do miocárdio sobre a morfologia e a função contrátil do ventrículo esquerdo de ratos.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Coorientadores: Antônio José Natali e Thales Nicolau Primola Gomes.

O estudo teve como objetivo verificar os efeitos de um programa de corrida em esteira realizado previamente ao infarto do miocárdio (IM) sobre a morfologia e função contrátil do miocárdio de ratos. Ratos Wistar com idade de 30 dias foram divididos em 3 grupos: infartado sedentário (INF SED, n=13), infartado exercício (INF EX, n=26) e infarto simulado (SHAM, n=12). Antes da cirurgia os animais do grupo INF EX foram submetidos a um programa progressivo de corrida em esteira (5 dias/semana, 60min/dia, 18 m/min e inclinação de 10°) por 8 semanas. Após este período os animais dos grupos INF EX e INF SED foram submetidos a uma cirurgia para indução do IM (oclusão da artéria) e nos animais do grupo SHAM a artéria não foi ocluída. Quinze dias após a indução do IM, os cardiomiócitos localizados na borda (2mm) da área infartada de metade dos animais de cada grupo foram isolados por dispersão enzimática. Os cardiomiócitos foram estimulados a 0,5 e 3 Hz, em temperatura ambiente (~25°C), para mensuração da função contrátil em diferentes concentrações externas de cálcio (0.6, 1 e 5 mM). O restante dos animais foi usado para obtenção dos registros hemodinâmicos. Após este procedimento os corações foram removidos, fixados e corados com Picrosirius red ou Tricrômico de Masson para análise histológica. Os resultados mostram que os animais exercitados tiveram melhor capacidade de corrida, comparados aos sedentários (P<0,05). O programa de corrida aplicado não reduziu significativamente a mortalidade dos animais infartados. O peso do coração, peso relativo do coração, peso do pulmão, peso relativo do pulmão e peso líquido pulmão foram maiores nos animais infartos em comparação com o SHAM, mas sem diferença entre os grupos INF SED e INF EX (P<0,05). Entretanto, a extensão do infarto e o conteúdo de colágeno no miocárdio sobrevivente foram reduzidos pelo exercício físico, apesar da densidade capilar

não ter sido alterada ($P < 0,05$). O comprimento, a largura e o volume celular foram maiores no grupo INF EX ($P < 0,05$), quando comparado aos demais grupos. Os animais exercitados previamente apresentam maior amplitude de contração e velocidades máximas de contração e relaxamento, quando comparados ao grupo INF SED ($P < 0,05$). Além disso, o exercício físico prévio aumentou a $dP/dt+$ e reduziu a $dP/dt-$ ($P < 0,05$). Conclui-se que o programa de corrida em esteira realizado previamente ao IM atenuou os efeitos deletérios do IM sobre a morfologia e a função contrátil do miocárdio. As principais adaptações do exercício: a) redução do tamanho do IM; b) atenuação das alterações provocadas pelo IM na amplitude de contração e aumento da velocidade do ciclo contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados; c) aumento do comprimento, largura e volume dos cardiomiócitos; d) redução da deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente; e) atenuação das alterações provocadas pelo IM nos parâmetros hemodinâmicos.

ABSTRACT

BOZI, Luiz Henrique Marchesi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2010. **Effects of a physical exercise program previous to myocardial infarction on the left ventricle morphology and contractile function of rats.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-advisers: Antônio José Natali and Thales Nicolau Primola Gomes.

The aim of this study was to verify the effects of a treadmill running program previous to myocardial infarction (MI) on the myocardium morphology and contractile function of rats. One-month old male Wistar rats were randomly divided into three groups: sedentary infarcted (INF SED, n = 13), exercised infarcted (INF EX, n = 26) and simulated infarction (SHAM, n = 12). Before surgery animals from INF EX were subjected to a program of treadmill running (5 days / week, 1 hour/day, 18 m / min and inclination of 10 °) for 8 weeks. Then animals from INF EX and INF SED had the left descending coronary artery occluded with a suture thread. The same procedure was performed with SHAM animals, but without artery occlusion. Fifteen days after MI induction myocytes located at the border zone (2mm) of the infarcted area were isolated from some animals of each group and stimulated at 0.5 and 3 Hz at room temperature (~ 25 ° C) to measure cell contractile function at different extracellular calcium (0.6, 1 e 5 mM). The remaining animals were used to obtain hemodynamic records. After this procedure, the hearts were removed, fixed and stained with picosirius red and Masson Trichrome for histological analysis. The results show that the exercised animals had a better running capacity than the sedentary ones (P <0.05). Treadmill running reduced the mortality of infarcted animals, but without statistical difference (P <0.05). Body weight, heart weight, relative weight of heart, lung weight, relative lung weight and lung fluid were not affected by the exercise program (P <0.05). However, the infarct size and collagen content in the surviving myocardium were reduced in previously exercised animals, although the capillary density was not changed (P <0.05). The length, width and cell volume were greater in INF EX group (P <0.05), compared to INF-SED. Exercised animals showed higher contraction amplitude and maximal velocity of contraction and relaxation when compared to sedentary control group (P <0.05). Furthermore, treadmill running increased the $dP / dt +$ and reduced the

dP/dt- ($P < 0.05$). It was concluded that the program of treadmill running attenuated the deleterious effects caused by MI on the morphology and contractile function of the myocardium. The main adaptations of exercise program were: a) attenuation of the changes in the amplitude of cell contraction and improvement of the contraction-relaxation cycle; b) increases in the length, width and volume of cardiomyocytes, c) reduction of collagen deposition in the surviving myocardium; and e) attenuation of the changes in the hemodynamic parameters.

1. Introdução

As doenças cardiovasculares prevalecem como um das principais causas de mortalidade e incapacidade no mundo há vários anos (Murray & Lopez, 1996). Dentre os acometimentos cardíacos em decorrência destas doenças destaca-se o infarto do miocárdio (IM).

Essa patologia é causada pela obstrução parcial ou total das artérias coronárias, responsáveis pela irrigação do miocárdio. Quando o fluxo coronariano é obstruído, uma parte do tecido cardíaco deixa de receber oxigênio e nutrientes. Este evento está relacionado com a morte de parte do miocárdio, o qual conduz a um quadro de remodelamento cardíaco, onde ocorre o rearranjo estrutural e molecular compensatório, sem restauração da função cardíaca (Mill et al, 1990; Loennechen et al., 2002; Dayan et al., 2005).

Os efeitos deletérios causados pelo IM estão relacionados a uma série de mudanças estruturais, as quais têm início com a morte dos cardiomiócitos na região afetada pela isquemia tecidual. O rearranjo estrutural causado pelo IM faz parte de uma resposta para reparar a área lesada. De uma forma geral, esse processo tem como objetivo substituir os cardiomiócitos mortos por uma cicatriz de colágeno (Dobaczewski et al., 2009).

Apesar de essa resposta reparativa ter um papel importante na manutenção da estrutura cardíaca e para evitar um possível rompimento e dilatação do ventrículo esquerdo (VE), esse processo também desencadeia uma resposta reativa, ou seja, as áreas que não foram afetadas de forma direta pela isquemia tecidual também sofrem os efeitos do remodelamento cardíaco caracterizado, principalmente, pelo acúmulo de colágeno nessa região. O acúmulo excessivo dessa macromolécula na região não infartada aumenta a rigidez tecidual, a qual está relacionada com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; de Waard & Duncker, 2009).

Estudos *in vivo* demonstram que as alterações causadas pelo remodelamento cardíaco têm impacto importante sobre a função cardíaca. Foi reportado, a partir da análise da função cardíaca de animais infartados, que o IM

reduziu a fração de ejeção, a porcentagem de encurtamento e o desenvolvimento de pressões sistólica, arterial média e sistólica intraventricular, além de aumentar a pressão diastólica final intraventricular (Li et al., 1995; Holt et al., 1998; Gupta et al., 2000; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; Ahlers et al., 2005).

A perda de função cardíaca observada em corações com IM pode estar relacionada com alterações das propriedades morfológicas e contráteis dos cardiomiócitos. Estudos com cardiomiócitos isolados demonstram que o comprimento celular apresenta-se aumentado em resposta à dilatação do VE (Li et al., 1995; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002), enquanto há redução da amplitude de contração (Li et al., 1995; Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002), aumento (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002) ou não alteração (Wisloff et al., 2002) do tempo de contração e aumento do tempo de relaxamento (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002). Contudo, existem controvérsias sobre os efeitos do IM na função contrátil dos cardiomiócitos (Gupta et al., 2000; Song et al., 2004; Ahlers et al., 2005; Mackiewicz et al., 2008).

Embora a prática de atividade física seja correlacionada com redução de eventos cardiovasculares (Blair et al., 1994; Hakim et al., 1998; Manson et al., 2002), pouco se sabe sobre os possíveis benefícios da prática de exercício realizada antes da indução do IM. Estudos em modelos animais têm demonstrado que o exercício físico regular realizado previamente ao IM foi capaz de reduzir a mortalidade (de Waard & Duncker, 2009) e o tamanho do infarto (McElroy et al., 1978; Freiman et al., 2005), além de atenuar o processo de remodelamento cardíaco, caracterizado pela redução da dilatação do VE (Freiman et al., 2005) e deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente (de Waard & Duncker, 2009).

O exercício físico regular realizado antes do IM é capaz também de atenuar a perda da função cardíaca. Foi reportado que animais exercitados previamente ao IM apresentaram aumento da fração de encurtamento do VE (Dayan et al., 2005; Freimann et al., 2005; de Waard & Duncker, 2009) e redução do diâmetro diastólico e sistólico final do VE (Dayan et al., 2005; Freimann et al., 2005).

Em nível celular, foi demonstrado que o exercício físico em animais saudáveis induziu adaptações que melhoraram a função contrátil de cardiomiócitos isolados, conforme observado pelo aumento da amplitude de contração e redução dos tempos de contração e relaxamento (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2005; Kemi et al., 2007). Entretanto, não é de nosso conhecimento estudos que investigaram se exercício físico regular realizado antes do IM experimental é capaz de atenuar os efeitos deletérios dessa patologia sobre as propriedades morfológicas e contráteis de cardiomiócitos.

2. Objetivo

Este estudo investigou os efeitos de um programa de corrida em esteira rolante, realizado antes do infarto do miocárdio experimental, sobre a morfologia e a função contrátil do miocárdio de ratos. Especificamente, analisaram-se parâmetros morfológicos e mecânicos do ventrículo esquerdo, no sentido de analisar se o exercício físico regular:

- previne possíveis alterações na morfologia de miócitos isolados;
- atenua possíveis alterações na amplitude e velocidade do ciclo contração-relaxamento de miócitos isolados;
- reduz o tamanho da área de infarto;
- altera a densidade vascular;
- reduz a deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente;
- atenua possíveis alterações nos parâmetros hemodinâmicos.

3. Revisão de literatura

O IM é uma patologia causada pela obstrução parcial ou total das artérias coronárias, responsáveis pela irrigação do miocárdio. Quando o fluxo coronariano é obstruído, uma parte do tecido cardíaco deixa de receber oxigênio e nutrientes. Este evento está relacionado com a morte de parte do miocárdio, o qual conduz a um quadro de remodelamento cardíaco, onde ocorre o rearranjo estrutural e molecular compensatório, sem restauração da função cardíaca (Mill et al, 1990; Dayan et al., 2005; Loennechen et al., 2002).

De acordo com a Organização mundial da Saúde dos 16,7 milhões de óbitos ocorridos no ano de 2002, 7,2 milhões tiveram como causa a doença arterial coronária. No Brasil, cerca de 65 mil óbitos notificados no ano de 2005 tiveram como causa o IM (DATASUS).

Vários fatores estão associados ao desenvolvimento do IM, por exemplo: a dislipidemia, tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, diabetes e inatividade física (Lanas et al.,2007; Anand et al., 2008).

Por outro lado, estudos epistemológicos têm demonstrado que a prática de atividade física está associada a uma redução substancial de eventos cardiovasculares (Blair et al., 1994; Hakim et al., 1998; Manson et al., 2002). O exercício físico regular realizado antes do IM experimental, apesar dos poucos estudos, vem sendo sugerido por apresentar um efeito cardioprotetor importante contra os danos causados pelo remodelamento cardíaco (de Waard et al., 2009; Dayan et al., 2005; Brown et al., 2003).

Essa revisão tem como objetivo discutir os efeitos do treinamento físico sobre o remodelamento cardíaco, assim como suas implicações na função cardíaca de corações acometidos pelo IM.

3.1 O infarto do miocárdio e seus efeitos sobre a matriz extracelular cardíaca

O miocárdio é constituído por células, os cardiomiócitos, e pela matriz extracelular cardíaca (MEC), a qual é um tecido conectivo em forma de rede que

atua formando conexões entre estas células, permitindo assim, a organização do coração em câmaras cardíacas. A MEC é formada por macromoléculas, em sua grande parte, secretada por células especializadas na síntese protéica, os fibroblastos, as quais incluem proteínas fibrosas, de dois tipos funcionais, colágeno e elastina, e moléculas multiadesivas tais como proteoglicana e fibronectina (Lin & Bissel, 1993), sendo suas principais funções fisiológicas da MEC são de manter a integridade tecidual e função cardíaca (Cleutjens, 1996).

A ruptura dessa rede formada por essas moléculas e macromoléculas supracitadas resulta em alterações na geometria ventricular e está associado com a disfunção sistólica e diastólica (Berk et al., 2007; Kim et al., 2000, Senzaki et al., 2000; Dobaczewski et al., 2009). Neste sentido, o IM tem se mostrado uma patologia capaz de provocar alterações drásticas na estrutura da MEC, processo conhecido como remodelamento cardíaco, o qual caracteriza-se, principalmente, pela fibrose tecidual e dilatação do VE (de Waard & Duncker et al., 2009, Swynghedauw, 1999; Sun et al., 2000).

Um apropriado balanço de síntese e degradação é requerido para manutenção da arquitetura das câmaras cardíacas. A quebra dessa homeostase, decorrente do IM, inicia o processo de remodelamento cardíaco, o qual pode estar associado com aumento da mortalidade, incidência de arritmias e desenvolvimento de insuficiência cardíaca crônica (Opie et al., 2006).

A morte dos cardiomiócitos provocada pela isquemia tecidual ativa uma série de eventos celulares e moleculares, os quais fazem parte de uma resposta para reparar a área lesada. Esses eventos podem ser divididos em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (Dobaczewski et al., 2009). De uma forma geral, esse processo tem como objetivo substituir os cardiomiócitos mortos por uma cicatriz de colágeno, uma vez que o músculo cardíaco tem uma baixa capacidade de regeneração.

Contudo, apesar dessa resposta reparativa, a qual tem um papel importante na manutenção da estrutura cardíaca e no sentido de evitar um possível rompimento da parede do ventrículo esquerdo, esse processo também desencadeia uma resposta reativa, ou seja, as áreas que não foram afetadas de forma direta pela

isquemia tecidual também sofrem os efeitos do remodelamento cardíaco, caracterizado, principalmente, pelo acúmulo de colágeno nessa região. O acúmulo excessivo dessa macromolécula na região não infartada aumenta a rigidez tecidual, a qual está relacionada com a perda da função contrátil (de Waard & Duncker, 2009; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008).

Em termos cronológicos, o remodelamento cardíaco é inicialmente uma resposta adaptativa para manutenção da função cardíaca normal, entretanto, o avanço desse processo está relacionado com a resposta reativa e conduz para uma progressiva descompensação e falha cardíaca congestiva (Redfield et al., 2003).

As alterações nos componentes da MEC decorrentes do infarto do miocárdio parecem ser o principal responsável pela perda da função cardíaca observada nos pacientes com esta patologia. Todavia, alguns autores reportam que alterações nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos também podem estar relacionadas com o desenvolvimento da falha cardíaca (Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002; Li et al., 1995), apesar de existirem controversas (Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Mackiewicz et al., 2008).

3.2 A contractilidade de corações acometidos pelo IM: implicações celulares

O IM é uma patologia que provoca uma série de alterações morfológicas e estruturais que comprometem a função cardíaca.

Estudos *in vivo* demonstraram que o IM reduz a fração de ejeção, a porcentagem de encurtamento e o desenvolvimento de pressões sistólica, arterial média e sistólica intraventricular, além de aumento da pressão diastólica final intraventricular (Loennechen et al., 2002; Li et al., 1995; Wisloff et al., 2002; Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Holt et al., 1998). Essas alterações acontecem, conforme discutido acima, em resposta as alterações provocadas pelo processo de remodelamento cardíaco, como por exemplo, aumento da fibrose intersticial e dilatação do VE.

Além disso, alguns estudos sugerem a redução da contractilidade dos cardiomiócitos pode contribuir para a disfunção cardíaca (Li et al., 1995; Holt et al.,

1998; Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002), apesar de não existir um consenso na literatura (Song et al., 2004; Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Mackiewicz et al., 2008).

O mecanismo de contração celular é conhecido como acoplamento excitação-contração. Esse processo inicia-se pela estimulação elétrica dos miócitos cardíacos através do potencial de ação. Este ativa a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) tipo L. A entrada desse íon nas células ativa os receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), o que resulta em liberação do Ca^{2+} armazenado nesse compartimento celular. A combinação da entrada de Ca^{2+} e a liberação de Ca^{2+} pelo RS provocam o aumento da concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), permitindo a ligação do Ca^{2+} à troponina C, o que ativa o processo de contração celular. Para que o relaxamento ocorra, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve ser reduzida, o que provocará a dissociação do Ca^{2+} da troponina C. Tal processo necessita do transporte de Ca^{2+} para fora do citosol, o que é realizado pela Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA2), pelo trocador de sódio/cálcio (NCX), pela Ca^{2+} ATPase presente no sarcolema e pelo transporte de Ca^{2+} mitocondrial (Bers, 2002).

Alterações nesse processo de contração celular podem estar relacionadas com a perda da função cardíaca nos corações infartados. Entretanto, isso ainda não está completamente elucidado. Estudos têm demonstrado que, quando presente, a perda da função contrátil de cardiomiócitos está relacionada, principalmente, a alterações em moléculas envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração, contudo, alterações na morfologia dos miócitos cardíacos também podem interferir na contratilidade de cardiomiócitos de animais infartados (Loennechen et al., 2002; Li et al., 1995; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007).

No que se refere à morfologia dos miócitos cardíacos de corações infartados, grande parte dos estudos tem reportado que ocorre um aumento no comprimento das células, após o infarto do miocárdio, com subsequente progressão devido ao avanço do remodelamento cardíaco (Loennechen et al., 2002; Li et al., 1995; Wisloff et al., 2002). A largura dos cardiomiócitos, porém, apresenta-se inalterada (Zhang et al., 2000) ou aumentada (Wisloff et al., 2002).

Contudo, essas adaptações não são homogêneas e neste sentido, Loennechen et al. (2002) observaram que os cardiomiócitos da região da borda da

área infartada apresentaram um aumento da largura e do comprimento maior que o observado nos cardiomiócitos da região remota, ou seja, distante da área infartada.

Esta heterogeneidade pode ser explicada pela isquemia tecidual que induz a hipertrofia excêntrica. O aumento no comprimento dos miócitos de corações infartados é decorrente do processo de remodelamento cardíaco provocado pela morte de parte dos cardiomiócitos da região afetada, onde ocorrem dilatação e diminuição da espessura da parede ventricular (de Waard et al., 2007; Swynghedauw et al., 1999; Sutton et al., 2000).

Apesar das sugestões de que a perda da função contrátil de corações infartados está relacionada com alterações na contratilidade dos miócitos cardíacos (Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002; Li et al., 1995), ainda existem controvérsias (Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Holt et al., 1998). Por exemplo, a amplitude de contração ou a porcentagem do encurtamento celular, sem sobrecarga, tem si mostrado reduzida (Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002; Li et al., 1995; Holt et al., 1998) ou não alterada nas células de corações infartados (Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Mackiewicz et al., 2008; Song et al., 2004).

Corroborando com as modificações observadas na morfologia de cardiomiócitos, foi reportado que a amplitude de contração é menor em cardiomiócitos da região da borda do infarto (Melillo et al., 1996; Kim et al., 2002). A distribuição da carga de forma desigual no ventrículo infartado, resultado de complexas mudanças na forma e no estresse sofrido pela câmara, regula o remodelamento regional do miocárdio, que pode explicar o aumento do comprimento e redução da amplitude de contração das células na região próxima a área infartada.

Em um estudo pioneiro, Ait Mou et al. (2008) demonstraram que o infarto do miocárdio foi capaz de promover redução significativa da porcentagem de encurtamento de sarcômeros apenas nos cardiomiócitos da região do endocárdio. Estes resultados sugerem que as adaptações à isquemia tecidual não são uniformes em todo o ventrículo esquerdo e que a região do endocárdio apresenta disfunção celular, muito possivelmente, devido ao fato do estresse sobre a parede do ventrículo esquerdo ser maior nesta região.

A mensuração da contração de miócitos cardíacos em uma solução viscosa, técnica que sobrecarrega as células (Gupta et al., 2000), demonstrou que células de corações infartados apresentaram uma maior amplitude de contração. Em contrapartida, nenhuma diferença na força passiva e na máxima tensão isométrica foi encontrada quando comparado células cardíacas de animais infartados com não infartados (Ait Mou et al., 2008).

Tem sido sugerido também que no coração com IM o tempo de contração celular pode ser aumentado (Loennechen et al., 2002; Holt et al., 1998) ou permanecer inalterado (Wisloff et al., 2002), enquanto o tempo de relaxamento celular é aumentado (Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; Holt et al., 1998).

Buscando entender essas alterações Zhang et al. (2000) e Song et al. (2004) investigaram a contratilidade de cardiomiócitos de corações infartados em soluções com baixa e alta concentrações extracelulares de Ca^{+2} ($[\text{Ca}^{+2}]_e$). A baixa $[\text{Ca}^{+2}]_e$ favorece a saída do Ca^{+2} da célula, em contrapartida, a alta $[\text{Ca}^{+2}]_e$ favorece o influxo desse íon. Como resultado, eles observaram que em um meio com baixa $[\text{Ca}^{+2}]_e$ os miócitos de corações infartados apresentaram maior amplitude de contração, em comparação as células de corações não isquêmicos. Entretanto, quando a $[\text{Ca}^{+2}]_e$ apresenta-se elevada, a amplitude de contração de cardiomiócitos de ratos infartados tem se mostrado reduzida. Estes achados indicam que as alterações na contratilidade cardíaca provocadas pelo infarto do miocárdio devem-se, pelo menos em parte, a quebra da homeostase do Ca^{+2} , com modificações tanto no influxo como no efluxo desse íon da célula.

As alterações na contractilidade de células cardíacas, mencionadas acima, podem ocorrer em resposta a modificações em alguns parâmetros cruciais na contractilidade intrínseca dos cardiomiócitos, tais como a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ e a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} .

No mecanismo de acoplamento excitação-contração o Ca^{+2} desempenha um papel fundamental, atuando como ativador da contração celular. Não é surpreendente que a perda da função contrátil dos cardiomiócitos decorrentes da isquemia tecidual possa estar relacionada com alterações na dinâmica do Ca^{+2}

durante o processo de contração celular, conforme sugerido por Zhang et al. (2000) e Song et al. (2004).

Os estudos reportam que em condições fisiológicas a amplitude do Ca^{+2} apresenta-se aumentada nos corações infartados (Loennechen et al., 2002; Mackiewicz et al., 2008), enquanto os picos sistólico e diastólico do Ca^{+2} permanecem não alterados ou aumentados (Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002; Ahlers et al., 2005). Estas divergências podem ser decorrentes dos diferentes modelos animais, técnicas indução do infarto e condições experimentais, como por exemplo, o tempo de remodelamento cardíaco.

Com relação ao tempo de redução da $[\text{Ca}^{+2}]_i$, os resultados dos estudos são bastante conclusivos ao demonstrar que células de animais infartados apresentam um aumento no tempo para remoção desse íon (Kim et al., 2002; Ait Mou et al., 2008; Ahlers et al., 2005; Holt et al., 1998; Mackiewicz et al., 2008).

As alterações na $[\text{Ca}^{+2}]_i$ decorrentes do remodelamento cardíaco não são homogêneas em todo o miocárdio infartado. Por exemplo, cardiomiócitos localizados na região da borda da área infartada apresentaram maior amplitude de Ca^{+2} transiente, enquanto a taxa para redução da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ foi menor nesta região, em comparação com área remota (Kim et al., 2002). Ait Mou et al. (2008) observaram, por sua vez, que a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos de ratos infartados aconteceu apenas na região do endocárdio. Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre diferenças regionais na dinâmica do Ca^{+2} frente à isquemia tecidual.

Estudos têm sido realizados para conhecer os efeitos do IM sobre os principais mecanismos envolvidos na regulação do Ca^{+2} . A entrada de Ca^{+2} na célula via corrente de Ca^{+2} dependente de voltagem em células isoladas do ventrículo esquerdo de corações infartados tem si mostrado reduzida (Li et al., 2005) ou inalterada (Holt et al., 1998).

Os NCX do sarcolema apresentaram um aumento na taxa de transporte de Ca^{+2} somente a partir do terceiro mês após a indução do infarto do miocárdio. Nos

corações acometidos por esta patologia, a densidade desse transportador de membrana é reduzida (Wisloff et al. 2002; Gupta et al., 2000; Sallinen et al., 2007).

A atividade da bomba de Ca^{+2} do sarcolema, que contribui para retirada do Ca^{+2} do meio intracelular durante a fase de relaxamento, parece não ser alterada pela isquemia tecidual (Dixon et al., 1992).

Outro dado importante foi reportado por Yamaguchi et al. (1997) que demonstraram que a capacidade de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático via receptores de RyR2 foi maior em corações não isquêmicos. Corroborando com este achado Sallinen et al. (2007) e Guo et al. (2003), mostraram que o infarto do miocárdio promove uma redução nos níveis de RyR.

A captação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático mostrou-se reduzida nos cardiomiócitos de animais infartados, devido a uma menor atividade da SERCA2 (Mackiewicz et al., 2008). Além disso, os níveis dessa proteína também foram menores nesses animais (Wisloff et al., 2002; Ahlers et al., 2005; Gupta et al., 2000; Sallinen et al., 2007; Guo et al., 2003).

Portanto, apesar de serem necessários mais estudos sobre os mecanismos envolvidos na regulação do Ca^{+2} , os resultados obtidos até o presente momento servem como base para explicar as alterações observadas tanto na contractilidade, como na dinâmica do Ca^{+2} em miócitos cardíacos de animais infartados.

Em relação à sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} , estudos utilizando a relação da quantidade de Ca^{+2} com a tensão celular (pCa-tensão), não apresentam um consenso. Wisloff et al. (2002) reportaram redução, enquanto outros pesquisadores não observaram alteração na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} (Yamaguchi et al., 1997; Ait Mou et al., 2008) em animais infartados.

As bases celulares para estas mudanças ainda não são conhecidas. Entretanto, as divergências entre os resultados dos estudos parecem estar relacionados a diferentes condições experimentais.

3.3 Benefícios do exercício físico regular realizado antes do infarto do miocárdio

O exercício físico regular promove benefícios à função contrátil do miocárdio através de adaptações mecânicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares dos miócitos cardíacos, entre outras. Estas adaptações refletem aumento no volume de ejeção e no débito cardíaco (Diffie, 2001, Diffie, 2004; Kemi, 2008).

Parte dos benefícios promovidos pelo exercício físico na função cardíaca deve-se a redução da rigidez do miocárdio, melhorando a elasticidade do músculo cardíaco, o que possibilita melhora da distensibilidade e hemodinâmica cardíaca. Tal efeito aumenta o volume diastólico final e, conseqüentemente, melhora a função cardíaca (Woodiwiss et al., 1996; de Waard e Duncker, 2009). Neste sentido, Choi et al. (2009) demonstraram que o exercício físico aumentou o índice de contractilidade ($dP/dt+$) do VE de ratos. Já Xu et al. (2007) reportaram que exercício físico aumentou a $dP/dt+$, o encurtamento e a fração de ejeção do VE de ratos infartados.

Em nível celular e molecular, estudos recentes demonstraram que o exercício altera a homeostasia de Ca^{2+} em animais normais através do aumento da expressão de proteínas reguladoras de Ca^{2+} , como SERCA 2, fosfolambano (PLB) e da CaMKII, sem alterar a expressão de RyR2 e NCX. Essas adaptações melhoraram a função contrátil de cardiomiócitos, demonstrada pelo aumento na amplitude de contração e redução no tempo de contração e de relaxamento celular (Diffie, 2004; Kemi et al., 2008, Delgado et al., 1999, Kemi et al., 2007).

Além disso, o exercício físico pode promover hipertrofia cardíaca (hipertrofia fisiológica), a qual inclui alterações morfológicas e funcionais (Atchley & Douglas, 2007, Wang et al., 2008). Este tipo de hipertrofia ocorre em ambos os ventrículos, mas em grau mais elevado no VE (Moore & Korzick, 1995).

A hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica é induzida por exercícios de resistência aeróbia e ocorre em função do aumento no retorno venoso e sobrecarga volumétrica no músculo cardíaco. Isso leva ao aumento da cavidade ventricular, proporcional a espessura das câmaras cardíacas. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica é induzida por exercícios de força e potência que

promovem aumento de tensão contra resistência e sobrecarga pressórica no músculo cardíaco. Isto leva a aumento da espessura das paredes do miocárdio, sem aumento das cavidades dos ventrículos (Moore & Korzick, 1995; Douglas, 1989; Fleck, 1988; Díaz-Herrera et al., 2001., Naylor et al., 2008; Wisloff et al., 2007).

Em nível celular, os cardiomiócitos de animais treinados exibem modificações morfológicas. Estudos revelam que o exercício regular de resistência aeróbica com intensidade baixa a moderada promove hipertrofia cardíaca onde é observado aumento principalmente do comprimento dos cardiomiócitos e que o exercício de intensidade alta, contínuo ou intermitente, promove hipertrofia cardíaca onde é observado aumento da largura dos cardiomiócitos (Moore et al., 1993; Wisloff et al; 2001; Natali, 2001, 2002; Diffie & Nagle, 2003; Kemi et al., 2004; Wang et al., 2008; Galindo et al., 2009). Porém, Schultz et al. (2007) e Eisele et al. (2008) verificaram que a corrida voluntária não alterou o comprimento, a largura ou o volume de cardiomiócitos de ratos, entretanto, essas células exibiam maior número de mitocôndrias e o ventrículo esquerdo apresentou maior volume total.

Embora a prática de atividade física seja correlacionada com redução de eventos cardiovasculares (Blair et al., 1994; Hakim et al., 1998; Manson et al., 2002) e com melhora da função cardíaca (Woodiwiss et al., 1996; de Waard e Duncker, 2009; Choi et al., 2009), pouco se sabe sobre os possíveis benefícios da prática de exercício realizada antes do IM sobre os efeitos deletérios provocados por essa patologia.

Estudos utilizando modelo animal demonstraram que o exercício físico regular realizado antes da indução do IM está associado com a redução do tamanho do infarto (McElroy et al., 1978; Freiman et al., 2005). Além disso, também foi reportado que os ratos que exercitaram antes da indução do IM apresentaram uma menor taxa de mortalidade (de Waard e Duncker, 2009).

Esse efeito cardioprotetor promovido pelo exercício físico ainda não está totalmente entendido, entretanto, alguns mecanismos têm sido propostos. Powers et al. (2008) demonstraram que a redução no tamanho do IM pode ser explicada, pelo menos em parte, pela melhora da capacidade antioxidante do miocárdio em resposta ao exercício físico. Também tem sido apontado como um possível mecanismo envolvido na cardioproteção contra o IM o aumento da densidade

vascular, a qual pode ser aumentada pelo exercício físico, conforme demonstrado por McElroy et al. (1978) e Freimann et al. (2005). Além disso, Marini et al. (2007) demonstram que o aumento das proteínas de choque térmico (HSP 72) induzido pelo exercício físico atenuou os efeitos deletérios da isquemia/reperfusão.

A atividade física realizada de forma prévia também contribui para a melhora da resposta reparativa. Foi reportado que animais que exercitaram de forma prévia tiveram uma maior espessura e área da região infartada. Os autores sugerem que estas adaptações contribuem para redução da mortalidade causada pela ruptura cardíaca (de Waard & Duncker, 2009).

Já no que diz respeito à deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente (resposta reativa), os trabalhos demonstram que o exercício físico quando realizado de forma prévia pode reduzir a fibrose tecidual induzida pelo IM (Xu et al., 2008; de Waard & Duncker, 2009).

Tem sido proposto que a diminuição da deposição de colágeno em corações infartados promovida pelo exercício físico prévio está relacionada com dois fatores: a redução do estresse sobre a parede do VE e com um melhor balanço entre síntese e degradação da MEC (Orenstein et al., 1995; Sun et al., 1999; Liu et al., 2000; Xu et al., 2008).

Neste sentido, Orenstein et al. (1995) reportaram que o exercício físico regular reduziu o pico de tensão sobre o miocárdio em animais infartados exercitados. Além disso, animais com insuficiência cardíaca submetidos ao exercício físico apresentaram aumento na sensibilidade dos barorreceptores e do tônus vagal, além de redução na atividade simpática, o que explica, pelo menos em parte, a diminuição do estresse cardíaco em resposta ao exercício físico (Kiilavuori et al., 1995; Sun et al., 1999; Liu et al., 2000; Pliquett et al., 2003). Já Xu et al. (2008), demonstram que a redução do estresse cardíaco também pode estar relacionado com a atenuação do sistema renina-angiotensina em resposta ao exercício físico. Foi reportado que animais exercitados apresentaram diminuição da concentração de receptores de angiotensina II do tipo 1 e de RNAm da enzima conversora de angiotensina.

A redução da fibrose tecidual promovida pelo exercício físico também deve-se a alterações no balanço entre síntese e degradação dos constituintes da MEC. As MMPs (metaloproteinase da matriz) são proteinases que atuam na degradação

da MEC. Essas enzimas são reguladas pelas TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinase da matriz), os quais inibem sua atividade, permitindo o acúmulo de colágeno no miocárdio. Xu et al. (2008; 2008a) reportaram que o exercício físico diminuiu a concentração de TIMP-1 em ratos com IM experimental. Esse fenômeno reduziu a fibrose tecidual no miocárdio destes ratos, pois aumentou a degradação do colágeno, devido a uma maior atividade das MMPs.

A atenuação do processo de remodelamento cardíaco em resposta ao exercício físico tem impacto direto sobre a função cardíaca. Estudos têm demonstrado que a redução da fibrose no miocárdio sobrevivente contribui para melhora da função cardíaca de corações infartados (Xu et al., 2008; de Waard & Duncker, 2009).

Corroborando com esses achados, tem sido sugerido que o exercício físico regular realizado antes do IM é capaz de atenuar a perda da função cardíaca. Animais exercitados previamente ao IM apresentaram aumento da fração de encurtamento do VE (Dayan et al., 2005; Freimann et al., 2005; de Waard & Duncker, 2009) e redução do diâmetro diastólico e sistólico final do VE (Dayan et al., 2005; Freimann et al., 2005).

Ainda que a atenuação dos efeitos deletérios do processo de remodelamento seja muito importante para a melhora da função contrátil, muitos autores sugerem que parte dessa melhora deve-se também ao aumento da capacidade contrátil de cardiomiócitos (de Waard et al., 2007; Wisloff et al. 2002; Zhang et al., 2000; Ait Mou et al., 2008).

Apesar dos efeitos positivos do exercício físico sobre as propriedades contráteis e morfológicas de cardiomiócitos de animais saudáveis estarem bem elucidados, não é de nosso conhecimento estudos que investigaram se exercício físico regular é capaz de atenuar os efeitos deletérios do infarto do miocárdio sobre as propriedades morfológicas e contráteis de cardiomiócitos de animais previamente exercitados.

4. Materiais e métodos

4.1 Animais de experimentação e tratamento

Foram utilizados 51 ratos (*Rattus Norvergicus*) da linhagem *Wistar* com 30 dias de vida e massa corporal de $119,76 \pm 8,18$ g (média \pm desvio padrão) no início dos experimentos. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 55/2009).

Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola), receberam água e ração comercial *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade invertido de 12/12 horas escuro/claro. Os animais foram pesados no início e ao final do experimento, utilizando-se uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C).

Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos, a saber: controle sedentário (SHAM, n = 12); infarto sedentário (INF SED, n = 13) e infarto exercício (INF EX, n = 26). Os animais do grupo INF EX foram submetidos a um programa de corrida em esteira rolante elétrica durante oito semanas, conforme descrito no item 3.2. Para garantir que os grupos fossem manejados de forma idêntica, os ratos dos grupos SHAM e INF SED, foram colocados na esteira rolante em repouso durante o período experimental, sendo 3 dias/semana e 15 min./dia.

4.2 Programa de Exercício

Os animais do grupo INF EX foram submetidos a um programa progressivo de corrida em esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP), durante 8 semanas, exercitando-se 5 dias por semana (segunda a sexta-feira), conforme apresentado na tabela 1 (Adaptado, Noble et al., 1999).

Tabela 1. Protocolo progressivo de corrida em esteira rolante.

Primeira semana				
Segunda - feira	Terça - feira	Quarta - feira	Quinta - feira	Sexta - feira
10 m/min. 15 min. 5° de inclinação	11 m/min. 20 min. 5° de inclinação	11 m/min. 25 min. 5° de inclinação	12 m/min. 30 min. 5° de inclinação	12 m/min. 35 min. 5° de inclinação
Segunda Semana				
Segunda - feira	Terça - feira	Quarta - feira	Quinta - feira	Sexta - feira
13 m/min. 40 min. 10° de inclinação	13 m/min. 45 min. 10° de inclinação	14 m/min. 50 min. 10° de inclinação	14 m/min. 55 min. 10° de inclinação	15 m/min. 60 min. 10° de inclinação
Terceira Semana (segunda a sexta-feira)				
16 m/min. 60 min. 10° de inclinação				
Quarta Semana (segunda a sexta-feira)				
16 m/min. 60 min. 10° de inclinação				
Quinta Semana (segunda a sexta-feira)				
17 m/min. 60 min. 10° de inclinação				
Sexta Semana (segunda a sexta-feira)				
17 m/min. 60 min. 10° de inclinação				
Sétima Semana (segunda a sexta-feira)				
18 m/min. 60 min. 10° de inclinação				
Oitava Semana (segunda a sexta-feira)				
18 m/min. 60 min. 10° de inclinação				

4.3 Protocolo de capacidade de corrida em esteira

Ao final das oito semanas de experimento os animais dos grupos SHAM e INF SED foram adaptados à esteira rolante durante 5 dias. Resumidamente, uma semana antes da aplicação do teste de avaliação da capacidade de corrida os animais foram submetidos a 5 dias consecutivos de exercício em esteira rolante. A velocidade de corrida foi progressivamente aumentada durante os dias de adaptação (10, 10, 11, 13, 15 m/min.), enquanto a inclinação (5°) e o tempo (5 min.) permaneceram constantes. Vinte e quatro horas após o período de adaptação dos grupos SHAM e INF SED e a última sessão de treinamento físico do grupo INF EX, todos os animais foram submetidos a um protocolo modificado de avaliação da capacidade de corrida (Koch e Britton, 2001). O protocolo consistiu de três dias alternados de corrida em esteira até a fadiga. A velocidade inicial foi 10m/min., estando a esteira com 15° de inclinação. A cada dois minutos a velocidade foi aumentada em 1m/min. Os animais foram considerados em estado de fadiga

quando permaneciam por 10 segundos sem correr, mesmo sob estímulo manual. O desempenho (capacidade de corrida) de cada animal foi calculado como a média do tempo total de corrida nos três dias.

Quarenta e oito horas após a realização do teste de capacidade de corrida em esteira, a cirurgia de indução do IM foi simulada nos animais do grupo SHAM e realizada nos animais dos grupos INF SED e INF EX, conforme descrito no item 3.4.

4.4 Indução do infarto do miocárdio

O IM foi induzido conforme descrito por Mill et al. (1990). Resumidamente, os animais foram submetidos à anestesia geral, através de injeção intraperitoneal de Quetamina (Agener União, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Bayer, São Paulo, Brasil), com as respectivas doses de 50 mg/Kg e 10 mg/kg. Quando o padrão anestésico ideal foi atingido, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, incubados e ventilados. O lado esquerdo do tórax foi aberto ao nível do quarto espaço intercostal, por onde o coração foi rapidamente exteriorizado. Após visualização da artéria coronária descendente anterior esquerda, logo abaixo da borda do átrio esquerdo, um fio de mononylon 6.0 (Medline, Brasil) ligado a uma agulha não traumática foi utilizado para fazer a ligadura permanente dessa artéria. O coração foi imediatamente reposicionado e o tórax fechado com uma sutura do tipo U deitado.

Foram considerados infartados os animais que apresentaram onda Q patológica na derivação eletrocardiográfica D1 24 horas após o procedimento de ligadura e cicatriz de infarto no dia da eutanásia.

A simulação da cirurgia realizada no grupo SHAM consistiu do mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda.

4.5 Coleta da amostra

Quinze dias após a indução do infarto seis animais de cada grupo sofreram eutanásia pela utilização de CO₂. O coração de cada animal foi removido, lavado em solução contendo 750 mM de CaCl₂ para retirar o excesso de sangue e pesado

em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200), imediatamente antes da perfusão das soluções para isolamento dos cardiomiócitos, conforme descrito no item 3.6. O índice de cardiosomático (hipertrofia cardíaca) foi calculado pela razão do peso do coração pelo peso corporal.

Os demais animais de cada grupo foram anestesiados para obtenção dos registros hemodinâmicos, conforme descrito no item 3.7. Após este procedimento os animais tiveram o coração removido para posterior análise histológica, conforme descrito no item 3.8.

4.6 Isolamento dos miócitos cardíacos

Miócitos do ventrículo esquerdo foram isolados conforme descrito por Carneiro-Junior (2009). Resumidamente, a aorta foi canulada e o coração foi perfundido com a solução de isolamento, contendo 750 mM de CaCl₂ (solução A, item 3.6.3), em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos de sangue. Em seguida, trocou-se a perfusão para a solução livre de cálcio contendo 0,1 mM *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA)* (solução B, item 3.6.3), durante 6 minutos, para destruição das bandas escalariformes entre os miócitos cardíacos. Em seguida, o coração foi perfundido com a solução contendo 1 mg.ml⁻¹ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) e 100 mM de CaCl₂ (solução C, item 3.6.3) durante 20 minutos, para a destruição das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O₂ 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 35°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios. O ventrículo direito foi removido e o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram removidos manualmente da superfície do ventrículo esquerdo. Em seguida, fragmentos de 2 milímetros (mm) de espessura foram coletados a partir da região infartada. As amostras foram colocadas em frascos contendo 5 ml da solução enzimática (colagenase) suplementada com 1% de albumina sérica bovina (solução D, item 3.5.3). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O₂ 100% – White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado

(3000 rpm) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e os miócitos cardíacos foram suspensos na solução 750 mM de CaCl_2 (solução A, item 3.6.3). Esse processo foi repetido 3 vezes. Os miócitos cardíacos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

4.6.1 Comprimento, largura e volume celular

As dimensões dos cardiomiócitos foram medidas conforme descrito por Carneiro-Junior (2009). Resumidamente, os miócitos cardíacos foram acomodados em uma câmara experimental e banhados com solução de perfusão tampão (item 3.6.4) à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). As imagens das células foram visualizadas horizontalmente (aumento de 400x - lente de imersão em óleo S Flúor) no monitor de um microcomputador através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se um programa de captação de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento celular foi determinado medindo-se a imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda. A largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior, no ponto médio dos miócitos cardíacos (Figura 1).

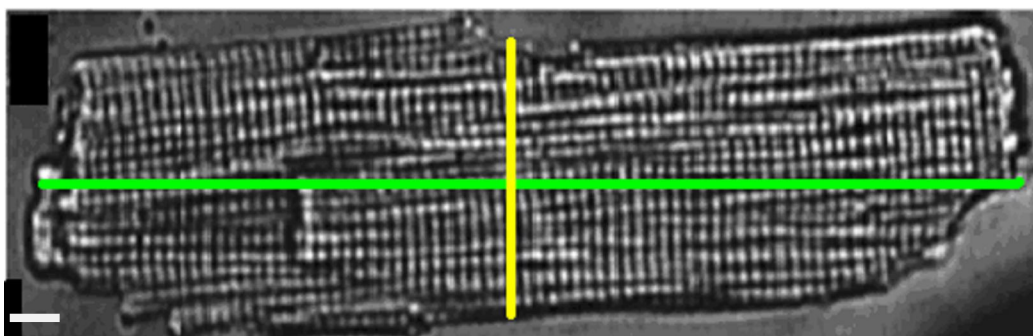


Figura 1. Representação dos pontos de medição da imagem dos miócitos cardíacos. Barra com comprimento de $10\ \mu\text{m}$. As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (verde) e a largura (amarelo) (Carneiro-Junior, 2009).

Para a realização das medições do comprimento e da largura dos miócitos cardíacos, utilizou-se uma régua com precisão de 1 mm. Na calibração do sistema de captação de imagens cada centímetro correspondia a $12\ \mu\text{m}$. Somente foram escolhidas para as medições, as células que estavam em boas condições, com as

bordas (direita/esquerda e superior/inferior) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentar contrações voluntárias.

O volume celular, dado em picolitros, foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al. (1996):

$$\text{Volume (pL)} = \text{comprimento } (\mu\text{m}) \times \text{largura } (\mu\text{m}) \times (7,59 \times 10^{-3} \text{ pL}/\mu\text{m}^2)$$

Onde $7,59 \times 10^{-3} \text{ pL}/\mu\text{m}^2$ é uma constante obtida pela medida direta do volume celular através de microscopia confocal, dada em picolitros por micrômetro quadrado, conforme Satoh et al. (1996).

4.6.2 Contração celular

As contrações dos cardiomiócitos foram mensuradas conforme descrito por Carneiro-Junior (2009). Utilizou-se a técnica de alteração do comprimento dos miócitos cardíacos usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão). Os cardiomiócitos foram acomodados na câmara experimental e banhados por solução de perfusão tampão com diferentes concentrações de cálcio (item 3.6.4), em temperatura ambiente (~ 25°C), e estimulados externamente nas frequências de 0,5 e 3 Hz (10 Volts, duração de 5 ms). A estimulação foi feita através de um par de eletrodos de aço, acoplado nos dois lados internos da câmara, usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). Os miócitos foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA - frequência de 240 Hz). As bordas dos miócitos cardíacos, em movimento de encurtamento e relaxamento em resposta aos estímulos, foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) alinhadas ao longo do comprimento das células. A definição das bordas foi ajustada através do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada dos miócitos cardíacos (Figura 2). Os movimentos das bordas dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA, Figura 2) e armazenados para análise posterior.

Foram utilizados para mensuração das contrações somente os miócitos cardíacos que estavam com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações voluntárias.

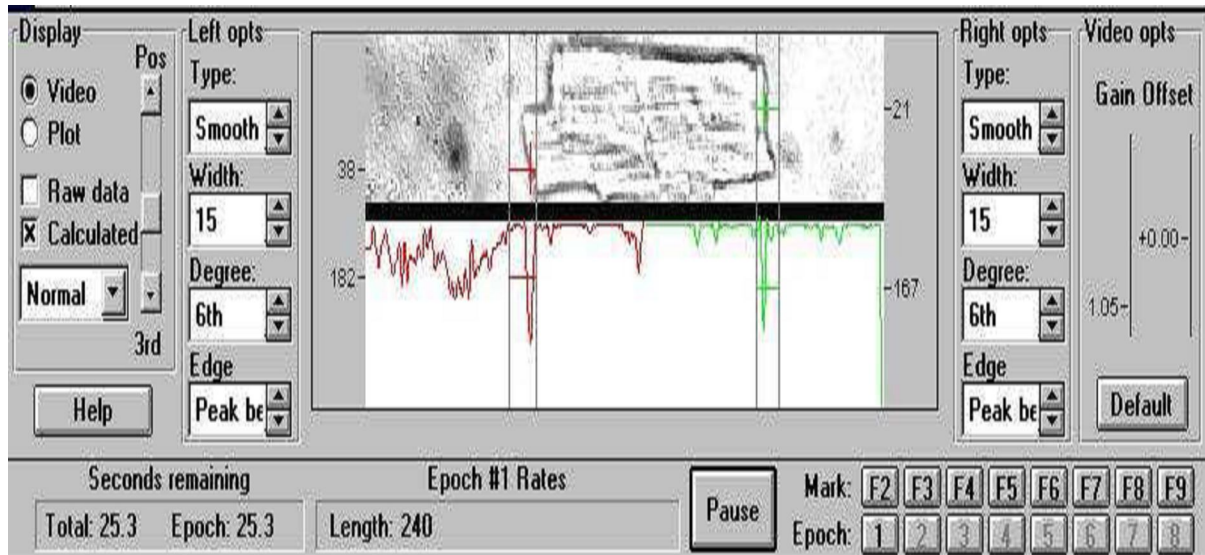


Figura 2. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos miócitos cardíacos. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através do pico verde e do pico vermelho.

Foram analisadas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a velocidade máxima de contração (velocidade pico de encurtamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) e a velocidade máxima de relaxamento (velocidade pico de relaxamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) (Figuras 3 e 4).

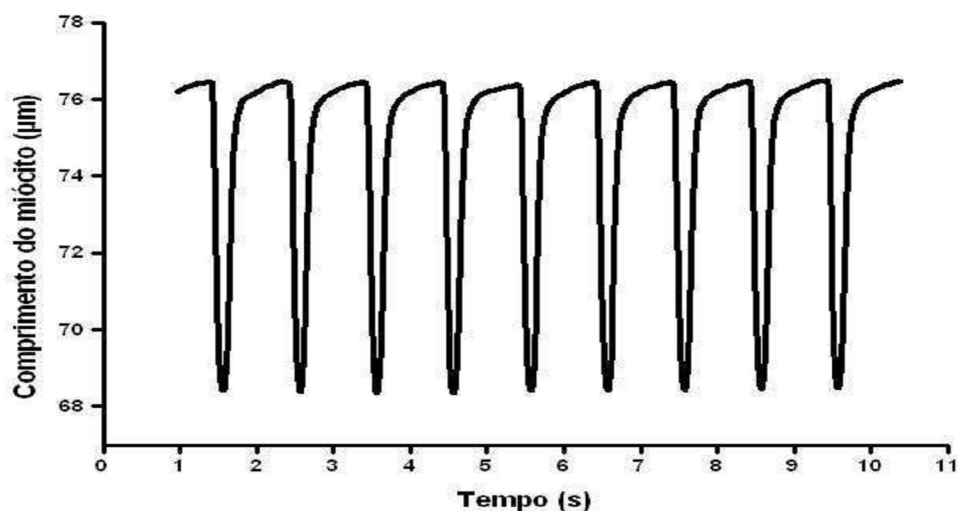


Figura 3. Registro experimental de contrações de um miócito cardíaco do ventrículo esquerdo estimulado na frequência de 1 Hz (Carneiro-Junior, 2009).

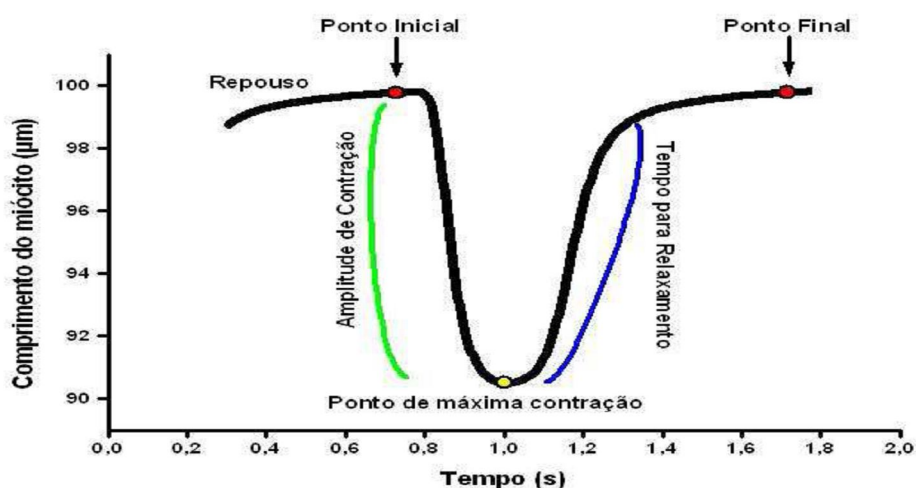


Figura 4. Diagrama demonstrativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz e dos respectivos parâmetros da contração analisados (Carneiro-Junior, 2009).

4.6.3 Soluções de isolamento

As soluções utilizadas para o isolamento dos miócitos cardíacos ventriculares foram feitas usando-se uma solução básica com água milli-Q e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl₂ (1,43) – 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; *N*-2- hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (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 se fazer a solução de isolamento contendo Ca^{+2} , foram adicionados 375 μl de CaCl_2 (1 M) em 500 ml da solução básica.

Solução B:

Para a solução de isolamento livre de Ca^{+2} , foram adicionados 250 μl de EGTA (100mM) 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_2 (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 albumina foi adicionado para cada 10 ml da solução enzimática C.

4.6.4 Solução de perfusão tampão HEPES

Durante as análises morfológica e mecânica, os miócitos cardíacos foram banhados com a solução de perfusão tampão HEPES nas concentrações de cálcio de 0,6, 1 e 5 mM. Para o preparo de 1 litro dessa solução foi utilizado 100 ml de solução estoque (NaCl – 65,99 g/l; HEPES – 11,9 g/l; NaH_2PO_4 – 1,42 g/l; MgSO_4 – 2,46 g/l; KCl – 3,72 g/l), 10 ml de solução sopa (Na acetato – 16,4 g/100 ml; glicose – 18,1 g/100 ml; insulina (5 u/l) – 0,5 g/100 ml) e 0,6, 1 ou 5 ml de CaCl_2 , para concentrações de cálcio de 0,6, 1 e 5 mM, respectivamente, e completado com água milli-Q. Esta solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

4.7 Registros hemodinâmicos

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura contendo Quetamina (Agener União, São Paulo, Brasil) na dose de 70 mg/Kg e Xilazina (Bayer, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/Kg. Após constatação da perda dos reflexos, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica tendo os membros fixados com fita adesiva. Foi realizada uma tricotomia no lado direito do pescoço, seguida de uma incisão de aproximadamente 1,5 centímetros (cm), realizada para localização e acesso aos vasos a serem cateterizados. O procedimento de dissecação foi realizado na artéria carótida comum direita, com extremo cuidado para não lesar os nervos que se projetam junto ao vaso. Após uma pequena incisão na artéria carótida, um cateter PE 50, previamente heparinizado e conectado ao transdutor, foi inserido no vaso. Após o registro da pressão arterial, o cateter foi avançado até o ventrículo esquerdo onde o registro foi realizado por um período de aproximadamente 10 minutos.

Os parâmetros avaliados pelo cateterismo cardíaco foram: pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), pressão sistólica no VE (LVSP), pressão diastólica final no VE (LVEDP), derivada máxima de pressão ($dP/dt+$) e derivada mínima de pressão do ventrículo esquerdo ($dP/dt-$), como demonstrado na figura 5. Os registros foram digitalizados para posterior análise usando o software Chart v. 5.5 (ADInstruments INC, Austrália).

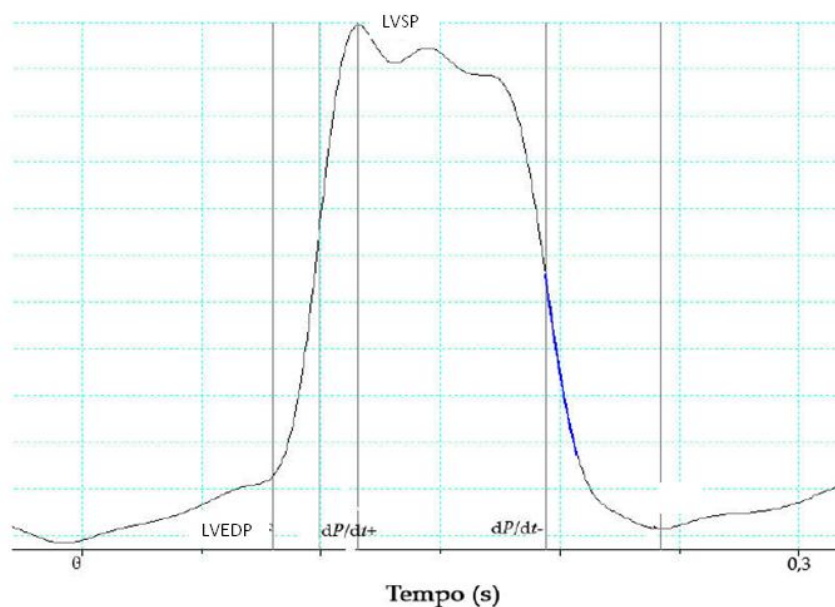


Figura 5. Registro típico de uma onda de pressão no ventrículo esquerdo, mostrando os pontos de análise. LVEDP, pressão diastólica final no VE; LVSP, pressão sistólica no VE; $dP/dt+$, derivada máxima de pressão; $dP/dt-$, derivada mínima de pressão do ventrículo esquerdo.

4.8 Análise Histológica

Após a realização dos registros hemodinâmicos os animais foram sacrificados e os corações removidos para avaliação da extensão do infarto, conteúdo de colágeno e densidade vascular. Para tal, o coração foi cortado em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3mm) e base. Estes fragmentos foram imediatamente fixados em formalina 4% por 24 horas e depois submetidos ao processamento histológico de rotina (desidratação, diafanização e impregnação) para inclusão em parafina.

Em seguida, as secções foram cortadas em 5 μm de espessura, com intervalo de 100 μm , utilizando um micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha). Para cada tipo de coloração foram montadas 3 lâminas histológicas, cada uma contendo 4 cortes.

Para análise da extensão do infarto e conteúdo de colágeno os cortes foram corados com Picrosirius. Foi utilizado um scanner (HP deskjet F380, EUA) para

captura das imagens destinadas à análise da extensão do infarto. O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado utilizando a seguinte fórmula (Mulder et al., 2002):

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

CEN = perímetro da cicatriz endocárdica

PEN = perímetro endocárdico total

CEP = perímetro da cicatriz epicárdica

PEP = perímetro epicárdico total.

O tamanho do infarto dos grupos (porcentagem do ventrículo esquerdo infartado) foi calculado pela média de todos os cortes e foi expresso como porcentagem da extensão. Apenas infartos maiores que 30% foram incluídos neste estudo.

Para quantificação do colágeno no tecido cardíaco as imagens foram capturadas utilizando uma câmera (Spot Insight Color, Diagnostic Instruments - EUA) acoplada a um microscópio de luz polarizada (Olympus AX-70[®], Tóquio, Japão). Dois campos, sendo um da região da borda da área infartada e outro da região remota (septo ventricular), foram aleatoriamente escolhidos da parte medial do miocárdio sobrevivente. A análise da concentração de colágeno presente em cada imagem foi realizada utilizando-se um sistema de teste de 72 pontos em uma área de 0,15 mm² (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Para análise da densidade vascular os cortes foram corados com Tricrômico de Masson e as imagens capturadas utilizando-se uma câmera (Olympus QColor-3[®], Tóquio, Japão) conectada a um microscópio de luz (Olympus BX-60[®], Tóquio, Japão). Dois campos, sendo um da região da borda da área infartada e outra da região remota, foram randomicamente escolhidos (objetiva x20). A contagem dos vasos sanguíneos em cada imagem foi realizada utilizando-se um sistema de teste de 100 pontos em uma área de 0,31 mm² (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software SigmaStat 3.5 e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a comparação da capacidade de corrida dos animais exercitados e sedentários foi utilizado teste t para amostras independentes. A sobrevivência dos animais foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e log-rank teste (Mantel-Cox), enquanto, a comparação das demais variáveis entre os grupos experimentais foi realizada utilizando-se o teste de análise de variância ANOVA one-way, seguida do teste *post-hoc* de Tukey para amostras paramétricas e Dunn`s para amostras não paramétricas. Adotou-se o nível de significância de $P < 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1 Capacidade de corrida

Os ratos exercitados correram por um tempo significativamente maior, em comparação com os sedentários, conforme apresentado na Figura 6 (Sedentários – $8,8 \pm 0,77$ min. vs Exercitados – $19,42 \pm 0,67$ min.).

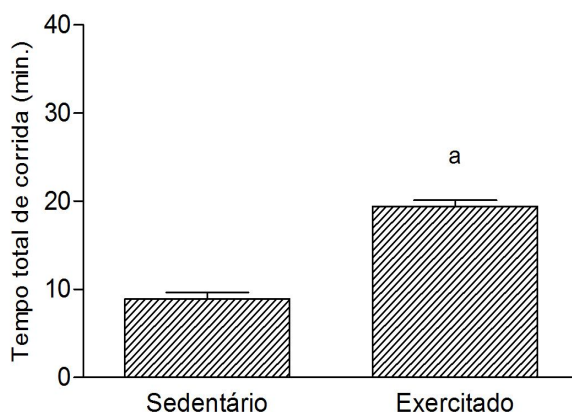


Figura 6. Tempo total de corrida no teste de capacidade de corrida em esteira. a = estatisticamente diferente de sedentário. Dados expressos em Média \pm EPM ($P < 0,05$).

Este resultado indica que o programa de exercício físico aplicado foi capaz de promover adaptações que resultaram na melhora da capacidade de corrida destes animais. A capacidade de corrida está diretamente relacionada com o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) dos animais. Conforme demonstrado por Prímola-Gomes et al. (2009), ratos com alta capacidade de corrida apresentam VO_{2max} significativamente maior em comparação com os de baixa capacidade. Portanto, sugere-se que a capacidade de corrida aumentada em resposta ao exercício físico, observada no presente estudo, está associada com o aumento no VO_{2max} dos animais exercitados.

5.2 Características gerais dos animais

Os resultados referentes às características gerais dos animais nos períodos específicos de análise estão apresentados na Tabela 2. No início do experimento nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos

experimentais, fato que indica homogeneidade entre os grupos. Da mesma forma, não houve diferença no peso corporal final entre os grupos.

Tabela 2. Características gerais dos animais.

	SHAM	INF SED	INF EX
Peso corporal inicial (g)	120,25 ± 4,22	117,12 ± 1,20	121,50 ± 2,92
Peso corporal final (g)	377,00 ± 6,75	360,37 ± 12,41	345,10 ± 12,47
Peso do coração (g)	1,90 ± 0,10	2,40 ± 0,11 ^a	2,54 ± 0,12 ^a
Peso relativo coração (mg/g)	5,04 ± 0,26	6,67 ± 0,26 ^a	7,53 ± 0,46 ^a

Dados expressos em Média ± EPM. SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado. a = estatisticamente diferente de SHAM (P<0,05).

O peso coração e o peso relativo do coração (índice de hipertrofia cardíaca) não diferiram entre os grupos INF SED e INF EX. Porém, nos animais infartados estes parâmetros foram significativamente maiores em comparação com os ratos normais.

Todos os animais apresentaram ganho de peso corporal até o final do experimento, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os resultados do presente estudo, corroboram o dados apresentados por outros autores (Brown et al.,2003; Freimann et al., 2005) e sugerem que, apesar do modelo de exercício físico diferir entre os estudos, a atividade física realizada antes da indução do IM não interfere no ganho de peso corporal.

O aumento do peso do coração e do peso relativo do coração nos animais com IM sugere que essa patologia promoveu hipertrofia do músculo cardíaco. A hipertrofia cardíaca apresentada por corações acometidos pelo IM pode ser explicada pela dilatação do ventrículo esquerdo e síntese de colágeno aumentada, devido ao processo de remodelamento cardíaco causado pela morte de parte das células do miocárdio (Swynghedauw, 1999; Sutton & Sharpe, 2000; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008).

Além disso, a ausência de diferença estatisticamente significativa no peso do coração e peso relativo do coração entre os grupos INF SED e INF EX sugere que o programa de corrida em esteira aplicado não teve efeito, do ponto de vista

macroscópico, sobre o processo de remodelamento cardíaco observado em animais infartados. Porém, o exercício físico é capaz provocar alterações cardíacas que não podem ser evidenciadas pelo peso do coração, como por exemplo, redução do conteúdo de colágeno intersticial (de Waard et al., 2007) e da dilatação do ventrículo esquerdo (Orenstein et al., 1995).

5.3 Extensão do infarto

A figura 8 apresenta imagens representativas dos corações dos grupos experimentais. Estes tecidos foram corados com a técnica histológica picrossirius, pela qual a área infartada é corada em vermelho.



Figura 8. Fotomicrografias representativas da parte medial dos corações em corte transversal corados com picrossirius. A região infartada apresenta-se corada em vermelho. As setas indicam o ventrículo esquerdo. Barra = 20 mm. SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado.

O tamanho médio das áreas infartadas observado nos animais dos grupos INF SED e INF EX estão representados na Figura 9. Os animais do grupo INF SED apresentaram área de infarto (extensão do IM) significativamente maior, em comparação com a do grupo INF EX (INF SED – $42,90 \pm 2,12$ % vs INF EX – $38,22 \pm 1,52$ %).

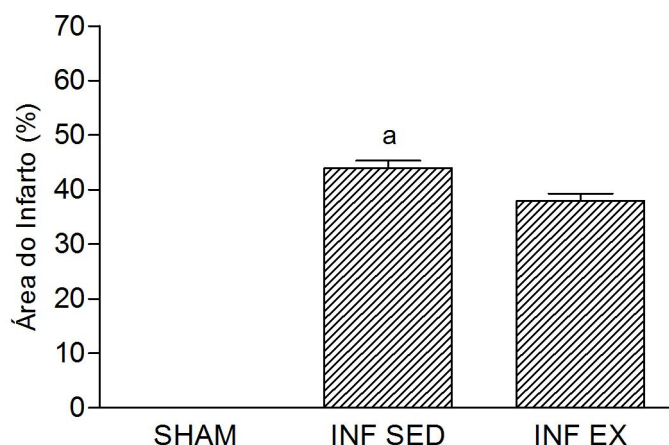


Figura 9. Área do infarto nos grupos experimentais. Dados expressos em Média \pm EPM. SHAM, infarto simulado. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado. a = estatisticamente diferente de INF EX ($P < 0,05$).

Os resultados demonstram que a técnica de indução do IM utilizada nesse trabalho foi eficiente. Todavia, o programa de corrida em esteira foi capaz de reduzir a extensão do IM.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a cardioproteção promovida pela atividade física contra o IM. McElroy et al. (1978) e Freimann et al. (2005) demonstraram que a redução no tamanho do IM pode ser explicada, em parte, pelo aumento da densidade vascular do miocárdio. A melhora da capacidade antioxidante do miocárdio em resposta ao exercício (ex. aumento da atividade da superóxido dismutase, glutationala peroxidase e catalase) também tem sido apontada como um possível mecanismo envolvido na cardioproteção contra o IM (Powers et al., 2008). Além disso, o aumento da HSP 72 induzido pelo exercício físico atenuou os efeitos deletérios da isquemia/reperfusão (Marini et al., 2007).

Embora os mecanismos responsáveis pela redução do tamanho do IM em animais previamente exercitados ainda não estejam totalmente esclarecidos, nossos dados sugerem que o exercício físico regular prévio promove um efeito cardioprotetor importante em animais acometidos pelo IM.

5.4 Sobrevivência

Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de sobrevivência dos animais entre os grupos SHAM, INF SED e INF EX (SHAM – 100%; INF SED – 75%; INF EX – 85%).

Os animais infartados apresentaram uma taxa de mortalidade de 25%. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa para os demais grupos.

A redução da mortalidade de animais com IM em resposta ao treinamento físico realizado antes da indução dessa patologia tem sido demonstrada por outros estudos (de Waard & Duncker, 2009). Entretanto, a ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais observadas nesse estudo pode ter ocorrido devido a limitações experimentais, como por exemplo, o número de animais utilizados.

5.5 Conteúdo de colágeno

Os cortes corados com picosirius, quando observados ao microscópico de luz polarizada, permitem a análise do colágeno intersticial. Nesta técnica o colágeno core-se em tons de vermelho, verde ou amarelo, conforme demonstrado na Figura 10.

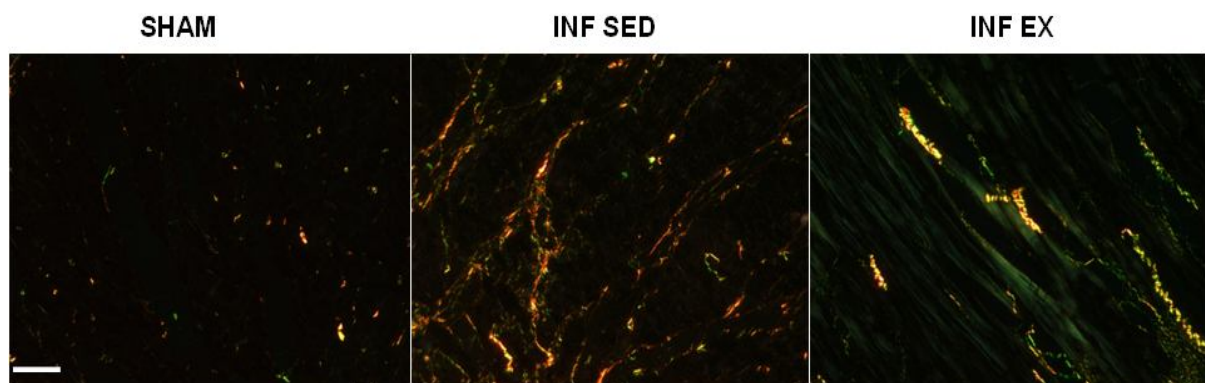


Figura 10. Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais. Tecido corado com Picrosirius, onde o colágeno cora-se em tons de vermelho a verde. O fundo escuro compreende regiões de músculo cardíaco e áreas intersticiais não ocupadas pelo colágeno. Barra = 50 μ m. SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado.

A concentração de colágeno no VE foi significativamente maior no grupo INF SED ($0,26 \pm 0,006 \text{ n}^\circ/\text{mm}^2$), em comparação com a do grupo SHAM ($0,05 \pm 0,002 \text{ n}^\circ/\text{mm}^2$). Entretanto, o conteúdo de colágeno foi menor nos animais do grupo INF EX ($0,13 \pm 0,005 \text{ n}^\circ/\text{mm}^2$), quando comparados o do grupo INF SED (Figura 11).

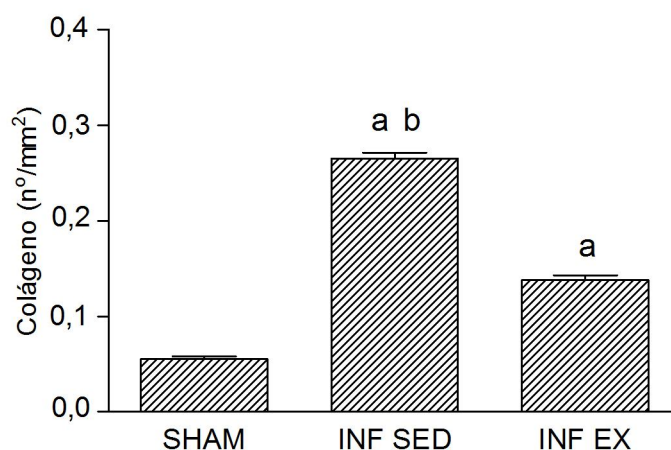


Figura 11. Concentração de colágeno no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em Média \pm EPM. a = estatisticamente diferente de SHAM e b = estatisticamente diferente de INF EX ($P < 0,05$). SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado.

A morte dos cardiomiócitos provocada pelo IM inicia uma série de eventos celulares e moleculares, os quais fazem parte de uma resposta para reparar a área lesada. Esses eventos podem ser divididos em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (Dobaczewski et al., 2009). De forma geral, esse processo tem como objetivo substituir os cardiomiócitos mortos por uma cicatriz constituída basicamente de colágeno.

No presente estudo os animais exercitados antes da indução do IM apresentaram uma redução no conteúdo de colágeno reativo. Uma das possíveis vias envolvidas na redução do colágeno intersticial é a diminuição da tensão sobre a parede do VE. Neste sentido, Orenstein et al. (1995) reportaram que o exercício físico regular foi capaz de reduzir o pico de tensão sobre o miocárdio em animais infartados exercitados. Além disso, foi demonstrado que animais com insuficiência cardíaca submetidos ao exercício físico apresentaram aumento na sensibilidade dos barorreceptores e do tônus vagal, além de redução na atividade simpática, o que explica, pelo menos em parte, a diminuição do estresse cardíaco em resposta ao

exercício físico (Kiilavuori et al., 1995; Sun et al., 1999; Liu et al., 2000; Pliquet et al., 2003). Todavia, estes parâmetros não foram avaliados no presente estudo.

A redução da fibrose tecidual promovida pelo exercício físico também deve-se a alterações no balanço entre síntese e degradação dos constituintes da MEC. As MMPs (metaloproteinase da matriz) são proteinases que atuam na degradação da MEC. Essas enzimas são reguladas pelas TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinase da matriz), os quais inibem sua atividade, permitindo o acúmulo de colágeno no miocárdio. Xu et al. (2008; 2008a) reportaram que o exercício físico diminuiu a concentração de TIMP-1 em ratos com IM experimental. Esse fenômeno reduziu a fibrose tecidual no miocárdio destes ratos, pois aumentou a degradação do colágeno, devido a uma maior atividade das MMPs. Além disso, os autores sugeriram que a redução no conteúdo de colágeno também está relacionada com a atenuação do sistema renina-angiotensina cardíaco, conforme observado pela diminuição da concentração de receptores de angiotensina II do tipo 1 e de RNAm da enzima conversora de angiotensina em resposta ao exercício físico.

A redução da fibrose no miocárdio sobrevivente tem importância direta sobre a função cardíaca de corações infartados (Xu et al., 2008; de Waard & Duncker, 2009). Portanto, os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que o exercício físico regular realizado previamente ao IM pode atenuar os efeitos deletérios decorrentes do remodelamento cardíaco sobre a função de corações infartados.

5.6 Densidade vascular

A figura 12 mostra as fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais.

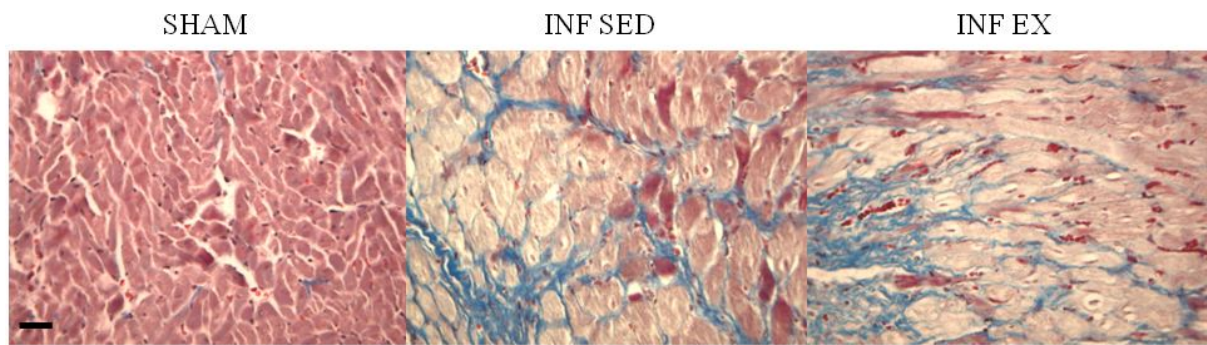


Figura 12. Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais. Tecido corado com Tricrômico de Masson onde os cardiomiócitos aparecem em rosa, as fibras colágenas em azul e as hemácias em vermelho. Barra = 20 μ m. SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado.

Conforme dados médios apresentados na figura 13, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais em relação à densidade vascular analisada 15 dias após a indução do IM (SHAM – $0,045 \pm 0,003$ n°/mm^2 vs INF SED – $0,041 \pm 0,002$ n°/mm^2 vs INF EX – $0,041 \pm 0,003$ n°/mm^2).

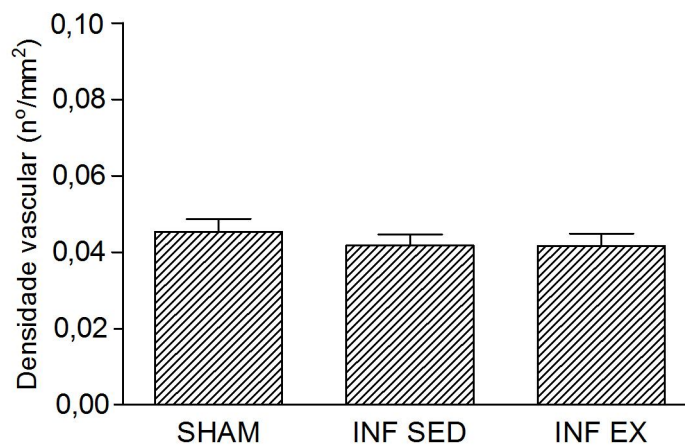


Figura 13. Densidade vascular do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em Média \pm EPM. SHAM, controle sedentário. INF SED, infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado.

Estes dados sugerem que o IM não alterou a vascularidade do miocárdio. Resultados semelhantes foram observados por outros estudos (de Waard & Duncker, 2009).

O programa de exercício físico prévio utilizado no presente estudo também não teve efeito sobre a densidade vascular de ratos com IM induzido. O aumento da vascularidade do miocárdio induzida pelo exercício físico realizado antes da indução do IM é sugerido como um dos principais mecanismos envolvidos na cardioproteção (McElroy et al., 1978; Freimann et al., 2005). Entretanto, resultados semelhantes aos do presente estudo foram reportados por outros trabalhos, os quais demonstraram que o exercício físico prévio não foi capaz de alterar a densidade vascular em ratos saudáveis e infartados (Duncker & Bache et al., 2008 de Waard & Duncker, 2009). As divergências entre os resultados dos estudos podem estar relacionadas com variações nas condições experimentais, como, por exemplo, os diferentes protocolos de exercício físico utilizados.

Portanto, especula-se que outras vias, como por exemplo, aumento nos níveis das HSPs (Marini et al., 2007) e de enzimas da via oxidativa (Powers et al., 2008), podem estar envolvidas na cardioproteção induzida pelo exercício físico observada no presente estudo.

5.7 Propriedades morfológicas dos miócitos cardíacos isolados

Os resultados da morfologia celular estão apresentados na tabela 3. O comprimento dos miócitos cardíacos do VE dos animais do grupo INF SED foi significativamente maior em comparação com o dos animais do grupo SHAM. O exercício físico, por sua vez, foi capaz de aumentar o comprimento das células cardíacas no grupo INF EX quando comparado ao dos grupos SHAM e INF SED.

Tabela 3. Propriedades morfológicas dos miócitos cardíacos do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Relação	
			comprimento/largura (cm)	Volume (μl)
SHAM	146,82 \pm 2,18	20,67 \pm 0,43	7,54 \pm 0,20	23,00 \pm 0,58
INF SED	157,87 \pm 2,34 ^a	19,76 \pm 0,53	8,61 \pm 0,21 ^a	23,80 \pm 0,79
INF EX	169,67 \pm 2,02 ^{ab}	21,32 \pm 0,44 ^b	8,53 \pm 0,19 ^a	27,39 \pm 0,63 ^{ab}

Dados expressos em Média \pm EPM. SHAM, controle sedentário. INF SED infartado sedentário. INF EX, infartado exercitado. a = estatisticamente diferente de SHAM ($P < 0,05$); b = estatisticamente diferente de INF SED ($P < 0,05$).

O IM não promoveu nenhuma alteração na largura celular (SHAM vs. INF SED). Contudo, o protocolo de corrida em esteira aplicado nesse trabalho promoveu o aumento da largura dos cardiomiócitos (INF SED vs. INF EX).

A relação comprimento/largura foi maior nos grupos com indução do IM, em comparação com o grupo SHAM. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos INF EX e INF SED.

Observa-se também que o volume celular não foi alterado pelo IM (SHAM vs. INF SED). Mas, por outro lado, os cardiomiócitos dos animais infartados exercitados apresentaram maior volume, quanto aos dos infartados sedentários (INF SED vs. INF EX).

O aumento do comprimento celular em resposta ao IM é resultado da perda aguda de miócitos cardíacos da região isquêmica, a qual conduz um rearranjo estrutural dos grupos de células cardíacas remanescentes e expansão do VE (Swynghedauw, 1999; Sutton & Sharpe, 2000). Esta adaptação progride com o avanço do remodelamento cardíaco, tornando-se mais evidente após algumas semanas de indução do infarto (Mork et al., 2007; Mork et al., 2009).

O aumento do comprimento celular observado no grupo INF EX pode ser devido ao efeito de dois fenômenos combinados: o rearranjo estrutural do ventrículo esquerdo decorrente do IM e o estresse sobre a parede do miocárdio devido à sobrecarga volumétrica provocada pelo exercício físico (Diffie, 2004). Esse tipo de estresse fisiológico promove uma série de adaptações no miocárdio, as quais estão

relacionadas com o aumento da dimensão interna do VE (Gerdes & Capasso, 1995; Atchley et al., 2007; McMullen & Jennings, 2007). Essa resposta hipertrófica de natureza excêntrica é evidenciada também em nível celular (Moore et al., 1993; Palmer & Moore, 1996; Mokolke et al., 1997; Palmer et al., 1998).

Contudo, uma limitação desse estudo foi a ausência de análise do diâmetro da cavidade ventricular esquerda, através da qual seria possível identificar se o aumento observado no comprimento dos cardiomiócitos de animais exercitados tem relação com uma possível dilatação do ventrículo esquerdo observado em corações acometidos pelo IM ou se este resultado é apenas uma resposta hipertrófica induzida pelo exercício físico.

No presente estudo, o IM não teve nenhum efeito sobre a largura celular. Este resultado corrobora aqueles reportados por Zhang et al. (2000) pois, não verificaram alterações na largura celular em cardiomiócitos de ratos infartados experimentalmente.

O volume celular tem relação direta com o comprimento e a largura dos cardiomiócitos (Sato et al., 1996). Neste sentido, os dados do presente estudo demonstram que, apesar do aumento no comprimento celular nos animais do grupo INF SED, o IM não teve efeito estatisticamente significativo sobre o volume celular. Isto indica que o aumento no comprimento celular não foi suficiente para aumentar o volume celular. Nos animais infartados exercitados, todavia, o aumento no volume celular é reflexo direto do aumento das dimensões celulares (comprimento e largura). Essa resposta hipertrófica pode ser devido ao aumento de síntese protéica induzida pelo exercício físico, como por exemplo, de proteínas constituintes dos miofilamentos, como demonstrado por Diffie & Nagle (2003), Hashimoto et al. (2004).

A relação comprimento/largura foi maior nos animais dos grupos INF SED e INF EX em comparação com a dos animais SHAM. Isto indica que ambos os grupos apresentaram hipertrofia celular de característica excêntrica.

5.8 Propriedades mecânicas dos miócitos cardíacos

Optou-se por apresentar apenas os cardiomiócitos que apresentaram uma relação positiva entre frequência de estimulação e amplitude de contração. Alguns

cardiomiócitos ventriculares de ratos podem apresentar esta relação negativa (Natali et al., 2001), fato que pode mascarar os resultados.

No presente estudo as propriedades contráteis dos cardiomiócitos foi avaliada em diferentes $[Ca^{+2}]_e$, sendo elas de 0,6, 1 e 5 mM. Primeiramente, a contractilidade celular foi verificada na $[Ca^{+2}]_e$ de 1 mM. Contudo, objetivando verificar possíveis alterações no influxo e efluxo de Ca^{+2} na célula, analisamos a contração dos cardiomiócitos em condições de baixa e alta $[Ca^{+2}]_e$ (0,6 e 5 mM, respectivamente). Quando a $[Ca^{+2}]_e$ está baixa há um aumento da saída desse íon da célula. Em contrapartida, a elevada $[Ca^{+2}]_e$ favorece o influxo de Ca^{+2} durante o processo de acoplamento excitação-contração.

A freqüência de estímulo também tem papel importante no favorecimento da entrada ou saída do Ca^{+2} da célula. Estudos têm demonstrado que há uma relação positiva entre freqüência de estimulação e amplitude de contração. Isso ocorre, pois o aumento da freqüência de estimulação eleva o influxo de Ca^{2+} via canais de cálcio tipo L por unidade de tempo. Além disso, também há um aumento do influxo de Na^+ por unidade de tempo, que por conseqüência, aumenta a entrada de Ca^{2+} via NCX. Em contra partida a saída de Ca^{2+} pelo NCX é reduzida. Esse evento aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ e estimula a liberação de Ca^{2+} pelo RS, resultando em maior amplitude de contração (Langer, 1987; Lewartowski & Pytkowski, 1987; Layland & Kentsuh, 1999; Bers et al., 1993; Cook et al. 1997; Natali, 2000).

Entretanto, todos os parâmetros contráteis dos cardiomiócitos analisados nesse estudo responderam de forma semelhante às duas freqüências de estímulo (0,5 e 3 Hz). É possível que isso tenha ocorrido em resposta a baixa temperatura ($\sim 25^\circ C$) na qual as propriedades contráteis dos cardiomiócitos foram analisadas. Tem sido reportado que a redução da temperatura diminui a entrada de Ca^{+2} via canais de Ca^{+2} tipo L, a atividade do NCX e a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} em miócitos cardíacos (Bers, 1991). Esses resultados sugerem que o efeito inotrópico da freqüência de estímulo pode ser reduzido em baixas temperaturas.

5.8.1 Amplitude de contração

A amplitude de contração é apresentada como porcentagem de encurtamento celular (% do comprimento celular de repouso) em resposta à estimulação elétrica.

A figura 14 mostra os resultados da amplitude de contração dos cardiomiócitos dos grupos nas diferentes $[Ca^{+2}]_e$.

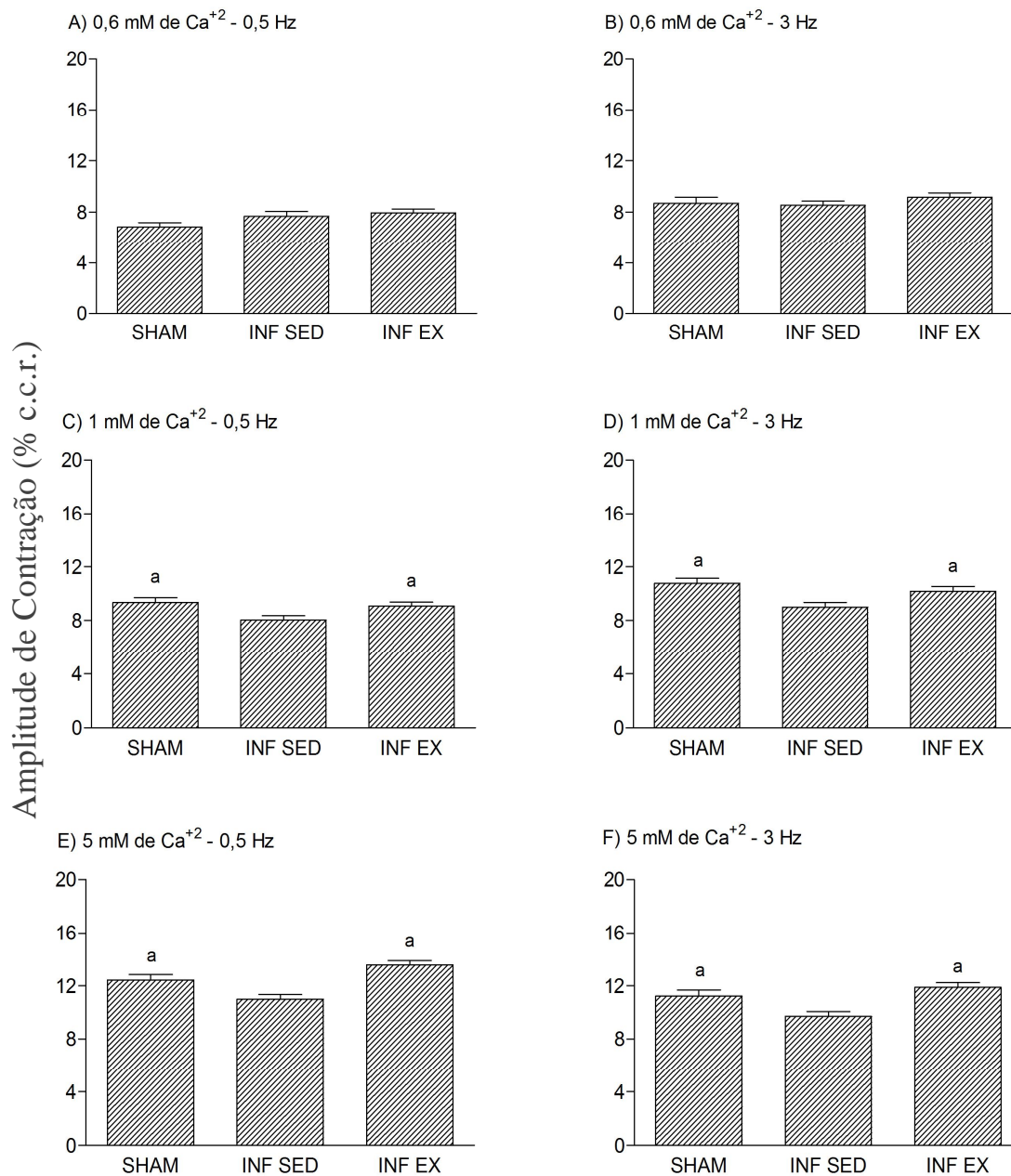


Figura 14. Amplitude de contração celular (% do comprimento celular de repouso – c.c.r.) de miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais medida com diferentes concentrações externas de cálcio (Ca^{+2}) e frequências de estímulo. SHAM, controle sedentário (n = 48). INF SED, infartado sedentário (n = 63). INF EX, infartado exercitado (n = 82). a = estatisticamente diferente de INF SED (P<0,05).

Na $[Ca^{+2}]_e$ de 1mM verificou-se que o IM reduziu a amplitude de contração (SHAM vs. INF SED). Entretanto, o exercício físico foi capaz de atenuar os efeitos do IM sobre a amplitude de contração (INF SED vs. INF EX).

Resultado semelhante foi obtido com a $[Ca^{+2}]_e$ de 5 mM. O grupo INF SED apresentou amplitude de contração menor, quando comparado aos grupos SHAM e INF EX. Entretanto, na $[Ca^{+2}]_e$ de 0,6 mM, não houve diferença entre os grupos experimentais (SHAM vs. INF SED vs. INF EX).

Foi observado que na $[Ca^{+2}]_e$ de 1 mM, o IM reduziu a amplitude de contração. Resultados semelhantes foram demonstrados por outros estudos (Li et al., 1995; Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Kim et al., 2002). Diferente de nossos achados, outros pesquisadores não observaram mudanças na amplitude de contração de cardiomiócitos de corações infartados (Gupta et al., 2000; Song et al., 2004; Ahlers et al., 2005; Mackiewicz et al., 2008). Houser e Margulies (2003) discutem a ausência de alterações nas propriedades contráteis de cardiomiócitos de corações acometidos pela falha cardíaca. Segundo os autores, a contração de cardiomiócitos de animais com falha cardíaca pode ser similar a de animais saudáveis, quando analisadas em condições basais. Nesse sentido, foi sugerido que a contração de cardiomiócitos seja analisada sob variações dos estímulos inotrópicos, como por exemplo, variação na $[Ca^{+2}]_e$, frequência e aumento da pré-carga.

Em nível celular, a diminuição da amplitude de contração de cardiomiócitos de animais infartados ocorre em resposta às modificações na $[Ca^{+2}]_i$ intracelular e na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} (Holt et al., 1998; Kim et al., 2002; Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; Ait Mou et al., 2008).

A amplitude do transiente de Ca^{+2} , ou seja, o fluxo desse íon na célula durante cada contração celular tem se mostrado aumentada em resposta ao IM (Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; Mackiewicz et al., 2008). Além disso, os picos de Ca^{+2} sistólico e diastólico também apresentam-se aumentados em cardiomiócitos de corações acometidos por esta patologia. Entretanto, outros autores observaram que o infarto do miocárdio tem um efeito contrário sobre o transiente de Ca^{+2} , no sentido de reduzir a amplitude do fluxo desse íon durante o

processo de contração celular (Holt et al., 1998; Kim et al., 2002; Ait Mou et al., 2008).

Apesar de esses resultados serem contraditórios e se mostrarem insuficientes para explicar a redução da amplitude de contração, devemos analisá-los separadamente e correlacionando-o com o outro parâmetro envolvido na contractilidade intrínseca dos cardiomiócitos, a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} .

Neste sentido, o aumento da amplitude do transiente de Ca^{+2} está relacionado com a redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} (Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002), ou seja, o aumento do fluxo de Ca^{+2} durante a contração celular funciona como um mecanismo compensatório da perda de sensibilidade dos miofilamentos. Contudo, este mecanismo parece não ser suficiente para garantir que os cardiomiócitos de corações infartados tenham uma amplitude de contração similar a de animais saudáveis.

Por outro lado, Holt et al. (1998) sugerem uma outra explicação para redução da amplitude de contração em cardiomiócitos de animais infartados. Eles demonstraram que a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} não foi alterada pelo IM, porém houve uma redução no transiente de Ca^{+2} .

Portanto, a redução da amplitude de contração em animais infartados parece estar relacionada a dois fatores: a) redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} e b) redução da disponibilidade de Ca^{+2} citosólico durante a sístole.

A redução da amplitude de contração nos animais do grupo INF SED serve como base para explicação, pelo menos em parte, de alterações importantes observadas *in vivo*, tais como redução da fração de ejeção, da porcentagem de encurtamento e do desenvolvimento de pressões sistólica, arterial média e sistólica intraventricular, além de aumento da pressão diastólica final intraventricular, todas observadas em animais infartados (Holt et al., 1998; Gupta et al., 2000; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; Ahlers et al., 2005; Ait Mou et al., 2008).

A redução da $[Ca^{+2}]_e$ favorece o efluxo desse íon do citosol a favor do gradiente concentração, ou seja, reduz o conteúdo de Ca^{+2} disponível para contração. Dessa forma, na $[Ca^{+2}]_e$ de 0,6 mM a ausência de diferenças na amplitude de contração observada entre os grupos experimentais pode ser explicada pelas alterações nas proteínas regulatórias do efluxo de Ca^{+2} do citosol.

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, por sua vez, 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.

Entretanto, a homeostase de algumas dessas vias de remoção do Ca^{+2} é alterada pelo IM. Foi reportado que a captação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático é reduzida nos cardiomiócitos de animais infartados, devido a uma menor atividade da SERCA2 (Mackiewicz et al., 2008). Além disso, os níveis dessas proteínas também foram menores nesses animais (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007). A densidade do NCX foi menor nos corações acometidos por esta patologia (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007), o que pode comprometer a remoção do Ca^{+2} do citosol. Por outro lado, a atividade da bomba de Ca^{+2} do sarcolema parece não ser alterada (Dixon et al., 1992).

Alterações nas proteínas regulatórias do influxo de Ca^{+2} nos cardiomiócitos também podem ocorrer em resposta ao IM. A entrada de Ca^{+2} na célula pelos canais de Ca^{+2} tipo L em miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo de corações infartados apresenta-se reduzida (Li et al., 2005) ou inalterada (Holt et al., 1998). No que se refere à entrada de Ca^{+2} via NCX, Gupta et al. (2000), Wisloff et al. (2002) e Sallinen et al. (2007) verificaram que cardiomiócitos de animais infartados apresentam redução do influxo de Ca^{+2} por esse trocador. Além disso, foi demonstrado que a capacidade de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é reduzida em miócitos cardíacos de animais infartados (Yamaguchi et al., 1997).

Isto pode ser devido a uma redução nos níveis de RyR2, como demonstrado por Guo et al. (2003) e Sallinen et al. (2007).

A $[Ca^{+2}]_e$ elevada favorece a entrada desse íon na célula, aumentando, assim, a sua disponibilidade para contração celular. As diferenças na amplitude de contração dos miócitos cardíacos entre os grupos experimentais observadas na $[Ca^{+2}]_e$ de 5 mM foram as mesmas das observadas na $[Ca^{+2}]_e$ de 1 mM. Esse resultado já era esperado, pois, apesar da elevada $[Ca^{+2}]_e$ favorecer o seu influxo, a quantidade de Ca^{+2} que entra nas células é menor nos animais com IM, devido a alterações nas proteínas reguladoras do influxo do Ca^{+2} provocadas por essa patologia (Yamaguchi et al., 1997; Holt et al., 1998; Gupta et al., 2000; Li et al., 2005; Sallinen et al., 2007).

Outro achado importante do presente estudo foi que miócitos cardíacos de animais exercitados antes do IM apresentaram uma maior amplitude de contração, quando comparados ao seu controle sedentário. Esse resultado sugere que o exercício físico regular realizado antes do IM tem efeito cardioprotetor importante, no sentido de atenuar os efeitos deletérios dessa patologia sobre a função contrátil de cardiomiócitos isolados.

A preservação da amplitude de contração observada no grupo INF EX pode estar relacionada com modificações de alguns parâmetros na contratilidade intrínseca dos cardiomiócitos induzidas pelo exercício físico.

Estudos avaliando o efeito do exercício físico sobre a contração de cardiomiócitos isolados demonstraram que células cardíacas de animais exercitados apresentam maior porcentagem de encurtamento (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2007; Wisloff et al., 2009). Esse aumento na capacidade contrátil de cardiomiócitos é explicado, em parte, pelo aumento na amplitude do Ca^{+2} transiente e na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} , além de hipertrofia do aparato contrátil, induzidos pelo exercício físico (Natali et al., 2002; Diffie, 2004; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008; Wisloff et al., 2009).

A preservação da função contrátil das células cardíacas de animais previamente exercitados demonstrada neste estudo serve como base para explicar a capacidade do exercício físico de atenuar a perda da função cardíaca em animais

infartados, como observada em estudos *in vivo* (Dayan et al., 2005; de Waard & Duncker, 2009).

5.8.2 Velocidade máxima de contração

Os dados de velocidade máxima de contração estão apresentados na figura 15. Na $[Ca^{+2}]_e$ de 1 mM, observa-se que o IM não teve efeito sobre a velocidade de contração dos cardiomiócitos (SHAM vs. INF SED) . Contudo, quando comparamos o grupo INF EX com os demais, nota-se que os cardiomiócitos dos animais exercitados previamente contraíram significativamente mais rápidos.

Resultados semelhantes foram obtidos nas concentrações de Ca^{+2} de 0,6 mM (SHAM vs. INF SED vs. INF EX) e de 5 mM (SHAM vs. INF SED vs. INF EX).

Esses resultados demonstram que o IM não promoveu alterações na velocidade de contração celular. Diferente de nossos achados, Holt et al. (1998) e Loennechen et al. (2002) verificaram que a velocidade de contração de miócitos cardíacos isolados de animais infartados apresentou-se reduzida. Em contrapartida, outros autores reportaram que o IM não alterou a velocidade de contração de cardiomiócitos (Anand et al., 1997; Wisloff et al., 2002)

A velocidade de contração está diretamente relacionada com a liberação de Ca^{+2} no citossol durante o processo de contração. Neste sentido, foi demonstrado que alterações em algumas proteínas envolvidas na regulação do influxo de Ca^{+2} no citosol podem reduzir a velocidade de contração em cardiomiocitos isolados de corações de animais infartados. Alguns autores observaram redução nos níveis do RyR2 (Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007) e do NCX (Gupta et al.; 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007).

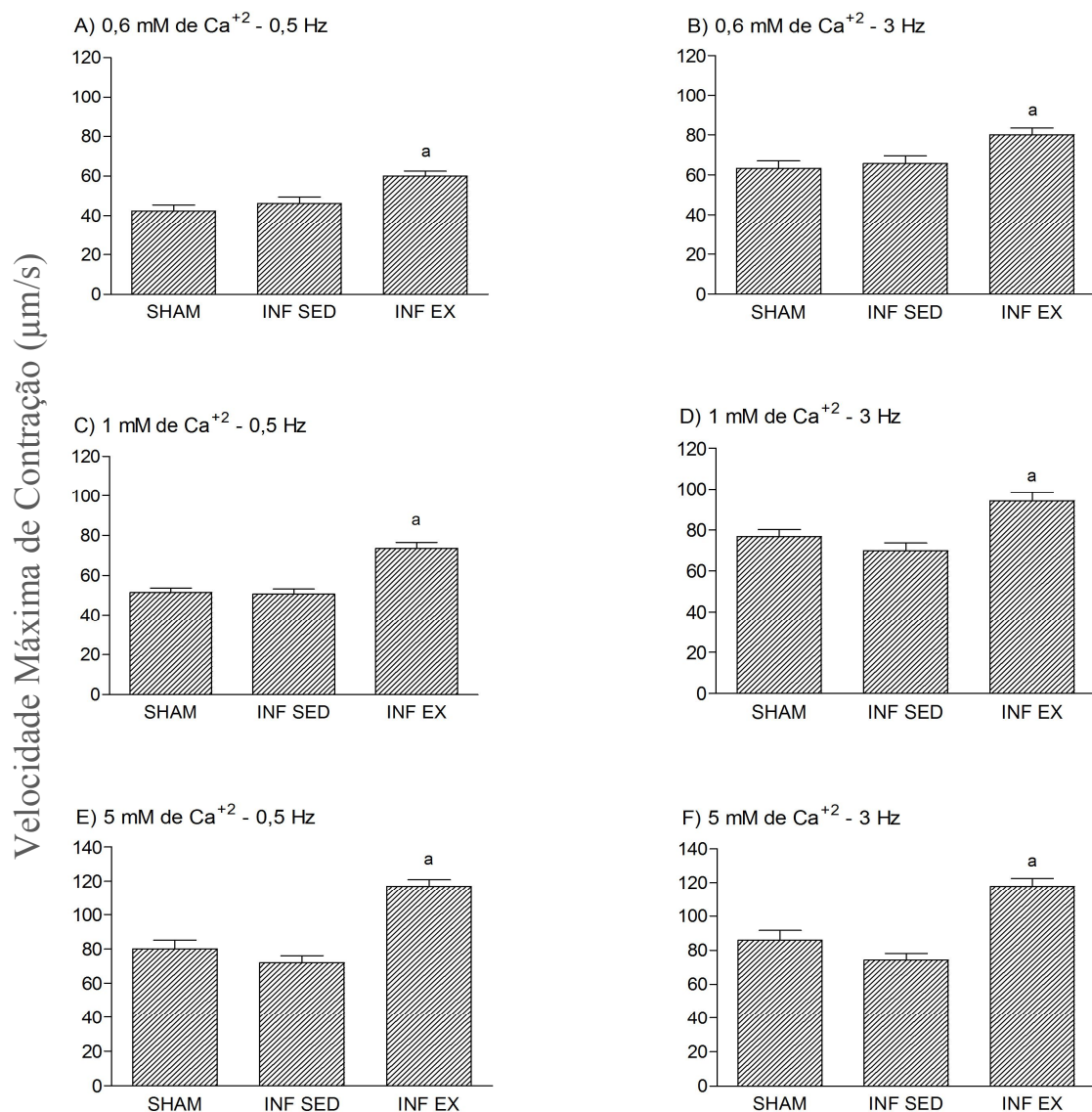


Figura 15. Velocidade máxima de contração de miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais medida com diferentes concentrações externas de cálcio (Ca^{+2}) e freqüências de estímulo. SHAM, controle sedentário (n = 48). INF SED, infartado sedentário (n = 63). INF EX, infartado exercitado (n = 82). a = estatisticamente diferente de SHAM e INF SED ($P < 0,05$).

Entretanto, a divergência entre os estudos que buscam explicar os efeitos do IM na velocidade de contração de cardiomiócitos pode estar relacionada com a entrada do Ca^{+2} pelos canais de Ca^{+2} tipo L, que tem se mostrado reduzida (Li et al., 2005) ou inalterada (Holt et al., 1998) nesses animais. A redução na entrada do Ca^{+2} na célula diminui a quantidade desse íon disponível para ativar os RyR2 e,

conseqüentemente, aumenta do tempo para liberação do Ca^{+2} do RS e da contração celular como um todo. Em contra partida, a ausência de alteração no influxo de Ca^{+2} via canais de Ca^{+2} tipo L, observada por Holt et al. (1998) em ratos com IM, explica, pelo menos em parte, a similaridade na velocidade de contração dos cardiomiócitos entre os grupos SHAM e INF SED (Anand et al., 1997; Wisloff et al., 2002).

Além disso, as diferenças entre os estudos podem ser devido variações nas condições experimentais, como por exemplo, modelo animal utilizado, tempo pós IM, tamanho do infarto e região do miocárdio estudada. Kim et al. (2002) reportaram que não houve alteração na velocidade máxima de contração de cardiomiócitos de animais com apenas uma semana de indução do IM. Entretanto, a velocidade máxima de contração foi menor em miócitos cardíacos isolados da região adjacente a área infartada, após oito semanas de indução do infarto do miocárdio. Estes resultados sugerem que as alterações provocadas por esta patologia na velocidade máxima de contração de cardiomiócitos têm regulação espacial e temporal.

Nenhuma diferença na velocidade máxima de contração dos cardiomiócitos entre os grupos SHAM e INF SED foi observada nas $[\text{Ca}^{+2}]_e$ de 0,6 mM e 5 mM. Esse resultado sugere que as variações na $[\text{Ca}^{+2}]_e$ não foram capazes de exacerbar possíveis alterações na velocidade máxima de contração causadas pelo IM.

Por outro lado, o exercício físico regular realizado antes da indução do IM foi capaz de aumentar a velocidade máxima de contração dos cardiomiócitos. Este achado pode ser explicado pela capacidade do exercício físico crônico promover adaptações que aceleram a disponibilidade de Ca^{2+} no citossol. Há evidências que o exercício físico aumenta a expressão, atividade e sensibilidade do RyR2 (Wisloff et al., 2002; Diffie & Nagle, 2003; Diffie, 2004; Kemi et al., 2008). Além disso, animais exercitados apresentam maior sensibilidade dos miofilamentos aos íons Ca^{2+} , aumento da atividade do NCX e densidade e responsividade dos receptores β -adrenérgicos (Tibbits et al., 1989; Diffie et al., 2001; Bidasee et al., 2008). Todavia, estes parâmetros não foram avaliados no presente estudo.

As adaptações promovidas pelo exercício físico sobre a velocidade máxima de contração de cardiomiócitos de corações acometidos pelo IM persistiram nas

$[Ca^{+2}]_e$ de 0,6 mM e 5 mM. Esse resultado sugere que o aumento na velocidade máxima de contração observada nos animais exercitados previamente não é alterado por situações que favoreçam o influxo ou a saída desse íon das células.

Coletivamente, essas adaptações resultam em melhora nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos em resposta ao exercício físico regular. Estas adaptações podem estar associadas ao aumento da capacidade contrátil do miocárdio e, conseqüentemente, do volume de ejeção e do débito cardíaco destes animais.

5.8.3 Velocidade máxima de relaxamento

A figura 16 mostra o resultado da velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos do VE dos animais dos grupos experimentais em diferentes $[Ca^{+2}]_e$.

Na $[Ca^{+2}]_e$ de 1 mM os animais infartados apresentaram velocidade máxima de relaxamento semelhante a dos animais sadios (SHAM vs. INF SED). Nas mesmas condições, a velocidade máxima de relaxamento foi maior no grupo INF EX, quando comparada a dos demais grupos.

Da mesma forma, a velocidade de contração não diferiu entre os grupos SHAM e INF SED, mas estava aumentada no grupo INF EX, nas $[Ca^{+2}]_e$ de 0,6 mM e 5 mM.

Esses achados demonstram que 15 dias de IM não foram suficientes para promover alterações significativas na velocidade máxima de relaxamento de cardiomiócitos do VE. Da mesma forma, Anand et al. (1997) não encontraram diferenças na velocidade de relaxamento em animais infartados, quando comparados a seus controles normais.

Por outro lado, alguns autores têm reportado que miócitos cardíacos de animais infartados apresentam menor velocidade máxima de relaxamento (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002) em relação aos controles. Isso pode ser explicado por alterações nas vias de remoção do Ca^{+2} presente no citossol dessas células. Há evidências que ocorre uma redução na atividade e densidade da 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 na densidade do NCX (Gupta et al.; 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007).

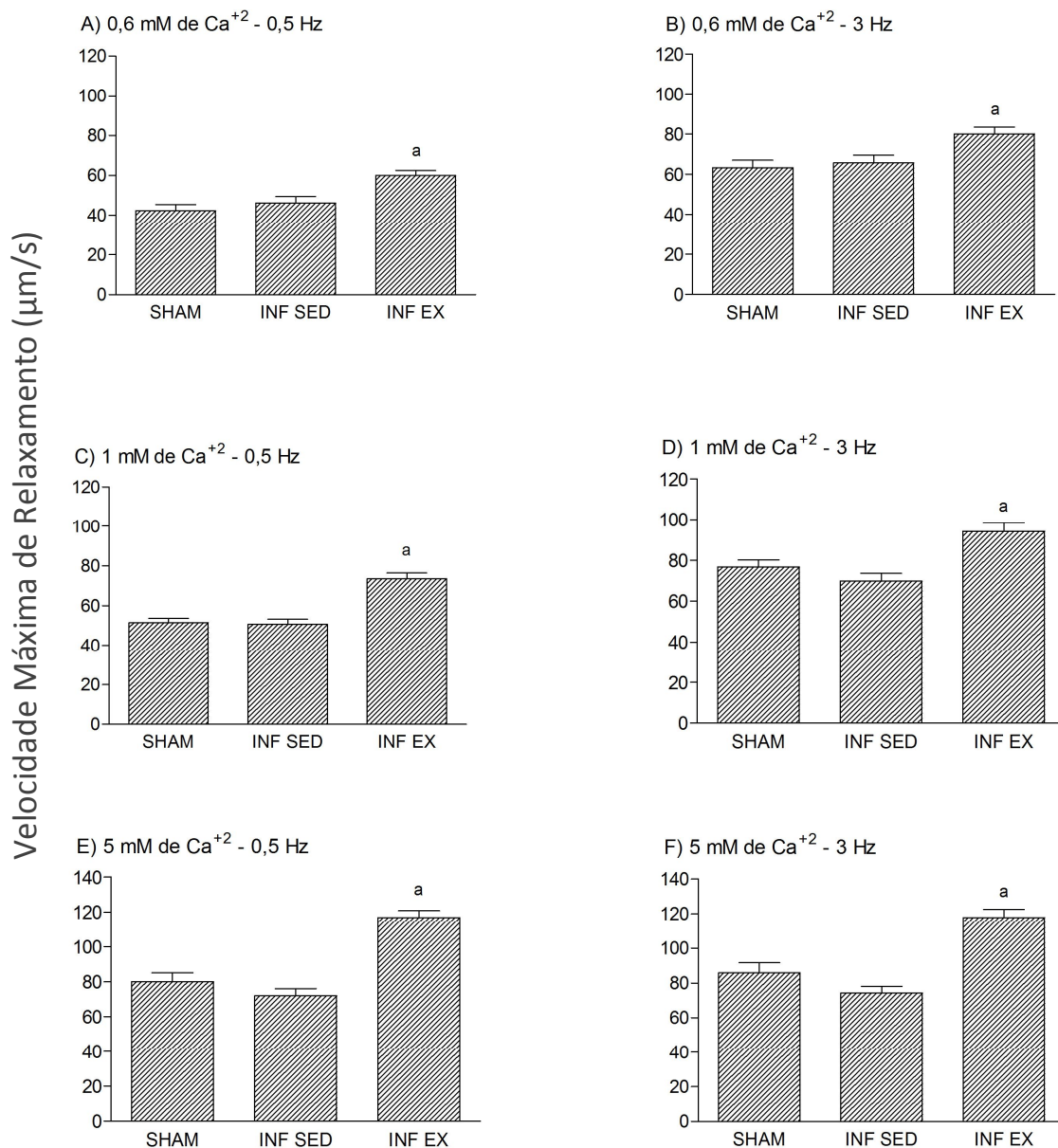


Figura 16. Velocidade máxima de relaxamento de miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais medida com diferentes concentrações externas de cálcio (Ca^{+2}) e freqüências de estímulo. SHAM, controle sedentário (n = 48). INF SED, infartado sedentário (n = 63). INF EX, infartado exercitado (n = 82). a = estatisticamente diferente de SHAM e INF SED ($P < 0,05$).

As divergências existentes quanto à função diastólica de cardiomiócitos (relaxamento) parecem estar relacionadas com variações nas condições

experimentais dos estudos. Por exemplo, Kim et al. (2002) não observaram alteração na velocidade máxima de relaxamento de cardiomiócitos em animais com apenas uma semana de indução do infarto do miocárdio. Porém, miócitos cardíacos da região adjacente da área infartada de animais com oito semanas de pós-infarto apresentaram este parâmetro reduzido. Além dos aspectos temporais e espaciais sugeridos por estes resultados, o tamanho do infarto e o modelo de animal utilizado também podem interferir nos resultados, como, por exemplo, o IM com uma maior extensão poderia exacerbar os efeitos deletérios causados por esta patologia sobre a função contrátil de cardiomiócitos.

Assim como demonstrado por Anand et al. (1997), nenhuma diferença na velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos entre os grupos SHAM e INF SED foi observada nas diferentes $[Ca^{+2}]_e$ (0,6 e 5 mM). Vários estudos sugerem que animais infartados apresentam alterações nas vias de remoção do Ca^{+2} (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008), assim, é possível que essa redução na capacidade de remoção do Ca^{+2} seja compensada por um menor influxo desse íon, causado por alterações nas proteínas dessa via (Gupta et al.; 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007). Isso explica, pelo menos em parte, a similaridade na velocidade máxima de relaxamento dos grupos SHAM e INF SED, pois apesar das vias de remoção do Ca^{+2} estarem comprometidas nos cardiomiócitos de animais infartados, uma menor $[Ca^{+2}]_i$ tem de ser removida.

No presente estudo verificou-se um aumento significativo na velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos dos animais do grupo INF EX, quando comparados a dos animais do grupo INF SED, demonstrando que o exercício físico regular foi capaz de melhorar/preservar a função diastólica de miócitos cardíacos isolados.

O lusotropismo celular aumentado nos animais exercitados ocorre, principalmente, pelo aumento da velocidade de remoção de Ca^{2+} do citosol. Estudos com animais saudáveis têm demonstrado que o exercício físico promoveu melhoras na função e aumento na expressão de SERCA2 e fosfolambano (Wisloff et al., 2001, Kemi et al., 2007) e aumento na atividade do NCX (Tibbits et al., 1989).

As adaptações promovidas pelo exercício físico regular sobre a velocidade máxima de relaxamento de cardiomiócitos de corações acometidos pelo IM

persistiram nas $[Ca^{+2}]_e$ de 0,6 mM e 5 mM. Esse resultado sugere que o aumento na velocidade de remoção do Ca^{+2} em animais exercitados não é alterado por situações que favoreçam o influxo ou a saída desse íon das células.

A melhora da capacidade de relaxamento celular promovida pelo exercício físico regular tem impacto importante na função cardíaca de animais com IM, pois sabe-se que esta patologia pode conduzir a um quadro de disfunção diastólica (Dayan et al., 2005; de Waard & Duncker et al., 2009).

5.9 Repostas hemodinâmicas

A tabela 4 apresenta os parâmetros hemodinâmicos analisados quinze dias após a indução do IM. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os grupos estudados no que se refere à FC, PAS, PAD. Entretanto, a LVEDP estava aumentada nos animais infartados (SHAM vs. INF SED), porém, sem efeito significativo do programa de exercício aplicado (INF SED vs. INF EX). Em contrapartida, a LVSP estava reduzida em animais infartados (INF SED vs SHAM), sem efeito significativo do programa de exercício aplicado.

Tabela 4. Parâmetros hemodinâmicos.

Grupos	SHAM	INF SED	INF EX
FC (bpm)	246,12 ± 7,54	269,00 ± 8,00	251,40 ± 7,21
PAS (mmHg)	115,75 ± 2,41	108,76 ± 2,77	109,70 ± 2,51
PAD (mmHg)	72,75 ± 2,16	74,07 ± 2,72	74,90 ± 1,95
LVSP (mmHg)	121,37 ± 2,52 ^b	110,54 ± 2,27	115,80 ± 2,52
LVEDP (mmHg)	5,30 ± 0,37	16,27 ± 0,91 ^a	13,25 ± 0,51 ^a
dP/dt + (mmHg/s)	5621,62 ± 153,54 ^{b c}	3919,61 ± 68,00	4534,80 ± 97,74 ^b
dP/dt – (mmHg/s)	-5257,62 ± 135,40 ^{b c}	-3750,38 ± 74,26	-4203,10 ± 118,61 ^b

Dados expressos em Média ± EPM. SHAM, controle sedentário (n = 8). INF SED, infartado sedentário (n = 13). INF EX, infartado exercitado (n = 10). a = estatisticamente diferente de SHAM; b = estatisticamente diferente de INF SED; c = estatisticamente diferente de INF EX (P<0,05).

A $dP/dt+$ foi significativamente maior nos animais do grupo SHAM, em comparação com INF SED e INF EX. Entre os animais infartados, este parâmetro foi maior no grupo exercitado (INF SED vs. INF EX).

Entretanto, a $dP/dt-$ foi menor no grupo SHAM, quando comparado aos demais grupos. Os animais exercitados apresentaram este parâmetro reduzido em relação com seu grupo controle (INF SED vs INF EX).

Assim como observado por outros autores (Yamaguchi et al., 1997; van der Velden et al., 2004; de Waard et al., 2007), nossos achados demonstram que o IM não altera a FC de animais acometidos por esta patologia.

O programa de corrida em esteira também não teve efeito sobre a FC de animais infartados. Entretanto, vale ressaltar que o registro dos dados foi obtido com os animais anestesiados. Em condições basais, a demanda corporal por sangue oxigenado aumenta e ajustes no débito cardíaco ocorrem para suprir essa necessidade (McCardle et al., 1998). É possível que nessas condições possa existir diferença significativa entre os grupos. Portanto, a ausência de variação na FC entre os grupos INF SED e INF EX pode ter ocorrido devido às condições experimentais nas quais os dados foram obtidos. Outra possibilidade é que o protocolo de exercício utilizado não foi capaz de promover essas adaptações.

Não houve diferença entre a PAS e a PAD dos grupos SHAM e INF SED, sugerindo que o IM não afetou este parâmetro. Da mesma forma, o exercício físico aplicado não alterou esses parâmetros nos animais infartados. A pressão arterial está diretamente relacionada com a capacidade contrátil do coração e tanto o IM, como o exercício físico, podem causar alterações importantes na função cardíaca (van der Velden 2004; Ait Mou et al., 2008). A similaridade nos resultados deve-se a capacidade desse órgão manter a pressão sanguínea em níveis ótimos.

O IM reduziu a LVSP e a $dP/dt+$. Esses resultados demonstram que essa patologia provocou disfunção contrátil do VE. Esta redução da capacidade contrátil observada nos animais infartados corrobora com outros resultados obtidos no presente estudo. Por exemplo, a fibrose tecidual, observada pela maior concentração de colágeno nos corações de animais infartados, aumenta a rigidez do músculo cardíaco, a qual está relacionada com a elevação da resistência para o encurtamento muscular (de Waard et al., 2007; de Waard & Duncker, 2009).

Portanto, parece que a fibrose observada no miocárdio de animais com IM contribui para a redução da contratilidade do VE.

A redução da capacidade contrátil de corações infartados também está relacionada com a redução do número e da contratilidade dos cardiomiócitos. Alguns trabalhos demonstraram que a perda de tecido cardíaco causada pelo IM contribui para a disfunção sistólica do VE (Pfeffer et al., 1979; Pfeffer et al., 1985). Todavia, presente estudo demonstrou que a diminuição na amplitude de contração das células cardíacas causada pelo IM corrobora com a perda de função contrátil observada no VE de ratos com esta patologia.

O programa de exercício físico aplicado, por sua vez, teve um efeito cardioprotetor importante no presente estudo. Este atenuou os efeitos deletérios do IM sobre a função contrátil do VE. A redução da LVSP em resposta ao IM foi 49% menor nos animais do grupo INF EX, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa para seu grupo controle. Da mesma forma, o índice de contratilidade do VE, a $dP/dt+$, foi significativamente maior no animais exercitados previamente.

O melhor desempenho contrátil do VE de animais que exercitaram previamente a indução do IM está relacionado à capacidade do exercício físico em atenuar os efeitos deletérios dessa patologia (Dayan et al., 2005; de Waard e Duncker, 2009). Observou-se no presente estudo que o programa exercício físico aplicado reduziu a perda de tecido cardíaco (ex. menor extensão do infarto nos animais exercitados). Além disso, a deposição do colágeno reativo foi menor no grupo INF EX e houve uma preservação da amplitude de contração dos cardiomiócitos de animais infartados previamente exercitados.

O IM também provocou alterações importantes no lusotropismo cardíaco. Essa patologia aumentou de forma significativa a LVEDP. O aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo concorda com a menor capacidade de relaxamento apresentada nos animais do grupo INF SED (ex. maior $dP/dt-$ nesse grupo, quando comparado aos demais).

Assim como sugerido por outros autores (de Waard et al, 2007; de Waard & Duncker, 2009) e pelo presente estudo, a redução do lusotropismo cardíaco provocado pelo IM está relacionada com a fibrose tecidual. Conforme já discutido, além da formação de uma cicatriz na região infartada, há um aumento na deposição

de colágeno no miocárdio sobrevivente, tornando o músculo cardíaco mais rígido e resistente ao estiramento.

Portanto, a disfunção cardíaca observada em animais infartados está relacionada não só com a perda da capacidade contrátil, mas também com uma redução no lusotropismo cardíaco.

Os animais exercitados previamente a indução do IM apresentaram a LVEDP 29% menor em relação ao grupo INF SED, apesar de não ter existido diferença significativa. Além disso, a capacidade do exercício físico prévio em reduzir os efeitos deletérios do IM sobre o lusotropismo cardíaco também foi demonstrado com uma menor dP/dt – observada nos animais do grupo INF EX.

A menor deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente de animais exercitados, demonstrada aqui e por outros (de Waard et al., 2007), pode diminuir a rigidez tecidual, colaborando para a melhora no relaxamento de corações acometidos por esta patologia.

Adaptações em nível celular também contribuem para melhora do lusotropismo cardíaco. Demonstrou-se no presente estudo que cardiomiócitos de animais infartados relaxam significativamente mais rápidos, em comparação com o seu grupo controle.

Os resultados observados na análise hemodinâmica sugerem que o exercício físico realizado antes do IM reduz os efeitos deletérios dessa patologia sobre a função cardíaca.

6. Conclusão

Conclui-se que o programa de corrida em esteira realizado previamente ao IM foi capaz de atenuar os efeitos deletérios causados por essa patologia sobre a função ventricular esquerda. As principais adaptações do exercício físico foram:

- a) aumento do comprimento, da largura e do volume dos cardiomiócitos;
- b) atenuação das alterações provocadas pelo IM na amplitude de contração e aumento da velocidade do ciclo contração-relaxamento de miócitos isolados;
- c) redução do tamanho do IM;
- d) ausência de efeito sobre a densidade capilar;
- e) redução da deposição de colágeno no miocárdio sobrevivente;
- f) atenuação das alterações nos parâmetros hemodinâmicos provocadas pelo IM.

7. Referências bibliográficas

Ait Mou, Y., C. Reboul, *et al.* Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischemic heart failure. Cardiovasc Res, Aug 14. 2008.

Ahlers, B. A., J. Song, *et al.* Effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. J Appl Physiol, v.98, n.6, Jun, p.2169-76. 2005.

Anand, I. S., D. Liu, *et al.* Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. Circulation, v.96, n.11, Dec 2, p.3974-84. 1997.

Anand, S. S., S. Islam, *et al.* Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. Eur Heart J, v.29, n.7, Apr, p.932-40. 2008.

Atchley, A. E., Jr. e P. S. Douglas. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. Cardiol Clin, v.25, n.3, Aug, p.371-82, v. 2007.

Berk, B. C., K. Fujiwara, *et al.* ECM remodeling in hypertensive heart disease. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.568-75. 2007.

Bers, D. M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1991.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205. 2002.

Bers, D. M., Bassani, R. A., Bassani, J. W., Baudet, S. and Hryshko, L. V. Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. J Mol Cell Cardiol, v.25, n.9, Sep, p.1047-57. 1993.

Bidasee, K. R., H. Zheng, *et al.* Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. J Appl Physiol, v.105, n.3, Sep, p.907-14. 2008.

Blair, S.N., H. W. Kohl, *et al.* C. E. Cardiovascular fitness and cardiovascular disease. in: Fletcher, G.F. (Ed.) Cardiovascular response to exercise. New York, Futura Publishing Company, 1994. pp. 303-324.

Brown, D. A., K. N. Jew, *et al.* Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. J Appl Physiol, v.95, n.6, Dec, p.2510-8. 2003.

Carneiro Júnior, M. A. Treinamento físico de baixa intensidade e destreinamento: avaliação das propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos espontaneamente hipertensos. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

Choi, S. Y., H. J. Chang, *et al.* Long-term exercise training attenuates age-related diastolic dysfunction: association of myocardial collagen cross-linking. J Korean Med Sci, v.24, n.1, Feb, p.32-9. 2009.

Cleutjens, J. P. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. Cardiovasc Res, v.32, n.5, Nov, p.816-21. 1996.

Cook, S. J, Lancaster, M.K, O'Neil, S.C. Regional differences in the regulation of intracellular sodium and action potential configuration in rabbit left ventricle . Pflugers Arch. V.43, p. 515-522, 1997.

Dayan, A., M. S. Feinberg, *et al.* Swimming exercise training prior to acute myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats. Ann Clin Lab Sci, v.35, n.1, Winter, p.73-8. 2005.

Delgado, J., A. Saborido, *et al.* Chronic and acute exercise do not alter Ca²⁺ regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. J Appl Physiol, v.87, n.1, Jul, p.152-60. 1999.

de Waard, M. C. e D. J. Duncker. Prior exercise improves survival, infarct healing, and left ventricular function after myocardial infarction. J Appl Physiol, v.107, n.3, Sep, p.928-36. 2009.

de Waard, M. C., J. Van Der Velden, *et al.* Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. Circ Res, v.100, n.7, Apr 13, p.1079-88. 2007.

Diaz-Herrera, P., Torres, A., Morcuende, J. A., Garcia-Castellano, J. M., Calbet, J. A. and Sarrat, R. Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. Histol Histopathol, v.16, n.1, Jan, p.29-35. 2001.

Diffie, G. M. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. Exerc Sport Sci Rev, v.32, n.3, Jul, p.112-9. 2004.

Diffie, G. M. e D. F. Nagle. Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. J Appl Physiol, v.95, n.1, Jul, p.35-42. 2003.

Diffie, G. M., E. A. Seversen, *et al.* Exercise training increases the Ca(2+) sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. J Appl Physiol, v.91, n.1, Jul, p.309-15. 2001.

Dixon, I. M., T. Hata, *et al.* Sarcolemmal calcium transport in congestive heart failure due to myocardial infarction in rats. Am J Physiol, v.262, n.5 Pt 2, May, p.H1387-94. 1992.

Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, *et al.* The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol, Jul 23. 2009.

Douglas, P. S. Cardiac considerations in the triathlete. Med Sci Sports Exerc, v.21, n.5 Suppl, Oct, p.S214-8. 1989.

Duncker, D. J. e R. J. Bache. Regulation of coronary blood flow during exercise. Physiol Rev, v.88, n.3, Jul, p.1009-86. 2008.

Eisele, J. C., Schaefer, I. M., Randel Nyengaard, J., Post, H., Liebetanz, D., Bruel, A. and Muhlfeld, C. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. Basic Res Cardiol, v.103, n.1, Jan, p.12-21. 2008.

Fleck, S. J. Cardiovascular adaptations to resistance training. Med Sci Sports Exerc, v.20, n.5 Suppl, Oct, p.S146-51. 1988.

Freimann, S., M. Scheinowitz, *et al.* Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. J Am Coll Cardiol, v.45, n.6, Mar 15, p.931-8. 2005.

Galindo, C. L., Skinner, M. A., Errami, M., Olson, L. D., Watson, D. A., Li, J., McCormick, J. F., Mciver, L. J., Kumar, N. M., Pham, T. Q. e Garner, H. R. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. BMC Physiol, v.9, p.23. 2009.

Gerdes, A. M. e J. M. Capasso. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. J Mol Cell Cardiol, v.27, n.3, Mar, p.849-56. 1995.

Guo, X., D. Chapman, *et al.* Partial prevention of changes in SR gene expression in congestive heart failure due to myocardial infarction by enalapril or losartan. Mol Cell Biochem, v.254, n.1-2, Dec, p.163-72. 2003.

Gupta, S., A. J. Prahash, *et al.* Myocyte contractile function is intact in the post-infarct remodeled rat heart despite molecular alterations. Cardiovasc Res, v.48, n.1, Oct, p.77-88. 2000.

Hakim, A. A., H. Petrovitch, *et al.* Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. N Engl J Med, v.338, n.2, Jan 8, p.94-9. 1998.

Hashimoto, T., N. Kambara, *et al.* Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. J Appl Physiol, v.97, n.3, Sep, p.843-51. 2004.

Holt, E., T. Tonnessen, *et al.* Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. J Mol Cell Cardiol, v.30, n.8, Aug, p.1581-93. 1998.

Houser, S. R. e K. B. Margulies. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? Circ Res, v.92, n.4, Mar 7, p.350-8. 2003.

Kemi, O. J., M. Ceci, *et al.* Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, v.15, n.2, Apr, p.145-8. 2008.

Kemi, O. J., O. Ellingsen, *et al.* Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. J Mol Cell Cardiol, v.43, n.3, Sep, p.354-61. 2007.

Kemi, O. J., Haram, P. M., Wisloff, U. and Ellingsen, O. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. Circulation, v.109, n.23, Jun 15, p.2897-904. 2004.

Kemi, O. J., P. M. Haram, *et al.* Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. Cardiovasc Res, v.67, n.1, Jul 1, p.161-72. 2005.

Kiilavuori, K., L. Toivonen, *et al.* Reversal of autonomic derangements by physical training in chronic heart failure assessed by heart rate variability. Eur Heart J, v.16, n.4, Apr, p.490-5. 1995.

Kim, H. E., S. S. Dalal, *et al.* Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. J Clin Invest, v.106, n.7, Oct, p.857-66. 2000.

Kim, Y. K., S. J. Kim, *et al.* Altered excitation-contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol, v.34, n.1, Jan, p.63-73. 2002.

Koch, L. G. e S. L. Britton. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. Physiol Genomics, v.5, n.1, Feb 7, p.45-52. 2001.

Lanas, F., A. Avezum, *et al.* Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. Circulation, v.115, n.9, Mar 6, p.1067-74. 2007.

Langer, G. A., Frank, J. S., Rich, T. L. e Orner, F. B. Calcium exchange, structure, and function in cultured adult myocardial cells. Am J Physiol, v.252, n.2 Pt 2, Feb, p.H314-24. 1987.

Layland, J. e Kentish, J.C. Positive force and Ca^{2+} frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. Am J. Physiol. v.248, p.9-18, 1999

Lewartowski, B e Pytkowski, B. Cellular mechanism of the relationship between myocardial force and frequency of contraction. Prog. Biophys Mol Biol. v. 50, p.1335-1347.

Li, P., C. Park, *et al.* Myocyte performance during evolution of myocardial infarction in rats: effects of propionyl-L-carnitine. Am J Physiol, v.268, n.4 Pt 2, Apr, p.H1702-13. 1995.

Li, X., C. X. Huang, *et al.* The beta-adrenergic blocker carvedilol restores L-type calcium current in a myocardial infarction model of rabbit. Chin Med J (Engl), v.118, n.5, Mar 5, p.377-82. 2005.

Lin, C. Q. e M. J. Bissell. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J, v.7, n.9, Jun, p.737-43. 1993.

Liu, J. L., S. Irvine, *et al.* Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: A role for angiotensin II. Circulation, v.102, n.15, Oct 10, p.1854-62. 2000.

Loennechen, J. P., U. Wisloff, *et al.* Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during post-infarction failure in rat. Acta Physiol Scand, v.176, n.1, Sep, p.17-26. 2002.

Mackiewicz, U., M. Maczewski, *et al.* Sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase ability to transport Ca^{2+} gradually diminishes after myocardial infarction in the rat. Cardiovasc Res, Oct 22. 2008.

Mandarim-de-Lacerda, C. A. Stereological tools in biomedical research. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 75(4): 469-486. 2003.

Manson, J. E., P. Greenland, *et al.* Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. N Engl J Med, v.347, n.10, Sep 5, p.716-25. 2002.

Marini, M., R. Lapalombella, *et al.* Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile. Eur J Appl Physiol, v.99, n.5, Mar, p.503-10. 2007.

Mcardle, W. D. F. I. Katch *et al.* Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano. Guanabara Koogan, 4 ed. Rio de Janeiro. 1998.

Mcelroy, C. L., S. A. Gissen, *et al.* Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. Circulation, v.57, n.5, May, p.958-62. 1978.

Mcmullen, J. R. and Jennings, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.34, n.4, Apr, p.255-62. 2007.

Melillo, G., J. A. Lima, *et al.* Intrinsic myocyte dysfunction and tyrosine kinase pathway activation underlie the impaired wall thickening of adjacent regions during postinfarct left ventricular remodeling. Circulation, v.93, n.7, Apr 1, p.1447-58. 1996.

Mill, J. G., I. Stefanon, *et al.* Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. Cardiovasc Res, v.24, n.9, Sep, p.748-53. 1990.

Mokelke, E. A., B. M. Palmer, *et al.* Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. Am J Physiol, v.273, n.3 Pt 2, Sep, p.H1193-7. 1997.

Moore, R. L. and Korzick, D. H. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. Prog Cardiovasc Dis, v.37, n.6, May-Jun, p.371-96. 1995.

Moore, R. L., T. I. Musch, *et al.* Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. Am J Physiol, v.264, n.5 Pt 1, May, p.C1180-9. 1993.

Mork, H. K., I. Sjaastad, *et al.* Increased cardiomyocyte function and Ca²⁺ transients in mice during early congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol, v.43, n.2, Aug, p.177-86. 2007.

Mork, H. K., I. Sjaastad, *et al.* Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.296, n.4, Apr, p.H1069-79. 2009.

Mulder, P., H. Boujedaini, *et al.* Long-term survival and hemodynamics after endothelin-a receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition in rats with chronic heart failure: monotherapy versus combination therapy. Circulation, v.106, n.9, Aug 27, p.1159-64. 2002.

Murray, C. J. e A. D. Lopez. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. Science, v.274, n.5288, Nov 1, p.740-3. 1996.

Natali, A.J: Effects of vonlluntary exercise on the function of cardiac myocytes. School of Biomedic Sciences, University of Leeds, Leeds, 2000 p.7-20.

Natali, A. J., D. L. Turner, *et al.* Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. J Exp Biol, v.204, n.Pt 6, Mar, p.1191-9. 2001.

Natali, A. J., L. A. Wilson, *et al.* Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. J Physiol, v.541, n.Pt 3, Jun 15, p.863-75. 2002.

Naylor, L. H., George, K., O'driscoll, G. e Green, D. J. The athlete's heart: a contemporary appraisal of the 'Morganroth hypothesis'. Sports Med, v.38, n.1, p.69-90. 2008.

Noble, E. G., A. Moraska, *et al.* Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. J Appl Physiol, v.86, n.5, May, p.1696-701. 1999.

Opie, L. H., P. J. Commerford, *et al.* Controversies in ventricular remodelling. Lancet, v.367, n.9507, Jan 28, p.356-67. 2006.

Orenstein, T. L., T. G. Parker, *et al.* Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. J Clin Invest, v.96, n.2, Aug, p.858-66. 1995.

Palmer, B. M., A. M. Thayer, *et al.* Shortening and [Ca²⁺] dynamics of left ventricular myocytes isolated from exercise-trained rats. J Appl Physiol, v.85, n.6, Dec, p.2159-68. 1998.

Plamer, B. M. e R.L. Moore. A model of isolated cardiac myocyte predicts an increase in myocyte compliance with exercise training. The Physiologist. 39: A – 40. 1996.

Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer, *et al.* Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. Circ Res, v.57, n.1, Jul, p.84-95. 1985.

Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res, v.44, n.4, Apr, p.503-12. 1979.

Pliquett, R. U., K. G. Cornish, *et al.* Amelioration of depressed cardiopulmonary reflex control of sympathetic nerve activity by short-term exercise training in male rabbits with heart failure. J Appl Physiol, v.95, n.5, Nov, p.1883-8. 2003.

Powers, S. K., J. C. Quindry, *et al.* Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. Free Radic Biol Med, v.44, n.2, Jan 15, p.193-201. 2008.

Primola-Gomes, T. N., L. A. Campos, *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. J Appl Physiol, v.107, n.2, Aug, p.593-8. 2009.

Redfield, M. M., S. J. Jacobsen, *et al.* Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. JAMA, v.289, n.2, Jan 8, p.194-202. 2003.

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, v.303, n.1-2, Sep, p.97-103. 2007.

Satoh, H., Delbridge, L. M., Blatter, L. A. and Bers, D. M. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. Biophys J, v.70, n.3, Mar, p.1494-504. 1996.

Schultz, R. L., J. G. Swallow, *et al.* Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. Hypertension, v.50, n.2, Aug, p.410-6. 2007.

Senzaki, H., N. Paolocci, *et al.* beta-blockade prevents sustained metalloproteinase activation and diastolic stiffening induced by angiotensin II combined with evolving cardiac dysfunction. Circ Res, v.86, n.7, Apr 14, p.807-15. 2000.

Song, J., X. Q. Zhang, *et al.* Sprint training improves contractility in postinfarction rat myocytes: role of Na⁺/Ca²⁺ exchange. J Appl Physiol, v.97, n.2, Aug, p.484-90. 2004.

Sun, S. Y., W. Wang, *et al.* Enhanced peripheral chemoreflex function in conscious rabbits with pacing-induced heart failure. J Appl Physiol, v.86, n.4, Apr, p.1264-72. 1999.

Sun, Y., J. Q. Zhang, *et al.* Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. J Lab Clin Med, v.135, n.4, Apr, p.316-23. 2000.

Sutton, M. G. e N. Sharpe. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. Circulation, v.101, n.25, Jun 27, p.2981-8. 2000.

Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev, v.79, n.1, Jan, p.215-62. 1999.

Tibbits, G. F., H. Kashihara, *et al.* Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemma: modulation of Ca²⁺ affinity by exercise. Am J Physiol, v.256, n.3 Pt 1, Mar, p.C638-43. 1989.

van Der Velden, J., D. Merkus, *et al.* Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. Circ Res, v.95, n.11, Nov 26, p.e85-95. 2004.

Wang, S., Ma, J. Z., Zhu, S. S., Xu, D. J., Zou, J. G. and Cao, K. J. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. Eur J Appl Physiol, v.104, n.3, Oct, p.549-55. 2008.

Wisloff, U., O. Ellingsen, *et al.* High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? Exerc Sport Sci Rev, v.37, n.3, Jul, p.139-46. 2009.

Wisloff, U., J. P. Loennechen, *et al.* Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. Cardiovasc Res, v.54, n.1, Apr, p.162-74. 2002.

Wisloff, U., J. P. Loennechen, *et al.* Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. Cardiovasc Res, v.50, n.3, Jun, p.495-508. 2001.

Wisloff, U., Stoylen, A., Loennechen, J. P., Bruvold, M., Rognum, O., Haram, P. M., Tjonna, A. E., Helgerud, J., Slordahl, S. A., Lee, S. J., Videm, V., Bye, A., Smith, G. L., Najjar, S. M., Ellingsen, O. e Skjaerpe, T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. Circulation, v.115, n.24, Jun 19, p.3086-94. 2007.

Woodiwiss, A. J., O. J. Tsoetsi, *et al.* Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. Circulation, v.103, n.1, Jan 2, p.155-60. 2001.

Xu, J., O. A. Carretero, *et al.* Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.3, Sep, p.H1900-7. 2007.

Xu, X., W. Wan, *et al.* Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. Cardiovasc Res, v.78, n.3, Jun 1, p.523-32. 2008.

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, v.44, n.1, Jan, p.114-22. 2008a.

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

Zhang, L. Q., X. Q. Zhang, *et al.* Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes. J Appl Physiol, v.89, n.3, Sep, p.1099-105. 2000.