1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa, com alta incidência na população adulta e mal prognóstico. A IC é caracterizada por anormalidades na função do ventrículo esquerdo/direito e regulação neuro-humoral, que são associadas à intolerância ao esforço, fadiga, dispneia, retenção de fluido e redução da longevidade (LUNDE, SJAASTAD, SCHIOTZ THORUD & SEJERSTED, 2001).

Uma das causas mais frequentes para o desenvolvimento da IC é o infarto do miocárdio (IM), o qual contribui para distúrbios hemodinâmicos que vão contribuir para uma menor força de contração em consequência de perda de tecido contrátil (KANNEL, 2000).

O IM é caracterizado por uma lesão isquêmica irreversível, em geral, infartos que acometem áreas maiores que 40%, culminam com a perda de tecido cardíaco significativo, dessa maneira, diminuindo a força de contração do miocárdio originando um prejuízo na função ventricular, aumento da atividade neurohumoral e redução do débito cardíaco (DC) (ANVERSA, BEGHI, KIKKAWA & OLIVETTI, 1986).

Outra característica marcante do IM é a disfunção endotelial que tem como consequência, entre outras, o aumento da resistência arterial coronariana e sistêmica, decorrente do maior tônus vasoconstritor, o que contribui para aumento da do trabalho cardíaco e diminuição do fluxo sanguíneo muscular. Desta maneira, podendo contribuir para a intolerância ao esforço físico nesses pacientes.

A disfunção endotelial é caracterizada por uma mudança nas ações do endotélio vascular contribuindo para uma redução da vasodilatação, aumento da vasoconstrição e um aumento do estado pró-inflamatório e pró-trombótico do vaso (FELETOU, 2006). Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo vascular está envolvido nesta disfunção endotelial pós IM, contribuindo, entre outras ações, para uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de maneira sustentada, em destaque o ânion superóxido vascular, promove a inativação do NO e a produção de peróxido nitrito, reduzindo a ação vasodilatadora do NO e aumentando danos oxidativos à parede vascular (BAUERSACHS & WIDDER, 2008).

Pacientes com disfunção endotelial apresentam aumento de eventos cardiovasculares ao longo do tempo. Além disso, a disfunção endotelial é considerada um preditor independente de eventos cardiovasculares nesses indivíduos (ANDERSON, 2007; BREVETTI, SILVESTRO, SCHIANO & CHIARIELLO, 2003). Adicionado a isso, o sedentarismo contribui para o aumento da mortalidade na IC (HAMBRECHT, FIEHN, WEIGL, GIELEN, HAMANN, KAISER, YU, ADAMS, NIEBAUER & SCHULER, 1998; MAIORANA, O'DRISCOLL, TAYLOR & GREEN, 2003; WITHAM, STRUTHERS & MCMURDO, 2003).

Devido ao seu importante potencial para promover adaptações benéficas, o exercício físico tem sido cada vez mais investigado como forma terapêutica de doenças cardiovasculares e metabólicas. Atualmente, o treinamento físico aeróbico é recomendado por diversas organizações de saúde como o *American Heart Association* (AHA) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (BOCCHI, BRAGA, FERREIRA, ROHDE, DE OLIVEIRA, DE ALMEIDA, MOREIRA, BESTETTI, BORDIGNON, AZEVEDO, TINOCO, ROCHA, ISSA, FERRAZ, CRUZ, GUIMARAES, MONTERA, ALBUQUERQUE, BACAL, SOUZA, NETO, CLAUSELL, MARTINS, SICILIANO, DE SOUZA NETO, MOREIRA, TEIXEIRA, MOURA, BECK-DA-SILVA, RASSI, AZEKA, HOROWITZ, RAMIRES, SIMOES, DE GASTRO, SALEMI, JR, VILA, SIMOES, ALBANESI & MONTERA, 2009; HAMBRECHT et al., 1998) no tratamento do IM e da IC. De fato, já esta bem estabelecido que o treinamento físico diminui a morbidade/ mortalidade, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes com IM e IC.

No entanto, a grande maioria dos estudos nessa área envolve o treinamento físico aeróbico contínuo de intensidade leve/moderada. Dentre os principais benefícios do treinamento físico aeróbico, moderado e contínuo, na disfunção endotelial no IM e da IC, destacamos o aumento da expressão e atividade da eNOS e atenuação da produção das EROs pelo complexo enzimático NAD(P)H oxidase (BECHARA, TANAKA, SANTOS, JORDAO, SOUSA, BARTHOLOMEU & RAMIRES, 2008; FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006; LEUNG, YUNG, LAHER, YAO, CHEN & HUANG, 2008; MAIORANA et al., 2003), o que resulta em maior biodisponibilidade de NO vascular e melhora da resposta vasodilatadora.

Durante o exercício dinâmico, o principal estímulo para o aumento da atividade da eNOS e, consequentemente da produção de NO é o aumento do estresse de cisalhamento ou *"shear stress"*, isto é, o atrito do sangue na parede do vaso, decorrente do aumento do fluxo sanguíneo (débito cardíaco). Como resultado da maior produção de NO pelo endotélio, observa-se a vasodilatação arterial, que possibilita o aumento do fluxo sanguíneo para atender a demanda energética da musculatura ativa. Além disso, o TC aumenta a expressão gênica para eNOS, contribuindo para uma maior produção de NO pelos vasos de indivíduos treinados, bem como diminui a expressão de subunidades da NAD(P)H oxidase, resultando em menor produção de superóxido (FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006; LEUNG et al., 2008; MAIORANA et al., 2003). Estas adaptações vasculares ao treinamento moderado contínuo estão associadas ao aumento da tolerância ao esforço, melhora da qualidade de vida e redução da taxa de mortalidade nos pacientes com IC.

Por outro lado, um estudo avaliando o fluxo sanguíneo do antebraço em indivíduos saudáveis jovens, demonstrou que em intensidades maiores (75% do VO_2 máx) o TA pode diminuir a resposta vasodilatadora e os autores relacionaram essa redução por uma maior produção de EROs (GOTO, HIGASHI, KIMURA, NOMA, HARA, NAKAGAWA, KAWAMURA, CHAYAMA, YOSHIZUMI & NARA, 2003). Dessa maneira, ainda não esta bem estabelecida qual intensidade do exercício físico poderá promover maiores benefícios vasculares em pacientes com IC.

Recentemente, tem sido descrito que o treinamento aeróbico de alta intensidade do tipo intervalado (TI), isto é, envolvendo períodos de exercício em alta intensidade alternado com períodos de baixa intensidade, podem sim promover adaptações benéficas aos pacientes com IC, doença arterial coronariana (DAC), síndrome metabólica, obesidade, entre outras. Além disso, observa-se que o aumento do VO_2 pico está diretamente relacionado ao aumento da taxa de sobrevida desses pacientes, melhora da função endotelial, melhora da capacidade funcional e qualidade de vida, além de reduzir os fatores de risco como obesidade, colesterol e melhora da sensibilidade à insulina (BILLAT, 2001a; HARAM, KEMI, LEE, BENDHEIM, AL-SHARE, WALDUM, GILLIGAN, KOCH, BRITTON, NAJJAR & WISLOFF, 2009; ROGNMO, HETLAND, HELGERUD, HOFF & SLORDAHL, 2004; TJONNA, LEE, ROGNMO, STOLEN, BYE, HARAM, LOENNECHEN, AL-SHARE,

SKOGVOLL, SLORDAHL, KEMI, NAJJAR & WISLOFF, 2008; WISLOFF, ELLINGSEN & KEMI, 2009; WISLOFF, STOYLEN, LOENNECHEN, BRUVOLD, ROGNMO, HARAM, TJONNA, HELGERUD, SLORDAHL, LEE, VIDEM, BYE, SMITH, NAJJAR, ELLINGSEN & SKJAERPE, 2007).

Entretanto, ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos envolvidos numa possível melhor efetividade do treinamento aeróbico de alta intensidade do tipo intervalado em comparação com o treinamento aeróbico moderado contínuo nas adaptações cardiovasculares em pacientes com IM.

Devemos destacar que a grande variedade de opções de combinações das variáveis intensidade e duração dos intervalos, e tempo total do exercício, constitui um fator importante de interferência na análise dos efeitos do treinamento físico intervalado nas adaptações cardiovasculares. No que diz respeito à padronização dos tipos de treinamentos investigados (contínuo vs. intervalado), alguns estudos só levaram em consideração o nível do gasto calórico total e distância total percorrida como forma de equalizar o volume de cada sessão de treino (TJONNA et al., 2008; WISLOFF et al., 2007).

Deste modo, os benefícios fisiológicos obtidos pelo treinamento aeróbico intervalado podem ter sido em função do maior tempo de exercício realizado em carga acima da intensidade média do consumo máximo de oxigênio, comparados ao treinamento aeróbico contínuo. De fato, tem sido observado que os benefícios do treinamento intervalado são dose-dependente, isto é, quanto mais tempo o indivíduo se exercitar próximo do VO_2 máx, maiores serão os benefícios desse tipo de treinamento (BILLAT, 2001a; b; BILLAT, FLECHET, PETIT, MURIAUX & KORALSZTEIN, 1999; GIBALA & MCGEE, 2008).

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar comparativamente as possíveis adaptações funcionais (VO_{2pico}) e a resposta vasomotora, envolvendo a análise das vias de produção de EROs e da biodisponibilidade de NO, em aorta torácica isolada de ratos com IM, submetidos a dois protocolos de treinamento físico distintos: aeróbico moderado contínuo e aeróbico intervalado de alta intensidade. Os protocolos de treinamento serão equalizados pelo gasto calórico total, distância total percorrida e intensidade média do VO_{2pico} obtidos em cada sessão de treino.

2. JUSTIFICATIVA

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de alta morbidade e mortalidade que representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Em 2007, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela terceira maior causa de internação no SUS, sendo que a IC foi responsável pela maior parte do número de internações (BOCCHI et al., 2009).

Se por um lado existem muitas evidências a respeito da melhora da saúde vascular em reposta ao treinamento físico aeróbico de intensidade leve/moderada tanto em pacientes pós-IM e com IC, ainda não estão completamente esclarecidos quais os mecanismos adaptativos decorrentes do treinamento aeróbico intenso e intervalado. Afim de avaliar comparativamente os efeitos destes dois tipos de treinamento envolvidos numa possível melhora da resposta vasomotora em ratos com IC, utilizamos protocolos de TC e TI equalizados quanto ao volume e à intensidade de treinamento, de modo que as possíveis diferenças observadas sejam atribuídas à forma contínua ou intervalada dos mesmos.

A equalização do volume total de treinamento e principalmente da intensidade média do VO_{2pico} é de suma importância para que no final do protocolo os resultados sejam em função somente do tipo de treino empregado e não de outros fatores como uma maior intensidade média do $VO_{2pico,}$ sendo esse parâmetro frequentemente observado na maioria dos trabalhos que utilizam o treinamento intervalado (TJONNA et al., 2008; WISLOFF, ELLINGSEN & KEMI, 2009; WISLOFF et al., 2007). Vários estudos tem demonstrado que os benefícios encontrados com o TI, são dependentes do tempo em que o indivíduo permanece em alta intensidade, isto é, quanto maior o tempo de exercício próximo ao $VO_{2máx}$, maiores serão os ganhos com esse tipo de treinamento (BILLAT, 2001a; b; GIBALA & MCGEE, 2008). Assim, acreditamos que a equalização também dessa variável, além da distância total percorrida e o gasto calórico, permitirá inferir se as diferenças (se houverem) ao final do protocolo serão em função do tipo de treino e não do maior tempo de exercício numa intensidade maior, como ocorre nos estudos anteriormente citados.

Nesse sentido, o objetivo geral do presente estudo é investigar as alterações vasomotoras e bioquímicas decorrentes dos treinamentos aeróbico contínuo e aeróbico intervalado de alta intensidade em aorta torácica de ratos com IM.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem por objetivo analisar comparativamente os efeitos do treinamento físico aeróbico contínuo versus o treinamento aeróbico intervalado de alta intensidade (equalizados pelo gasto calórico total, distância total percorrida e percentual médio do VO_{2pico}) sobre a regulação do tônus vascular em aorta torácica de ratos com IM, analisando as adaptações nos sistemas de síntese e de remoção de óxido nítrico nestas respostas.

3.2 Específicos

Analisar em ratos com IM os efeitos dos diferentes tipos de treinamentos físicos (Contínuo vs. Intervalado) nas seguintes variáveis:

- Potência aeróbica (VO_{2pico});
- Distância total percorrida;
- Resposta vasomotora aórtica *in vitro* aos agentes com ação dependente e independente do endotélio (ACh, NE);
- Expressão da proteína eNOS total e fosforilada (Ser^{1177});
- Expressão da proteína Akt-1 total e fosforilada (Ser^{473});
- Expressão da proteína NOX1;
- Produção dos derivados do metabolismo do NO: nitrato e nitrito;
- Medidas de espécies reativas de oxigênio - hidroetídeo (DHE).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Endotélio

O endotélio vascular é uma monocamada de epitélio pavimentoso tendo como uma de suas características uma estrutura alongada com núcleo proeminente onde são encontradas as cavéolas. Por conta da sua posição estratégica entre o sangue circulante e a camada média do músculo liso vascular, o endotélio utiliza essa posição para manter a homeostase da parede do vaso e a regulação do fluxo sanguíneo (GREEN, FOWLER, O'DRISCOLL, BLANKSBY & TAYLOR, 1996), através da liberação de substâncias vasoativas. O mesmo é composto por aproximadamente dez trilhões de células, o que equivale a aproximadamente 1 kg da massa corporal de um adulto (LIBBY, 2003).

Furchgott e Zawadzki (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980) demonstraram, em 1980, que inúmeras funções vasculares eram atribuídas ao endotélio, descobriram que a manutenção da integridade endotelial era fundamental para a obtenção da resposta vasodilatadora induzida por estímulo farmacológico. Foi observado que o endotélio era capaz de sintetizar substâncias vasoativas, e na presente ocasião essas substâncias foram chamadas de fator relaxante derivado do endotélio (FRDE). Posteriormente, no ano de 1987, os grupos dos professores Moncada e Ignarro, demonstraram separadamente que o FRDE era na verdade o óxido nítrico (NO) (IGNARRO, BYRNS, BUGA & WOOD, 1987). No ano de 1998, os pesquisadores Furchgott, Ignarro e Murad ganharam o prêmio Nobel de fisiologia. A descoberta desse importante mediador ajudou a entender o papel do endotélio na liberação dessas substâncias, que ajudam a modular o tônus do vaso, calibre vascular e fluxo sanguíneo. Além disso, a liberação de substâncias vasoativas podem ocorrer por estímulos físicos como o estresse de cisalhamento/*shear stress* e químicos (acetilcolina, bradicinina), entre outros.

A ação do endotélio se da por uma liberação de substâncias vasoativas, o qual, por sua vez, é capaz de modular de maneira importante o fluxo sanguíneo, a coagulação e a angiogênese. Essas substâncias liberadas tanto podem causar vasodilatação como o oxido nítrico (NO), prostaciclina e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs), quanto vasoconstrição como prostaglandina,

endotelina I e espécies reativas de oxigênio (EROs) (FELETOU & VANHOUTTE, 2006; MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999).

Outra função importante do endotélio é impedir a proliferação do músculo liso vascular e a adesão de leucócitos. Desta forma, o endotélio intacto medeia funções protetoras por uma maior biodisponibilidade de NO e tem a função antiaterogênica e tromborresistente que vai prevenir a adesão e agregação plaquetária (CAI & HARRISON, 2000; LAURINDO, 2005).

Nesse sentido, o NO tem um papel de destaque na modulação do vaso, sendo considerada uma molécula vasoprotetora com propriedades antiaterogênica, antiproliferativa e antitrombolítica (HARRISON, 1997).

4.2 Óxido nítrico

O NO é um radical livre gasoso, inorgânico e incolor que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado no seu último orbital (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003). Ele tem várias funções no organismo, sendo livremente difusível e tendo a capacidade de atravessar a membrana das células. Sendo assim, o NO é altamente reativo com outros radicais livres e oxigênio molecular (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003). Ele é sintetizado a partir da L-Arginina pela enzima chamada de óxido nítrico sintase (NOS) que originará duas isoformas distintas, a induzível (iNOS) e a constitutiva (eNOS e nNOS). A forma induzida (iNOS) é ativada por macrófagos e independe das concentrações de cálcio; e corresponde ao NO destinado ao sistema imune, induzida por processos inflamatórios. Ja a forma constitutiva depende das concentrações de cálcio citosólica para ser ativada o complexo cálcio/calmodulina (MARLETTA & SPIERING, 2003).

A síntese do NO ocorre através de duas etapas: na primeira vai ocorrer a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina formando N-Hidróxi-L-Arginina que utiliza a NADPH e uma molécula de oxigênio, envolvendo o complexo heme da NOS. Posteriormente, na segunda etapa, vai haver a conversão de n-hidroxi-l-arginina em NO e citrulina (MARLETTA & SPIERING, 2003; ROUSSEAU, LI, COUTURE & YEH, 2005).

A localização da eNOS se da basicamente na região das cavéolas da célula endotelial, e quando ligada à proteína caveolina ela vai estar no estado inativo,

principalmente a calveolina-1 (GRATTON, BERNATCHEZ & SESSA, 2004). Entretanto, uma série de estímulos fisiológicos, estresse de cisalhamento *(shear stress)* e agentes farmacológicos podem estimular o aumento da síntese de NO pela eNOS, sendo esta ativação frequentemente associada ao aumento da concentração de Ca^{2+} e calmodulina (MICHEL & FERON, 1997).

A biodisponibilidade do NO depende basicamente de três fatores: síntese, como descrita anteriormente; inativação, devido à reação com ânions superóxido (O_2^-) e sensibilidade ao NO pelas células alvo (RUSH, TURK & LAUGHLIN, 2003). Desse modo, a avaliação dos dois primeiros fatores (síntese e remoção) vai refletir a biodisponibilidade de NO.

Uma das mais importantes funções do NO no endotélio é impedir a proliferação do músculo liso vascular e adesão de leucócitos, conduzindo a funções protetoras como a melhora da função vasodilatadora, antiaterogênica e tromborresistente que vai prevenir a adesão e agregação plaquetária e ainda agindo como um antioxidante (CAI & HARRISON, 2000; LAURINDO, 2005).

Portanto, o equilíbrio entre a síntese e remoção deste radical é de suma importância para manutenção das funções normais do vaso. Contudo, um desequilíbrio nesse sistema pode, em longo prazo, desencadear uma disfunção endotelial (CAI & HARRISON, 2000; DEANFIELD, HALCOX & RABELINK, 2007).

A FIGURA 1 ilustra os eventos que estimulam os mecanismos de síntese e remoção de NO e seu efeito parácrino no relaxamento do músculo liso, bem como a sua inativação pelo ânion superóxido formando o peróxinitrito ($ONOO^-$), o qual tem propriedades vasoconstritoras, além de promover danos estruturais nas células.

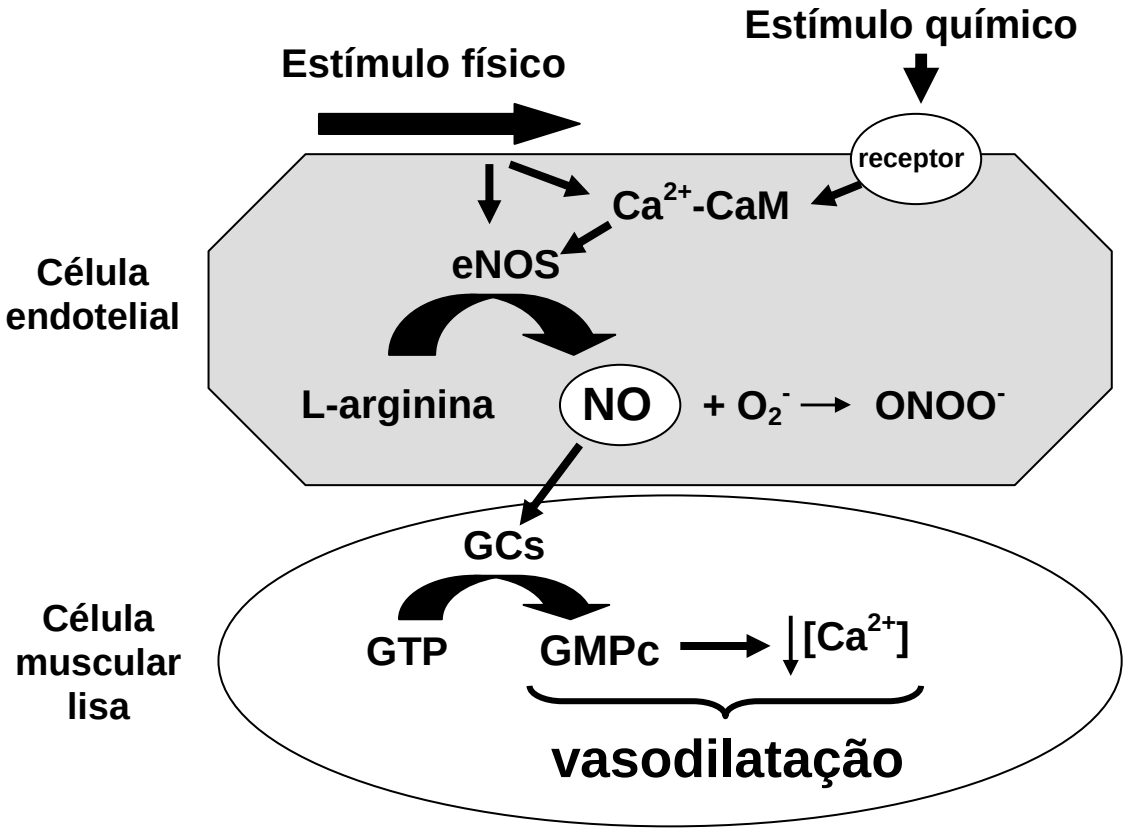


FIGURA 1 - Estímulos e mecanismos envolvidos na síntese e remoção de NO, e seu efeito parácrino no músculo liso vascular que acarretam na vasodilação (adaptado de HARRISSON, 1997).

4.3 Disfunção endotelial e infarto do miocárdio

A disfunção endotelial é caracterizada por uma mudança nas ações do endotélio vascular como redução da vasodilatação, aumento da vasoconstrição, além de um aumento do estado proinflamatório e pro-trombóticos, como já mencionados anteriormente (FELETOU & VANHOUTTE, 2006). Dentre os fatores liberados pelo endotélio, iremos chamar a atenção para o NO. Portanto, a disfunção endotelial pode ser consequência de ambos ou uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) vascular, possivelmente devido a uma menor produção pela enzima síntase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e/ou mais frequentemente, por uma maior inativação de NO

decorrente de uma maior produção vascular de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o radical ânion superóxido (BAUERSACHS & WIDDER, 2008).

O endotélio tem um importante papel no controle do tônus vascular, devido sua posição anatômica, agindo de forma fina no sistema vascular reagindo a qualquer alteração no componente vascular atuando como um verdadeiro sensor biológico. De fato, uma das principais características do endotélio é sintetizar substâncias vasoativas como o NO ou liberando substâncias vasoconstritoras como a endotelina. Isso tudo para manter um ambiente normal para manter as funções do sistema cardiovascular. No entanto, quando esse sistema fino de regulação é quebrado irá originar uma condição de diminuição da função endotelial caracterizado como disfunção endotelial e essa condição é ligada a diversas doenças e fatores de risco cardiovasculares tais como o infarto do miocárdio (IM), hipertensão arterial, Diabetes, fumo e IC entre outras (BAUERSACHS & WIDDER, 2008; CAI & HARRISON, 2000).

Uma das características da fisiopatologia do IM é a ativação dos sistemas neurohumorais que em princípio irá normalizar o DC reduzido (efeito agudo) atuando de forma compensatória. No entanto, com a progressão da doença esses sistemas neurohumorais vão sendo cada vez mais exacerbados, de modo que, cronicamente irá contribuir para a diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, diminuição do DC e aumento da atividade nervosa simpática e do sistema renina angiotensina aldosterona (BACURAU, JARDIM, FERREIRA, BECHARA, BUENO, ALBA-LOUREIRO, NEGRAO, CASARINI, CURI, RAMIRES, MORISCOT & BRUM, 2009; BAUERSACHS & WIDDER, 2008; CAI & HARRISON, 2000; NEGRÃO, 2005).

De fato, a disfunção endotelial geralmente acompanha o paciente com IM e essa disfunção endotelial é consequência de uma elevação nos fatores contráteis e diminuição dos fatores vasodilatadores e com a progressão da doença, esses fatores se elevam cada vez mais, tornando-se dessa forma um ciclo vicioso característico do IMC, contribuindo para uma piora na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes com IM

4.4 Treinamento físico aeróbico contínuo e endotélio

O exercício físico pode ajudar na manutenção da função vascular de forma significativa (SHEPHARD & BALADY, 1999). Nesse sentido, vários estudos mostram que o treinamento físico aeróbio melhora a função vasodilatadora por uma melhora na biodisponibilidade de NO, revertendo à disfunção endotelial tanto em ratos como em humanos. Isso pode ocorrer por um aumento do *shear stress* (Laminar) no vaso (GIELEN, SCHULER & HAMBRECHT, 2001; JOHNSON, RUSH, TURK, PRICE & LAUGHLIN, 2001; MCALLISTER, JASPERSE & LAUGHLIN, 2005; NEGRÃO, 2005; PRAKASH, MYERS, FROELICHER, MARCUS, DO, KALISETTI, FRONING & ATWOOD, 2001; SHEPHARD & BALADY, 1999) podendo reduzir os fatores de risco para doença cardiovascular como dislipidemias e hipercolesterolemia, que cronicamente poderá levar a disfunção endotelial (MYERS, 2003). Este efeito, observado pelo aumento da reatividade vascular, foi descrito tanto em indivíduos (CLARKSON, MONTGOMERY, MULLEN, DONALD, POWE, BULL, JUBB, WORLD & DEANFIELD, 1999) quanto em animais saudáveis (JOHNSON et al., 2001; MCALLISTER, JASPERSE & LAUGHLIN, 2005), como quando associados a diversas doenças (KOBAYASHI, TSURUYA, IWASAWA, IKEDA, HASHIMOTO, YASU, UEBA, KUBO, FUJII, KAWAKAMI & SAITO, 2003; MINAMI, ISHIMURA, HARADA, SAKAMOTO, NIWA & NAKAYA, 2002).

O aumento na vasodilatação dependente do endotélio decorrente do treinamento pode estar relacionado ao aumento do *shear stress* (Laminar) que é a força exercida pelo sangue corrente paralelamente ao eixo longitudinal dos vasos sanguíneos (NIEBAUER & COOKE, 1996) que vai estimular uma maior expressão e atividade da eNOS e das diferentes isoformas da enzima que sequestra o ânion superóxido, a superóxido dismutase (SOD). Estudos têm demonstrado a expressão aumentada da isoforma extracelular (NIEBAUER & COOKE, 1996), citosólica (RUSH, TURK & LAUGHLIN, 2003) e mitocondrial (YOUNG, KNIGHT, VICKERS, WESTBROOK, MADAMANCHI, RUNGE, ISCHIROPOULOS & BALLINGER, 2005), garantindo a bodisponibilidade do NO por sua síntese aumentada e inativação diminuída.

Uma das possíveis causas de melhora da função endotelial se deve à redução da produção de EROs. Em estudo realizado por Adams *et al,* 2005, foi demonstrado que o treinamento aeróbio por si só diminuiu a expressão de subunidades da NAD(P)H oxidase (gp91phox e p22phox), enzima que corresponde a principal fonte geradora de EROs nos vasos. Dessa forma o aumento da expressão da eNOS assume uma grande importância no controle da biodisponibilidade do NO (CAI & HARRISON, 2000; GRAHAM & RUSH, 2004), e esse aumento da expressão da eNOS é de fundamental importância no controle da biodisponibilade do NO, não somente por sintetizá-lo, mas também, devido à influência que o mesmo exerce no aumento da expressão da ec-SOD, uma importante isoforma no controle do estado redox vascular (JUNG, MARKLUND, GEIGER, PEDRAZZINI, BUSSE & BRANDES, 2003).

Entretanto, ainda não se sabe ao certo quais são os mecanismos que estão envolvidos no aumento da expressão da eNOS pós-treinamento físico. Uma das possíveis causas é o aumento do *shear stress* (Laminar) na parede dos vasos que vai estimular um aumento da proteína tirosina quinase –Src aumentando a síntese da enzima eNOS (DAVIS, CAI, MCCANN, FUKAI & HARRISON, 2003). Sendo assim, as células endoteliais que estão em contato direto com o sangue circulante, irão ser submetidas ao estresse mecânico na parede dos vasos, estimulando a síntese de NO (BOO & JO, 2003; FISHER, CHIEN, BARAKAT & NEREM, 2001).

McCabe *et al.* (MCCABE, FULTON, ROMAN & SESSA, 2000), verificaram em cultura de células, que o *shear stress* aumentado ativa a proteína quinase B (Akt), que por sua vez, fosforila a eNOS em resíduos serina, aumentando a sensibilidade desta enzima ao Ca^{2+}/calmodulina, ou seja, estimulando a síntese de NO sem a necessidade de alterar as concentração basais destes fatores. Entretanto, este mecanismo ainda não foi demonstrado sob estímulo do exercício.

Desta forma, o treinamento físico aeróbico contínuo de leve/moderada intensidade pode melhorar a vasodilatação endotélio dependente, por conta do aumento do *shear stress* na parede do vaso que pode aumentar a expressão da eNOS consequentemente aumentando a biodisponibilidade de NO no vaso (GRAHAM & RUSH, 2004).

4.5 Treinamento físico aeróbico intervalado e endotélio

O treinamento intervalado/intermitente é caracterizado por longas ou curtas sessões de exercícios em alta intensidade (igual ou superior à máxima fase estável do lactato) com períodos de recuperação com exercícios de intensidade leve ou repouso (recuperação ativa ou passiva, respectivamente). Esse tipo de treinamento vem sendo utilizado há décadas por atletas de alto nível para melhora no rendimento esportivo (BILLAT, 2001a; b). De fato, vários fatores podem influenciar as respostas e adaptações ao treinamento intervalado, dentre elas podemos citar a intensidade do esforço e da recuperação (95% do VO_{2pico} em alta intensidade e 70% em baixa intensidade), a duração do exercício e da recuperação (4' em alta intensidade e 3' em baixa intensidade) e relação esforço-recuperação (4:3) (BALLOR & VOLOVSEK, 1992; BILLAT, 2001a).

Já está bem estabelecido que o TC é uma importante ferramenta não farmacológica na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares (DCV) (NEGRAO & MIDDLEKAUFF, 2008). Por outro lado, recentemente tem sido descrito que exercícios com uma intensidade maior do tipo intervalado, podem promover benefícios similares ou superiores aos encontrados com o TC em pacientes com IC, doença arterial coronariana (DAC) e síndrome metabólica, quando o trabalho total do treino é equalizado (ROGNMO et al., 2004; TJONNA et al., 2008; WISLOFF, ELLINGSEN & KEMI, 2009; WISLOFF et al., 2007). Portanto, para que indivíduos com DCV e fatores de risco associados possam atingir uma maior intensidade, essa sessão de treino terá que ser realizada de maneira intervalada, alternando períodos em alta intensidade com períodos de recuperação em baixa intensidade (WISLOFF et al., 2007), permitindo ao indivíduo se manter por mais tempo em alta intensidade quando comparado ao exercício aeróbico contínuo.

Além disso, observa-se que o aumento do VO_{2pico} está diretamente relacionado ao aumento da taxa de sobrevida desses pacientes, melhora da função endotelial, melhora da capacidade funcional e qualidade de vida, além de reduzir os fatores de risco como obesidade, colesterol e melhora da sensibilidade à insulina (BILLAT, 2001a; HARAM et al., 2009; ROGNMO et al., 2004; TJONNA et al., 2008; WISLOFF, ELLINGSEN & KEMI, 2009; WISLOFF et al., 2007).

Entretanto, ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos envolvidos numa possível melhor efetividade do treinamento aeróbico de alta intensidade do tipo intervalado em comparação com o treinamento aeróbico moderado contínuo nas adaptações cardiovasculares em pacientes com IM e IC.

Devemos destacar que a grande variedade de opções de combinações das variáveis intensidade e duração dos intervalos, e tempo total do exercício, constitui um fator importante de interferência na análise dos efeitos do treinamento físico intervalado nas adaptações cardiovasculares. No que diz respeito à padronização dos tipos de treinamentos investigados (contínuo vs. intervalado), alguns estudos só levaram em consideração o nível do gasto calórico total e distância total percorrida como forma de equalizar o volume de cada sessão de treino (TJONNA et al., 2008; WISLOFF et al., 2007).

Deste modo, os benefícios fisiológicos obtidos pelo treinamento aeróbico intervalado nesses estudos, podem ter sido em função do maior tempo de exercício realizado em uma maior intensidade média do consumo máximo de oxigênio, comparados ao treinamento aeróbico contínuo. De fato, tem sido observado que os benefícios do treinamento intervalado são tempo-dependentes, isto é, quanto mais tempo o indivíduo se exercitar próximo do $VO_{2máx}$, maiores serão os benefícios desse tipo de treinamento (BILLAT, 2001a; b; BILLAT et al., 1999; GIBALA & MCGEE, 2008).

Deste modo, ainda não estão bem estabelecidos quais os mecanismos envolvidos numa possível melhor efetividade do TI em comparação com o TC nas adaptações cardiovasculares em pacientes com IM.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra e manipulação dos animais

Foram estudados 60 ratos Wistar machos, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com peso inicial de (280-320 gramas). Os animais foram alocados em 4 animais por caixa onde foram alimentados com ração (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, Brasil) e água *ad libitum* e

permaneceram em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h (início do ciclo escuro às 6:00 h) e temperatura de 23 ± 2 ºC. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da USP (protocolo nº 2010/11).

5.2 Protocolo experimental

Inicialmente, os ratos foram distribuídos, ao acaso, em dois grupos experimentais: grupo operação fictícia (SHAM) e grupo infarto do miocárdio (IM). Após um período de 4 semanas da cirurgia cardíaca, os ratos do grupo IM foram distribuídos, ao acaso, em três sub-grupos de acordo com o protocolo de treinamento físico: grupo sedentário (SED), grupo treinamento físico aeróbico moderado contínuo (TC) e grupo treinamento aeróbico intenso intervalado (TI) enquanto os ratos do grupo SHAM permaneceram sedentários.

Assim, foram constituídos 4 grupos experimentais: SHAM, IM-SED, IM-TC e IM-TI (QUADRO 1). Ao final de 8 semanas de treinamento físico ou sedentarismo, todos os ratos foram sacrificados para a retirada dos tecidos e posterior análises funcionais e bioquímicas.

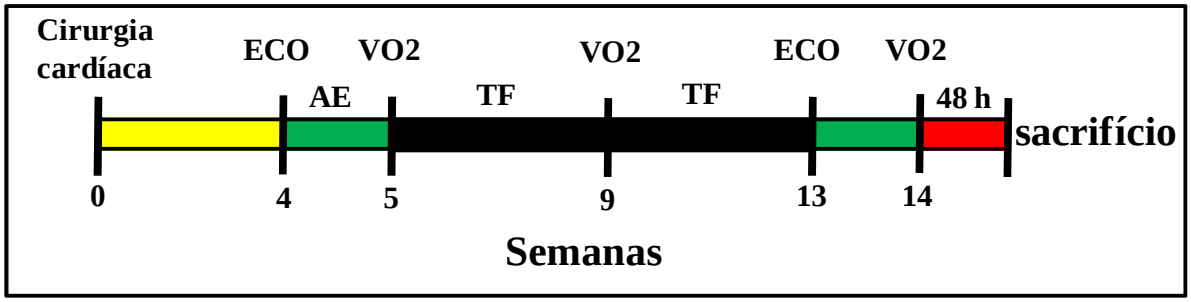
QUADRO 1. Distribuição dos grupos de acordo com os fatores experimentais estudados:

Controle(SHAM)	**IM-SED**	**IM-TC**	**IM-TI**
(N=10)	(N=10)	(N=7)	(N=7)

5.2.1 Sequência experimental

QUADRO 2 apresenta a sequência dos protocolos experimentais utilizados e seus respectivos períodos de realização, os quais estão descritos a seguir.

QUADRO 2: Sequência experimental



5.3 Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio

Os ratos foram submetidos à cirurgia de indução do infarto do miocárdio (IM) ou cirurgia fictícia (SHAM). Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50mg.kg^{-1}) e xilazina (10mg.kg^{-1}) com uma dose intraperitoneal e em seguida, entubados para ventilação mecânica (60-70 ventilações.min^{-1}, 2,5 ml.pulso^{-1}). Após toracotomia sob condições assépticas e abertura do pericárdio, os animais dos grupos IM tiveram a artéria coronária descendente esquerda ligada distalmente a três milímetros de sua origem com fio de polipropileno (5.0, ETHICON, Brasil). Logo em seguida, após o tórax ser fechado do o pneumotórax foi retirado com uma agulha estéril (JOHNS & OLSON, 1954). Os animais controle (SHAM) passaram por procedimento cirúrgico semelhante, entretanto sem a ligação da artéria coronária. Após o procedimento cirúrgico, os ratos passaram por um período de repouso de 30 dias, a fim de que desenvolvessem alterações em função do IM, antes de iniciarem os protocolos de treinamento físico.

5.4 Caracterização do infarto do miocárdio

Para confirmar o IM, a disfunção ventricular foi avaliada por meio de avaliação ecocardiográfica. O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado em todos os ratos aos 30 e 90 dias após a cirurgia cardíaca, ou seja, pré e pós-período de treinamento físico. Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de três medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente as médias dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura de Xilasina (0,67 mg/Kg) e Ketamine (0,33 mg/kg). O animal anestesiado foi colocado em decúbito lateral em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizando o equipamento Sonos 5500 (Philips, Andover, Mass) com equipado com transdutor linear de 14 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. Para o registro das imagens foi utilizado o posicionamento de três eletrodos, permitindo a visualização do sinal eletrocardiográfico, para o registro da frequência cardíaca. As imagens foram armazenadas em um DVD, para análise posterior.

Após avaliação ecocardiográfica, apenas os ratos possuidores de área de infarto superiores a 20% da massa total do ventrículo esquerdo foram considerados pertencentes ao grupo IM.

5.5 Protocolo de determinação da potência aeróbica.

Após a realização da avaliação ecocardiográfica, todos os ratos foram adaptados à esteira rolante por um período de uma semana. Em seguida, foram submetidos a um teste de esforço máximo em esteira rolante, onde foram determinados o consumo de oxigênio de pico (VO_{2pico}), a velocidade máxima de corrida e a distância total percorrida. O teste de esforço foi realizado pré-TF, após 4 semanas de TF, para ajuste da prescrição da intensidade, e pós-TF, para determinação dos efeitos dos treinamentos.

Foi utilizado um protocolo de corrida com incremento progressivo de velocidade com velocidade inicial de 6 m/min e incrementos de 3m/min a cada 3 min com inclinação constante de 20º, até a exaustão. A exaustão foi definida como a velocidade máxima suportada pelo animal, antes de entrar em fadiga. A inclinação da

esteira em 20º foi previamente determinada (estudo piloto) como a que proporcionou maiores valores de VO_{2pico} nos ratos (FGURA 2).

A medida do VO_{2pico} durante o teste de esforço foi realizada por meio de espirometria de circuito aberto, utilizando-se uma caixa metabólica posicionada sobre a esteira rolante e conectada a uma bomba de sucção (fluxo de ar) e analisador de oxigênio (BROOKS & WHITE, 1978). Nesse estudo, foi utilizada uma caixa metabólica (9,5 x 32,5 x 11,5 cm) subdividida, internamente na sua porção superior (0,9 cm), por uma placa que possui 64 furos (0,3 cm de diâmetro) e que serve como uma câmara de mistura. A essa câmara foi conectado um tubo na forma de "Y", por onde o ar foi aspirado (2,5 l/min) por uma bomba (FANEM, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo (1mL/min), foi retirada e direcionada para o analisador de gases (Sable Systems Subsampler Version 3, SS-3). A parte da frente da caixa possui uma abertura de 0,2 cm da superfície que permite a entrada de um fluxo de ar unidirecional sugado pela bomba de sucção.

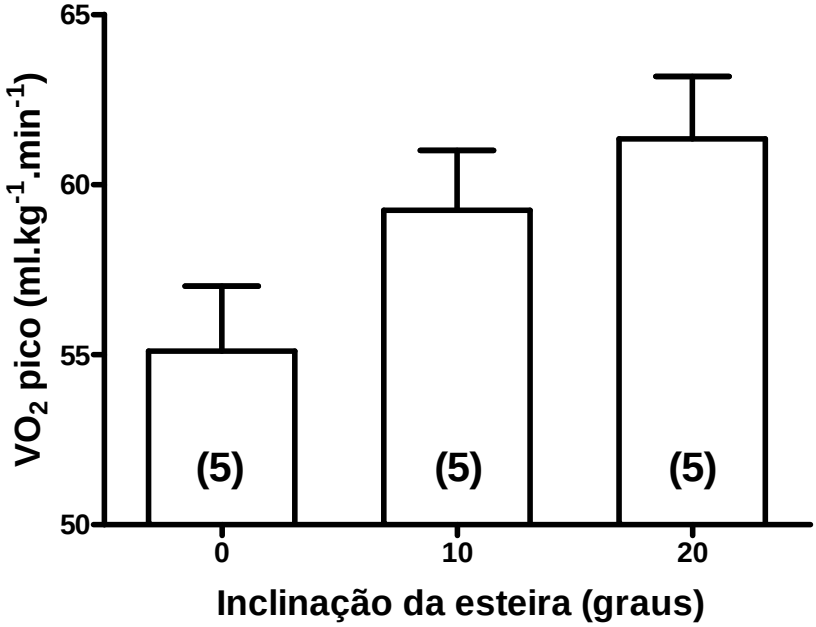


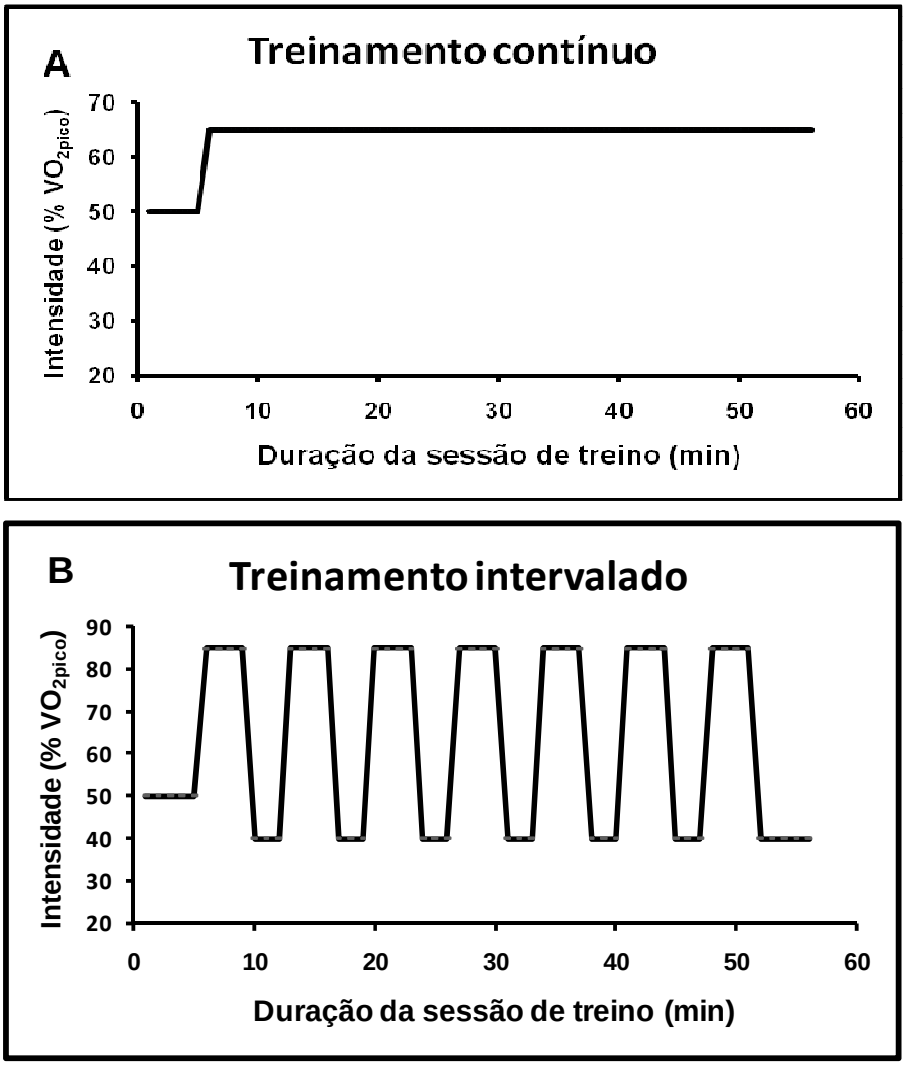
FIGURA 2 – Valores de VO_{2pico} em três diferentes inclinações na esteira rolante, determinados em um mesmo grupo de ratos.

5.6 Protocolos de treinamento físico

Após o período de 4 semanas da cirurgia cardíaca e imediatamente após a determinação do VO_{2pico}, os ratos dos sub-grupos de treinamento físico do grupo IM foram submetidos a dois protocolos distintos de treinamento físico em esteira rolante, descritos a seguir, por um período de 8 semanas, numa frequência de 5 vezes por semana.

Protocolo de treinamento moderado contínuo (TC): após 5 min de aquecimento em baixa velocidade, os ratos correram a uma velocidade correspondente a 65% do VO_{2pico}, inclinação de 20º, durante 49 minutos (QUADRO 3 A).

Protocolo de treinamento aeróbico intenso intervalado (TI): após 5 min de aquecimento em baixa velocidade, os ratos realizaram 7 blocos de corrida com intensidade intervalada, constituídos de 4 min a 85% VO_{2pico} (intensidade alta) e 3 min a 40% VO_{2pico} (intensidade baixa), inclinação de 20º, totalizando 49 min (QUADRO 3 B).



QUADRO 3 – Representação esquemática dos protocolos de treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada (A) e intervalado de alta intensidade (B).

5.6.1 Equalização do treinamento físico

É importante destacar que a velocidade de corrida desenvolvida em cada sessão de treino foi o único parâmetro diferente entre os dois tipos de TF empregados (TC vs. TI), enquanto o trabalho total realizado (gasto calórico total), calculado pelo produto do tempo e intensidade (%VO_{2pico}), foi propositadamente

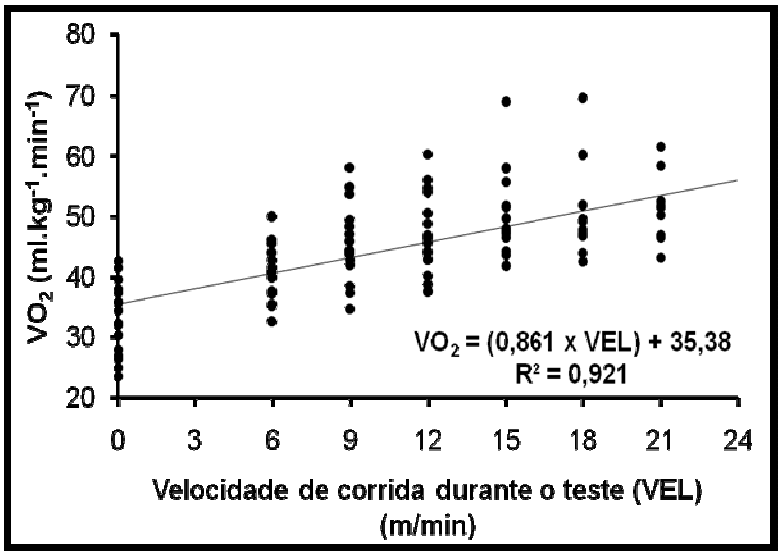
semelhante (equalizado) nos dois tipos de TF. Essa equalização teve por objetivo comparar o efeito da velocidade intermitente vs. velocidade contínua, e eliminar fatores de interferência como duração e gasto energético total das sessões de treino.

Uma vez que a duração total de cada sessão de treino foi semelhante entre TC e TI (49 min), a equalização do trabalho total requereu a aplicação de uma intensidade também semelhante (65%VO_{2pico}). Assim, para determinação da intensidade média do TI em 65%VO_{2pico}, utilizou-se a seguinte equação: tempo em que se passa em alta intensidade, multiplicado pela %VO_{2pico} em alta intensidade mais o tempo em que se passa em baixa intensidade, multiplicado pela %$VO_{2\ pico}$ em baixa intensidade, dividido pelo tempo total de cada bloco.

Intensidade = ((4 min x 85%) + (3 min x 40%))/ 7 min= **65% VO_{2pico}**

5.6.2 Determinação da velocidade de corrida

Dado que a velocidade da corrida na esteira apresenta correlação positiva com o VO_2 (r^2>0,9), (QUADRO 4), utilizou-se a equação de regressão linear (VO_2 x Velocidade) para a identificação da velocidade de corrida correspondente ao percentual do VO_{2pico} estabelecidos para cada um dos grupos de ratos treinados.



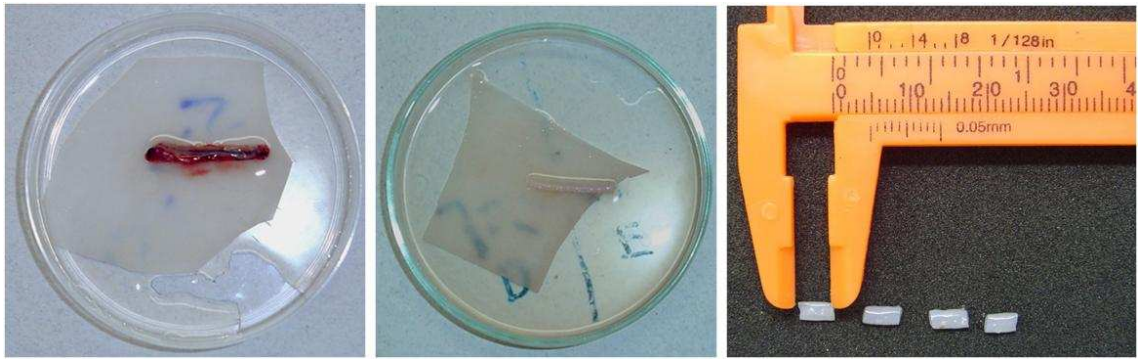
QUADRO 4 – Consumo de oxigênio ao longo de um teste de intensidade progressiva.

5.7 Morte dos animais

A fim de se evitar a influência dos efeitos do exercício agudo (última sessão de exercício), os ratos dos grupos treinados foram sacrificados, por decapitação, após um período de repouso de 48 h da última sessão de treino.

5.8 Remoção e preparação da aorta

A aorta torácica foi imediatamente removida e dissecada em uma placa de petri contendo tampão Krebs-Henseleit para a remoção dos tecidos conectivo e adiposo, cortada em 6 anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento, os quais foram distribuídos da seguinte maneira: 2 anéis frescos para análise da função vasomotora, 2 anéis foram congelados para avaliar a expressão das proteínas eNOS Total e Akt-1(Total e fosforilada) anéis foram congelados para análise da produção de superóxido e quantificação de nitrato e nitrito (FIGURA 3).



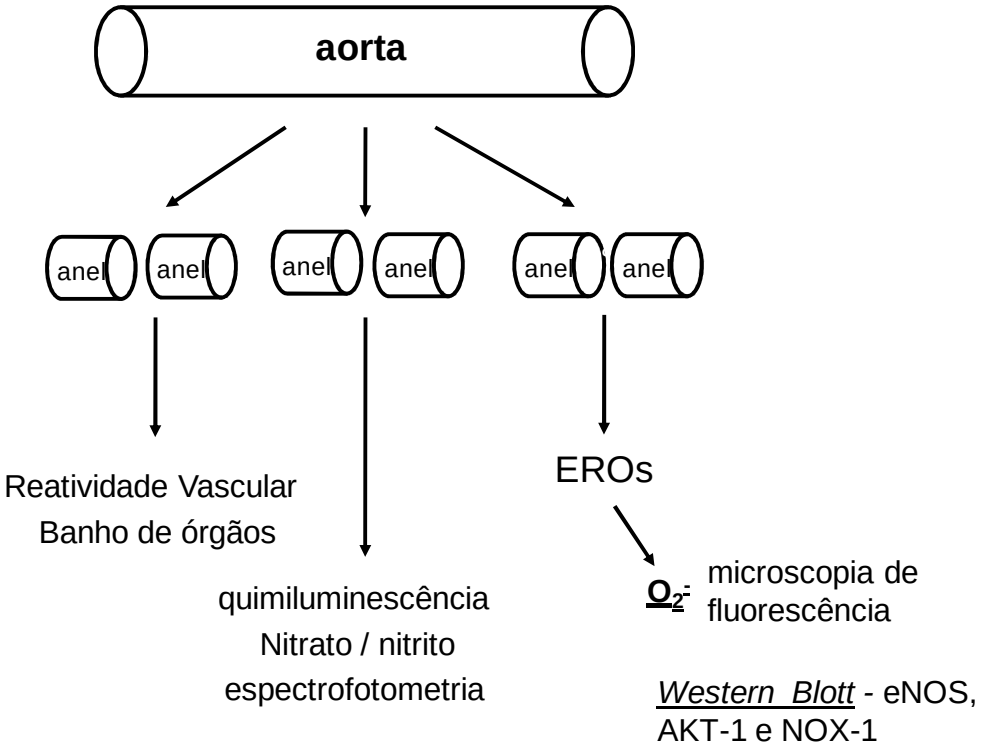


FIGURA 3 **-** Esquema da remoção e preparação da aorta torácica.

5.9 Estudo da reatividade vascular *"in vitro"*

Com a finalidade de se avaliar as curvas concentração-resposta "*in vitro*", as respostas de tensão isométrica desenvolvida pelos anéis aórticos frente aos diferentes agonistas utilizados no protocolo, os anéis foram suspensos, através de um par de ganchos de aço inoxidável, em uma cuba de vidro para órgão isolado contendo 14 mL de solução Krebs-Henseleit (descrito anteriormente), mantidos a 37ºC e gaseificada com uma mistura gasosa de 95% O_2 e 5% CO_2 (carbogênio) e pH em 7.4.

Um gancho foi fixado na parte inferior da cuba enquanto o outro gancho foi conectado a um transdutor de sinal isométrico (BIOPAC, EUA), acoplado a um computador para o registro da tensão isométrica desenvolvida pelo vaso.

Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso inicial de 2 gramas, e mantidos nesta tensão durante 60 minutos para que ocorresse a estabilização decorrente do manuseio. Durante o período de estabilização foi realizado a troca da solução Krebs a cada 20 minutos, com a finalidade de remover eventuais metabólitos liberados no meio.

Os protocolos de reatividade vascular, descritos a seguir, foram realizados em dois anéis de um mesmo rato e em dois ratos de grupos diferentes (SED e TF), simultaneamente, utilizando-se 4 cubas para o experimento. A ordem de sacrifício dos ratos foi alternada a fim de se minimizar variações diárias sobre os resultados.

Após um período de estabilização de aproximadamente 60 minutos os seguintes protocolos foram realizados (QUADRO 5):

5.9.1 Estudo da resposta vasodilatadora à acetilcolina

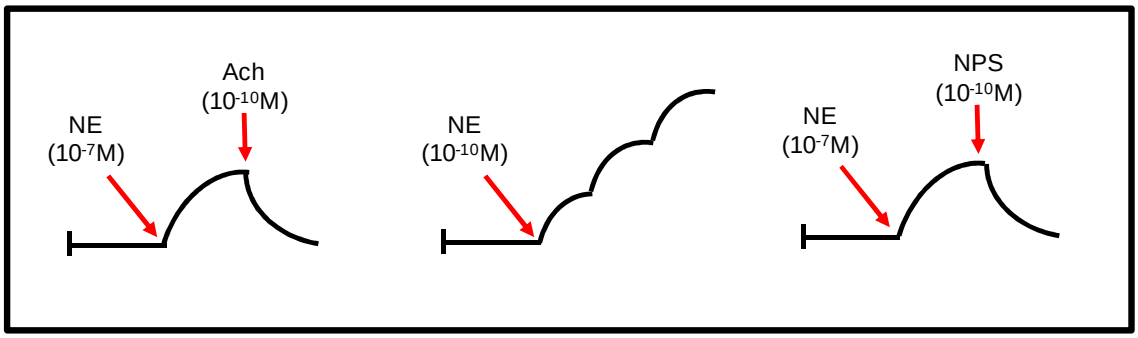
Foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas ao agente vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina (ACh; 10^{-10} a 10^{-4} M), em dois anéis de um mesmo rato (pareados), pré-contraídos com noradrenalina até aproximadamente 50% da contração máxima (10^{-7} M). Para analisar o papel do NO na resposta de relaxamento induzida por acetilcolina, um anel foi pré-incubado durante 30 minutos com o inibidor da síntese da eNOS, *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 10^{-4} M) e outro sem a incubação.

5.9.2 Resposta vasoconstritora à noradrenalina

Em seguida, foi realizada novamente a troca da solução Krebs e após período de estabilização de 20 minutos foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas ao agente vasoconstritor noradrenalina (NE; 10^{-10} a 10^{-4} M).

5.9.3 Resposta vasodilatadora independente do endotélio

Para avaliar a resposta vasodilatadora independente do endotélio em aorta torácica de ratos SHAM e IM foram realizadas curva concentração-resposta ao agente doador de NO, o nitropussiato de sódio (NPS) nos anéis previamente contraídos com noradrenalina (10^{-7} M) até aproximadamente 50% da contração máxima induzida pela NE.



QUADRO 5 – Representação esquemática do protocolo experimental realizado nos experimentos de reatividade vascular em aorta torácica de ratos SHAM e IM. Ach: acetilcolina; NE: noradrenalina; NPS: nitropussiato de sódio.

5.9.4 Variáveis avaliadas na reatividade vascular

Para cada curva concentração-resposta foi avaliada a resposta máxima (Emax) ao agonista constritor (tensão máxima) e dilatadores (% relaxamento) e a determinação da concentração de agonista que produz metade da resposta máxima (EC_{50}). A média das EC_{50} foi representada como o algoritmo da média aritmética dos log EC_{50} de cada rato, com intervalo de confiança de 95%.

5.10 *Western blotting:*

Após ser triturada em cadinho, a aorta torácica foi homogeneizadas em tampão a 4ºC (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e PMSF 2 mM).

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4ºC por 20 minutos para remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo protéico total foi quantificado utilizando o método Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o kit da BioRad, albumina bovina como padrão e espectofometria em comprimento de onda de 595 nm. Amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 200 mM e 50 a 70 ug de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (extrato total). Em cada gel havia um marcador com peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de uma aparelho da BioRad por 12 h a 230 mA. O tampão contendo RIPA Lysis Buffer, coquetel inibidor de proteases (diluição 1:5000), fluoreto de sódio (100 mM), pirofosfato de sódio (10 mM), ortovanadato de sódio (100 mM) e PMSF (10 mM) foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4ºC por 1 hora para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana.

Em seguida, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos:

1) anti eNOS (coelho Cell Signaling, 1:1000), anti-NOX-1 (goat polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, USA), anti- Akt (coelho Cell Signaling, 1:1000).

Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (0,3% de BSA aon invés de leite), por 12 h a 4ºC e a concentração dos anticorpos foi de 1:1000. . Após a lavagem com Em seguida as membranas foram lavadas com a TBS-T 0,1% (3 vezes por cinco minutos cada). Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase, por 1 h em temperatura ambiente e, logo após, com a solução de detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do

kit (ECLplus, Amersham). A emissão de luz foi detectada e visualizada no sistema de captação de imagens MF-Chemibis – Bio Imaging System (BioAmerica, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (*ImageJ*).

5.11 Quantificação de nitrato e nitrito vascular

Para medir a biodisponibilidade vascular de NO, foram determinadas, por quimioluminescência em um analisador de $NO^{\cdot}$ (Sievers, modelo NOA 280, EUA), as concentrações de nitrato e nitrito, produtos do metabolismo do NO, nos homogenatos totais das artérias (10ul) conforme descrito em Leite et al (2003). Este método requer a redução de nitrato e nitrito para óxido nítrico por meio da reação do cloreto de vanádio (VnCl4) em ácido clorídrico a 95° C. O óxido nítrico gerado é carregado por N_2, um gás inerte, a uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, quantificada por fotomultiplicadoras. As curvas de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio, Aldrich), utilizando-se um programa específico (Sievers versão 2.2, EUA). Os valores medidos de nitrato foram expressos pela quantidade total de proteínas dos homogenatos (método Bradford).

5.12 Índice de produção de espécies reativas de oxigênio vascular

Devido às dificuldades de se caracterizar precisamente a produção ou biodisponibilade de EROs (TARPEY & FRIDOVICH, 2001), foi utilizado o método qualitativo, utilizando o Hidroetídio (DHE) como marcador.

Primeiramente, um anel aórtico de cada animal foi emblocado em gel de congelamento (OCT), e posteriormente cortados (30 um) no criostato.

As lâminas com os cortes foram incubadas com o DHE (5 uM) por 20 minutos a 37 ºC em ambiente úmido e protegido de luminosidade. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e a análise foi feita em microscopia confocal de fluorescência, conforme método

adaptado de Miller et al (1998) (MILLER, GUTTERMAN, RIOS, HEISTAD & DAVIDSON, 1998).

Os derivados de oxidação DHE geram uma coloração avermelhada, sendo proporcional a produção de espécies reativas de oxigênio. Para demonstrar a especificidade do método para superóxido, algumas lâminas foram previamente incubadas com a enzima superóxido dismutase conjugada com polietilenoglicol (peg-SOD), um mimético da SOD que é capaz de atravessar a membrana da célula, eliminar o $O_2^{-\cdot}$ e assim diminuir a oxidação do DHE (controle negativo).

5.13 Análise estatística

Os dados serão apresentados como média ± erro padrão. As variáveis dependentes: massa corporal, Vel.Máx., tempo de tolerância ao esforço, respostas vasomotoras máximas e bioquímica aórtica foram analisadas pela ANOVA de 1 via e *post hoc* de *Tukey.* As curvas concentração-efeito foram analisadas pela ANOVA de 2 fatores: fator grupo (SHAM, IM-SED, IM-TC e IM-TI) e fator dose de agosnista, e *post hoc de Bonferroni*. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism* (v. 4.00, San Diego, CA). Foi adotado como estatisticamente significante o valor de $P<0,05$.

6 RESULTADOS

Neste tópico, apresentaremos os resultados funcionais e bioquímicos obtidos em aorta de ratos. Os resultados serão apresentados na seguinte ordenação:

a) Caracterização dos animais

- Área do infarto do miocárdio
- Massa corporal
- Razão massa do coração/massa corporal

b) Capacidade funcional do rato

- Consumo pico de oxigênio (VO_{2pico})
- Distância total percorrida na esteira

c) Resposta vasomotora aórtica

- Resposta vasodilatadora à acetilcolina
- Resposta vasoconstritora à noradrenalina
- Resposta vasodilatadora endotélio-independente ao NPS
- Efeito máximo (Emax) do agonista constritor noradrenalina (NE)
- Efeito máximo (Emax e EC_{50}) do agente vasodilatador endotélio-dependente acetilcolina (ACh)

d) Análises bioquímicas

- Concentração de nitrato e nitrito vascular
- Expressão da enzima eNOS/peNOS (ser^{1177})
- Expressão e atividade da enzima AKT-1/pAKT (ser^{473})
- Expressão da enzima NOX-1
- Produção de superóxido no vaso (DHE)

6.1 Caracterização do infarto

Ao final dos experimentos, a área infartada do miocárdio não foi significativamente diferente entre os grupos e correspondeu a 21 ± 2,8 % (IM-SED), 27 ± 3,9 % (IM-TC) e 25 ± 3,3 % (IM-TI).

6.1 Massa Corporal

Ao final dos experimentos, a massa corporal não foi significativamente diferente entre os grupos (FIGURA 4), demonstrado que nem o infarto do miocárdio nem os diferentes protocolos de TF apresentaram efeito sobre a massa corporal dos ratos.

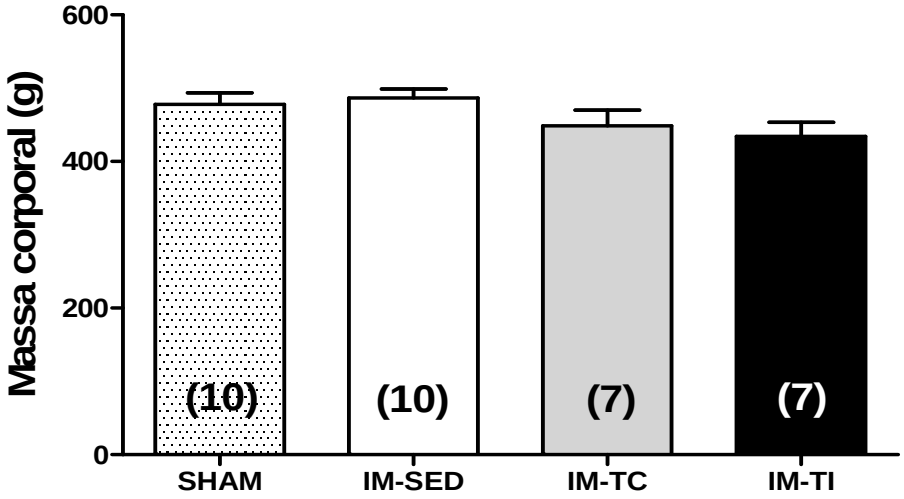


FIGURA 4 – Massa corporal dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto- sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Resultados representam média ± erro padrão.

6.1.1 Razão massa do coração/massa corporal

A razão massa do coração/ massa corporal dos ratos do grupo IM-SED foi semelhante ao grupo SHAM-SED, demonstrando que os ratos infartados não desenvolveram hipertrofia cardíaca compensatória. Além disso, ambos os protocolos de TF estudados não modificaram está razão nos grupos IM-TC e IM-TI (FIGURA.5)

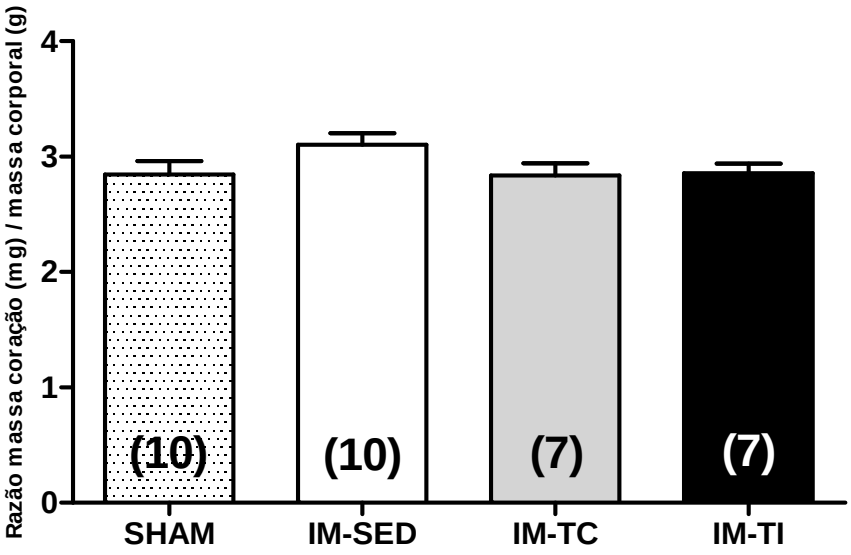


FIGURA 5 – Razão massa do coração/massa corporal dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Resultados expressos como média ± erro padrão da média.

6.2 Capacidade funcional pós-período experimental

6.2.1 Consumo pico de oxigênio (VO_{2pico})

Ao final do período de TF ou sedentarismo, o VO_{2pico} foi significativamente menor no grupo IM-SED comparado ao grupo SHAM (FIGURA 6). Além disso, ambos os grupos IM-TC e IM-TI aumentaram significativamente o VO_{2pico} comparados aos grupos SHAM e IM-SED. Esses resultados demonstram a efetividade dos protocolos de TF empregados.

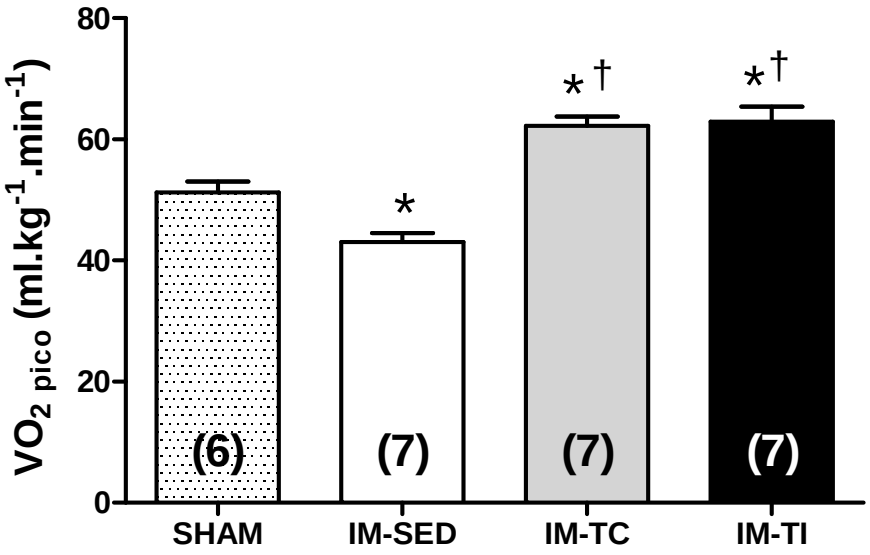


FIGURA 6 - Consumo de oxigênio de pico após o período de treinamento físico ou sedentarismo dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. *P<0,05 vs. SHAM-SED; † P<0,01 vs. SHAM e P<0,001 vs IM-SED. Resultados expressos como média ± erro padrão.

6.2.2 Distância total percorrida

Ao final do período de TF ou sedentarismo, a distância total percorrida no teste máximo foi significativamente menor no grupo IM-SED comparado com o grupo SHAM (FIGURA.7). Ambos os grupos IM-TC e IM-TI aumentaram significativamente a distância total percorrida, quando comparados aos grupos SHAM e IM-SED. Demonstrando a eficácia dos protocolos de treinamento físico empregados.

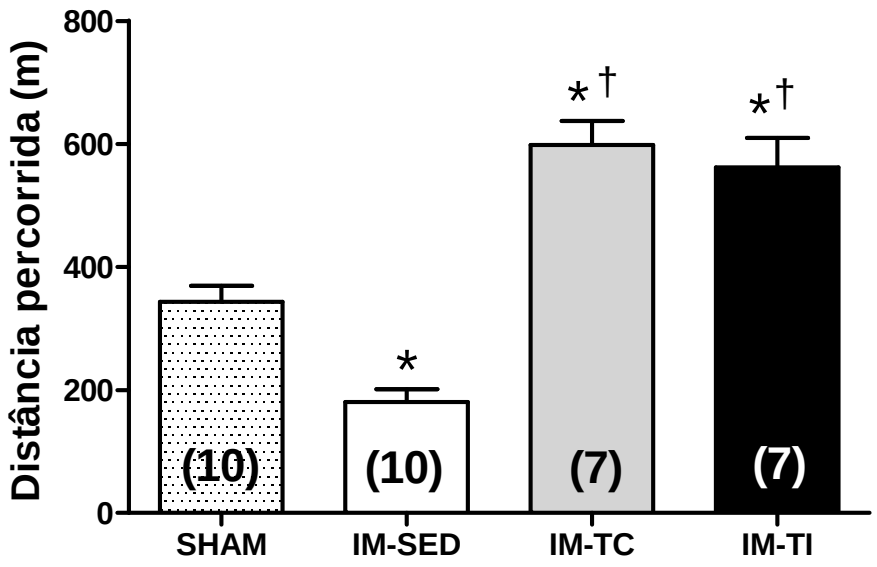


FIGURA 7- Distância total percorrida após o TF ou sedentarismo dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * P<0,05 vs. SHAM; † P<0,01 vs. SHAM e P<0,001 vs IM-SED. Resultados expressos como média ± erro padrão.

6.3 Resposta vasomotora aórtica *in vitro*

6.3.1 Relaxamento à acetilcolina

A FIGURA 18 ilustra a curva de relaxamento à ACh (endotélio dependente) em anéis da aorta torácica. O percentual de relaxamento máximo foi significativamente menor no grupo IM-SED (63,32 ± 8,7%) comparado ao grupo SHAM (102,0 ± 3,3%), demonstrando que o protocolo de IM empregado foi eficiente em provocar disfunção endotelial aórtica. Por outro lado, ambos os protocolos de TF empregados modificaram significativamente a resposta vasodilatadora máxima no grupo IM-TC (102,8 ± 4,4%) e no grupo IM-TI (103,7 ± 4,1%).

A sensibilidade à acetilcolina foi significativamente menor no grupo IM-SED (-7,69 ± 0,47, Log[M]) comparado ao grupo SHAM (-8,34 ± 0,11, Log[M]). Por outro lado, ambos os protocolos de TF foram eficiente em melhorar a sensibilidade à acetilcolina (IM-TC: -8,25 ± 4,42 e IM-TI: -8,12 ± 4,13, Log[M]).

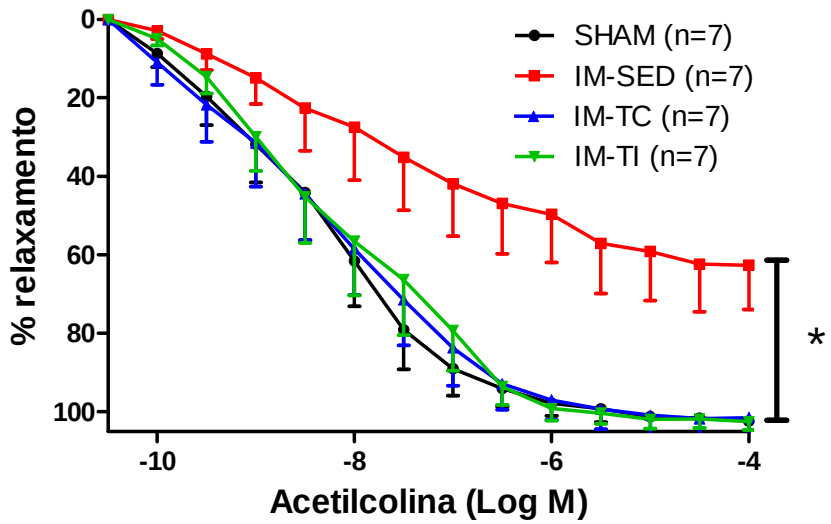


FIGURA 8 - Curva concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em anéis da aorta torácica dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). *p□0,05 vs. IM-SED. Valor representa média ± erro padrão.

6.3.2 Resposta constritora à noradrenalina

A FIGURA 9 demonstra a resposta constritora à NE. A resposta máxima à NE foi significativamente maior no grupo IM-SED (4,95 ± 0,33g) comparado ao grupo SHAM (3,28 ± 0,19g). Por outro lado, ambos os protocolos de TF empregados foram eficientes em diminuir a resposta máxima à NE, comparados ao grupo IM-SED. Dessa maneira, restaurando a resposta máxima à NE dos grupos IM-TC (3,71 ± 0,17g) e IM-TI (3,55 ± 0,16g) aos valores do grupo SHAM. De fato, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos TF e SHAM na sensibilidade (EC_{50}) e resposta máxima à NE.

A sensibilidade à NE não foi significativamente diferente entre os grupos IM-SED (-6,57 ± 0,18, Log[M]), SHAM (-6,59 ± 0,15, Log[M]), Por outro lado, ambos os protocolos de TF tiveram uma tendência em diminuir a sensibilidade à acetilcolina (IM-TC: -6,38 ± 0,09 e IM-TI: -6,42 ± 0,12, Log[M]).

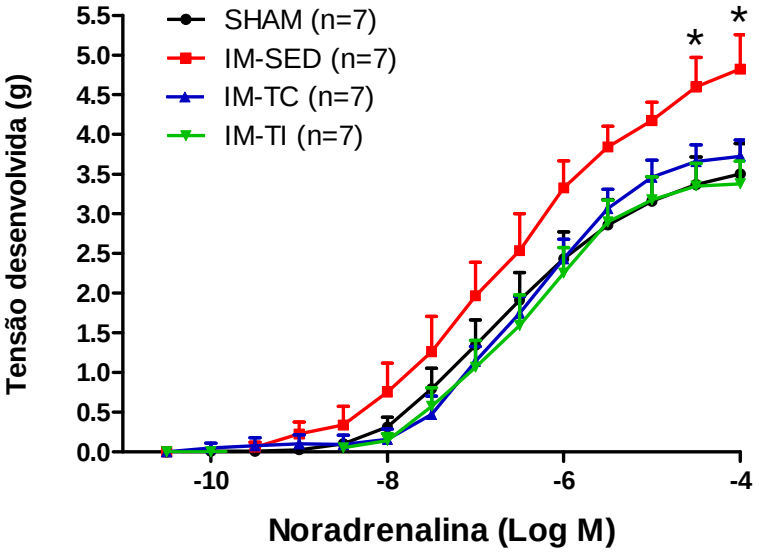


FIGURA 9 – Curva concentração-efeito à noradrenalina em anéis da aorta torácica dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valores representam média ± erro padrão. * $p<0,05$ vs. SHAM, IM-TC ou IM-TI.

6.3.3 Resposta vasodilatadora endotélio-independente

A FIGURA 10 demonstra a curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta torácica. A resposta vasodilatadora ao NPS foi de aproximadamente 100% e semelhante entre todos os grupos estudados.

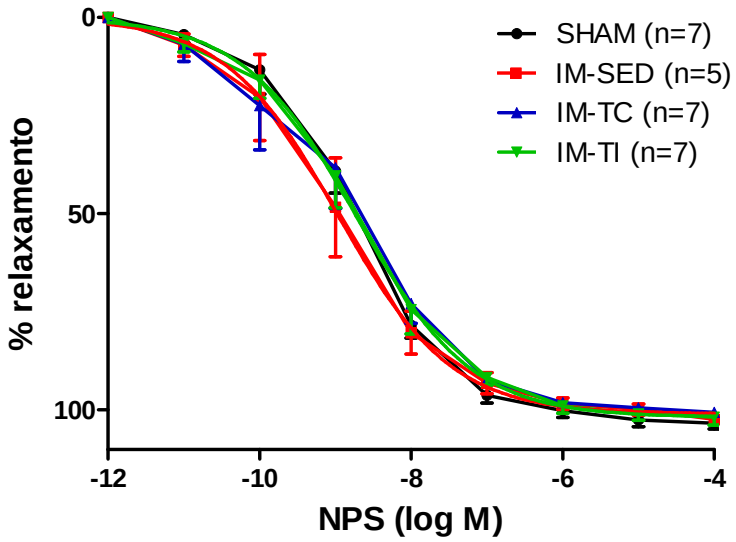


FIGURA 10 – Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis da aorta torácica dos grupos SHAM, infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valores representam média ± erro padrão.

6.4 Concentração de nitrato e nitrito vascular

Como se verificou que ambos os protocolos de TF empregados apresentaram efeitos significativos em aumentar sensibilidade à ACh e em atenuar a vasoconstrição à NE, determinamos a razão nitrito/nitrato como um índice de biodisponibilidade basal de óxido nítrico nos anéis aórticos (FIGURA 11). A razão nitrito/nitrato foi significativamente menor no grupo IM-SED comparado ao grupo SHAM. O grupo IM-TC apresentou razão nitrito/nitrato significativamente maior que SHAM e IM-SED, mas o mesmo efeito não foi verificado no grupo IM-TI.

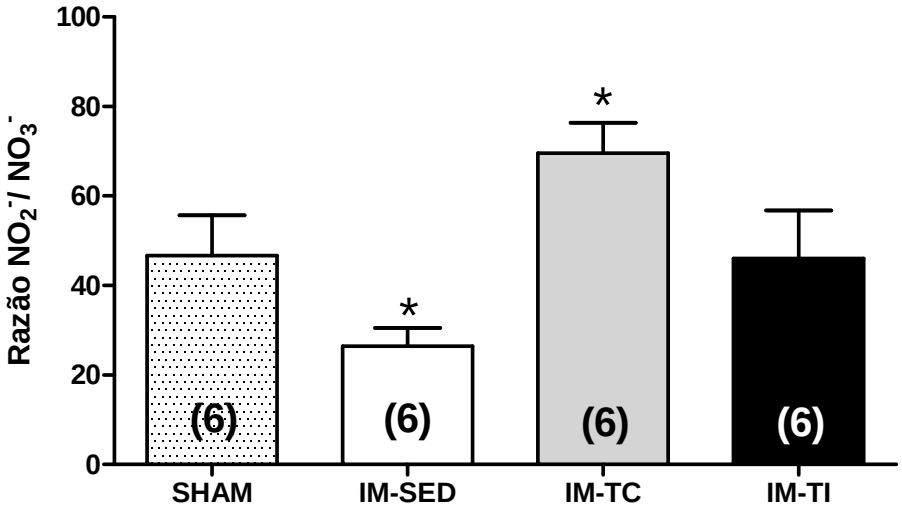


FIGURA 11 – Razão nitrato/nitrito vascular nos homogenatos dos anéis da aorta torácica dos grupos SHAM, infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valores representam média ± erro padrão. * $p<0,05$ vs. IM-SED.

6.5 Expressão da enzima eNOS/p-eNOS (ser^{1177})

A FIGURA 12 Ilustra a relação estequiométrica das proteínas eNOS fosforilada/eNOS (total) em anéis aórticos dos grupos SHAM, IM-SED, IM-TC e IM-TI. Os resultados demonstram, que a expressão da eNOS não foi diferente entre os grupos SHAM e IM e também não foi alterada nos grupos submetidos ao protocolo de treinamento físico.

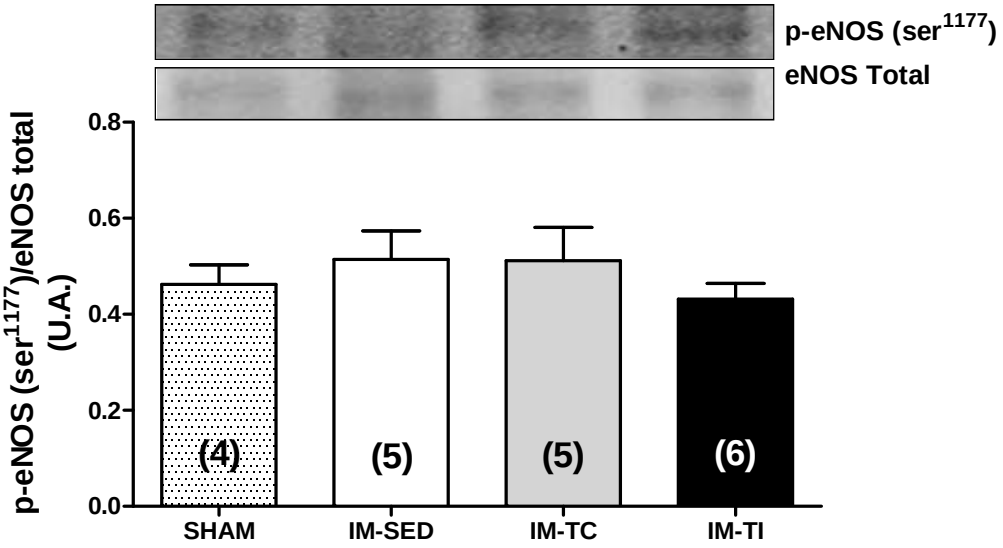


FIGURA 12 – Razão da expressão protéica da p-eNOS/eNOS (~145 KDa) (relação estequiométrica) em anéis da aorta torácica dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valor representa média ± erro padrão.

6.6 Expressão e atividade da enzima Akt-1

A FIGURA 13 ilustra a relação estequiométrica das proteínas Akt fosforilada/Akt-1 (total) em anéis aórticos dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto treinamento físico contínuo (IM-TC) e infarto treinamento físico intervalado (IM-TI). Os resultados demonstraram que a razão da expressão da Akt fosforilada pela Akt total estava diminuída no grupo IM-SED em relação ao grupo SHAM. Ambos os treinamentos foram capazes de restaurar a expressão da Akt aos níveis do grupo SHAM.

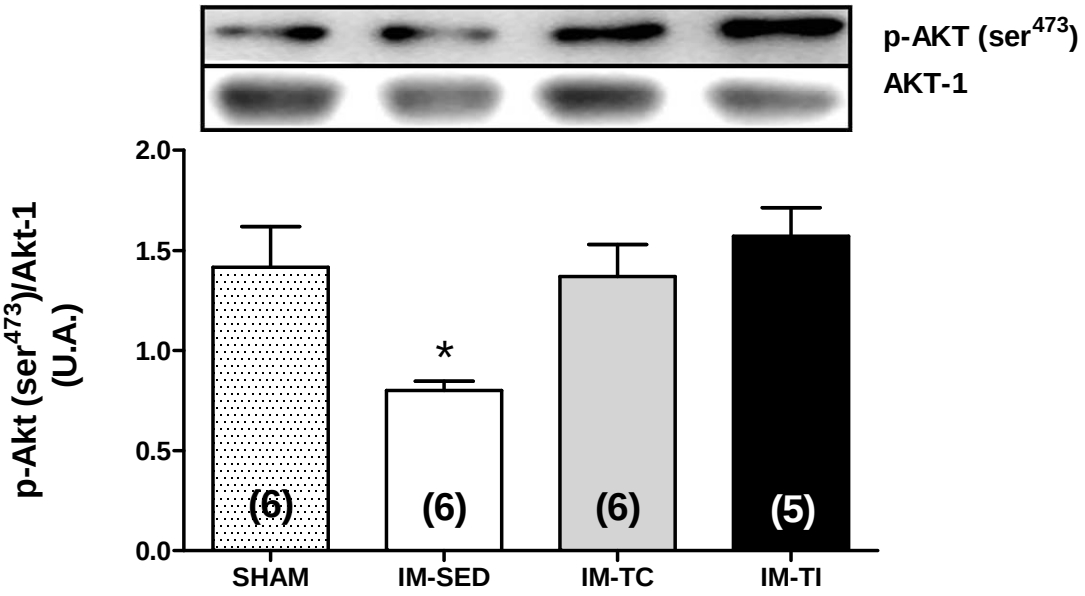


FIGURA 13 – Razão da expressão protéica da pAkt/Akt-1 (~60 KDa) (relação estequiométrica) em anéis da aorta torácica dos grupos SHAM, infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto intervalado (IM-TI). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valores representam média ± erro padrão da média. (*) IM-SED vs. SHAM, IM-TC e IM-TI.

6.7 Expressão protéica da enzima NADPH oxidase (NOX-1)

Tem sido observado que no IM há um aumento na produção de superóxido, seja por um aumento da sua produção ou por uma redução no seu metabolismo. Dessa maneira, a expressão protéica da enzima NADPH oxidase (NOX-1) foi avaliada na aorta torácica dos grupos estudados.

A expressão protéica da subunidade NOX-1 do complexo NADPH oxidase estava aumentada no grupo IM-SED comparado ao grupo SHAM (FIGURA 14). Além disso, ambos os grupos IM-TC e IM-TI diminuíram significativamente a expressão da NOX-1 comparados ao IM-SED, restaurando a expressão da NOX-1 aos níveis do grupo SHAM.

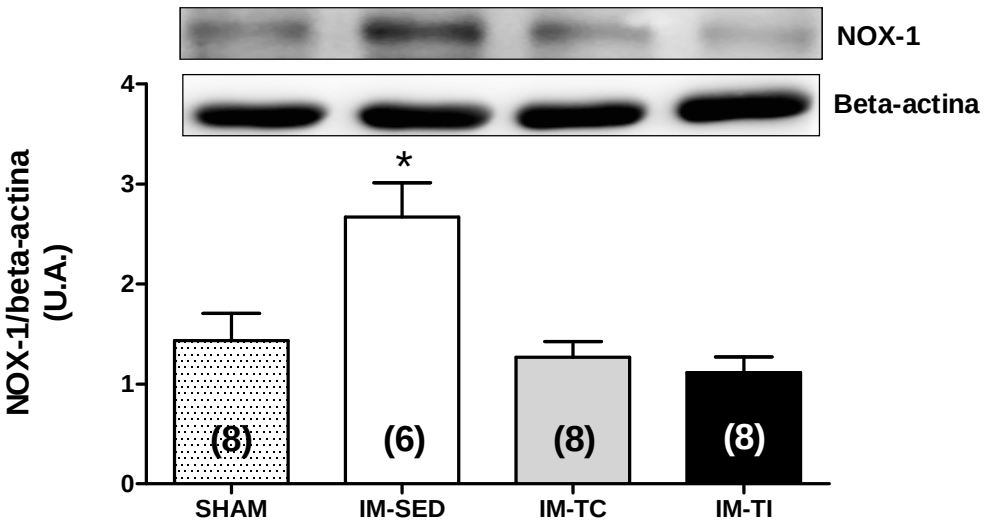


FIGURA 14 – Expressão protéica (*Western Blot*) da subunidade NOX-1(~ 70 KDa) da enzima NAD(P)H oxidase em anéis da aorta torácica dos grupos SHAM, infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto intervalado (IM-TI).O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Valores representam média ± erro padrão. (*) IM-SED vs. SHAM, IM-TC e IM-TI.

6.8 Índice de produção de superóxido no vaso

Para detectar a produção vascular de superóxido vascular, anéis da aorta torácica foram incubados com a sonda fluorescente dihidroetídio (DHE). No grupo IM-SED a fluorescência emitida foi qualitativamente maior quando comparado aos grupos SHAM, indicando maior produção basal de superóxido (FIGURA 15). Por outro lado, a fluorescência diminuiu significativamente no grupo IM-TC, comparado ao grupo IM-SED. No entanto, o grupo IM-TI não foi eficaz em reduzir significativamente a fluorescência emitida. Dessa forma, indicando uma maior produção basal de superóxido nessas artérias.

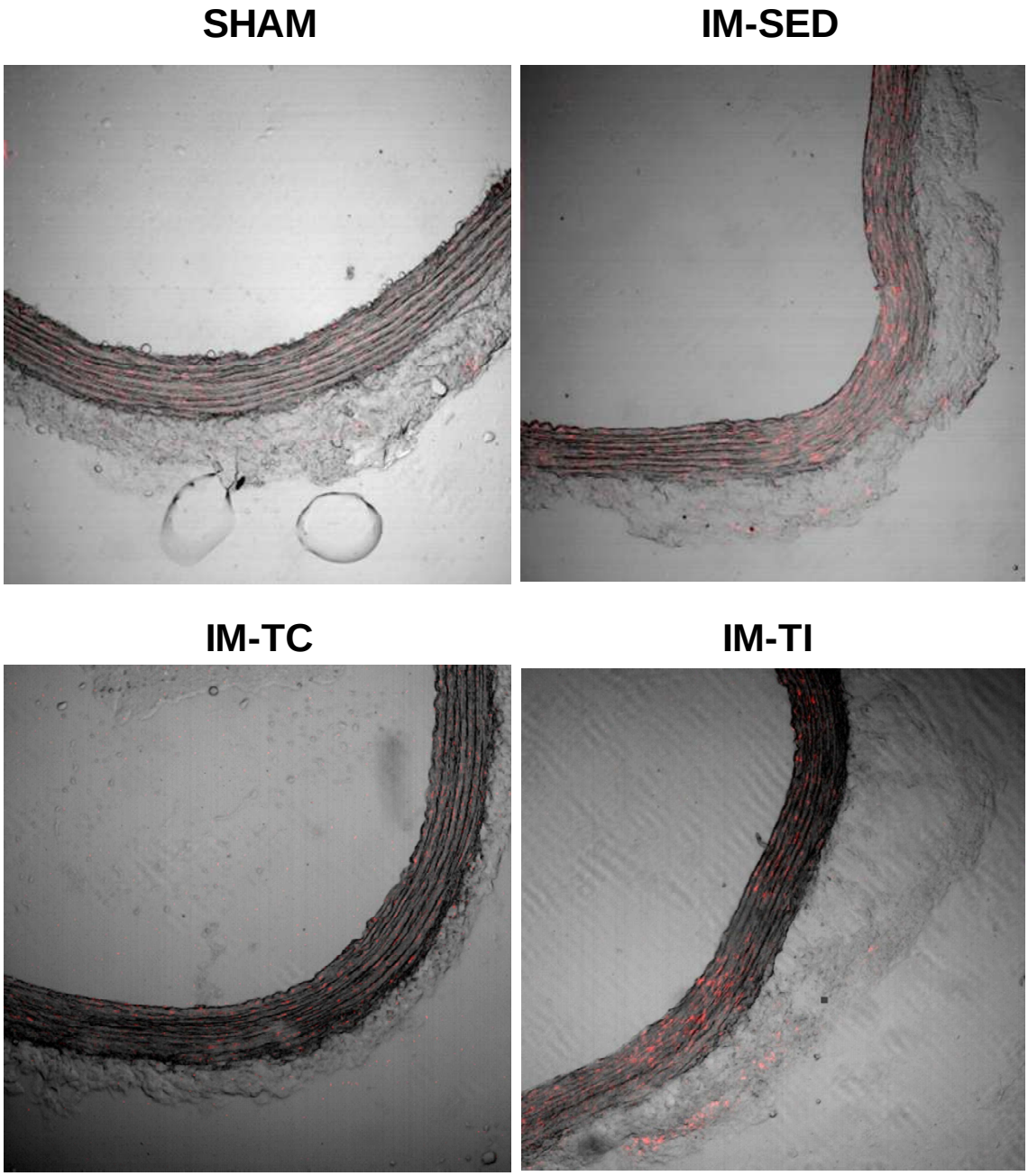


FIGURA 15 – Representação qualitativa do índice de produção vascular de superóxido (fluorescência emitida pelo DHE) em corte transversal de aorta torácica dos grupos cirurgia fictícia (SHAM), infarto sedentário (IM-SED), infarto TF contínuo (IM-TC) e infarto TF intervalado (IM-TI).

7 DISCUSSÃO

Como esperado, nossos resultados demonstraram que o IM, pós-ligadura da artéria coronária, promoveu disfunção endotelial em aorta torácica dos ratos, evidenciada por uma menor sensibilidade e relaxamento à ACh e maior constrição à NE. Além disso, os ratos IM-SED apresentaram limitação da capacidade funcional, evidenciada por menor tolerância ao exercício físico. Por outro lado, ambos os protocolos de TF empregados (TC e TI) promoveram efeitos benéficos na resposta vasomotora, bioquímica vascular e tolerância ao exercício nos ratos IM.

A disfunção endotelial, observada no grupo IM-SED, foi provavelmente consequência do aumento no estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO, devido a um aumento na produção de superóxido, verificado pelo aumento da atividade da subunidade da enzima NADPH oxidase (NOX-1). Por outro lado, os protocolos de treinamento físico empregados foram eficientes em reduzir a resposta contrátil à NE e em melhorar a vasodilatação à ACh nos ratos infartados. Assim, ambos os protocolos de TF (TC e TI) foram igualmente efetivos em atenuar o estresse oxidativo e restaurar a função endotelial em aorta de ratos infartados.

Já esta bem estabelecido na literatura que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve/moderada é uma importante intervenção não-farmacológica na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares (CHICCO, 2008; CRIMI, IGNARRO, CACCIATORE & NAPOLI, 2009; WITHAM, STRUTHERS & MCMURDO, 2003; XU, WAN, POWERS, LI, JI, LAO, WILSON, ERIKSON & ZHANG, 2008). Dentre os diversos benefícios vasculares observados com esse tipo de treinamento podemos destacar a melhora da função endotelial, redução do estresse oxidativo, melhora da biodisponibilidade de óxido nítrico e da capacidade enzimática das enzimas antioxidantes em vasos de condutância de ratos normais e com infarto do miocárdio (JASPERSE & LAUGHLIN, 2006; JI, 2008; MCALLISTER, NEWCOMER & LAUGHLIN, 2008; ZANCHI, BECHARA, TANAKA, DEBBAS, BARTHOLOMEU & RAMIRES, 2008).

Recentemente, o treinamento intervalado aeróbico de alta intensidade vem sendo investigado tanto em humanos quanto em diversos modelos animais com

doenças e fatores de risco associados (ROGNMO et al., 2004; TJONNA et al., 2008; WISLOFF et al., 2007). No entanto, ainda não está bem estabelecido se os benefícios encontrados com o TI é em virtude do tipo de treino ou de uma maior intensidade média do VO_{2pico}. Este é o primeiro estudo que avaliou as respostas vasculares e bioquímicas em ratos com infarto do miocárdio submetidos aos protocolos de treinamento aeróbico contínuo de intensidade leve/moderada (IM-TC) e treinamento aeróbico intervalado (IM-TI). Para tanto os protocolos de treino foram equalizados pela intensidade média do VO_{2pico}, distância total percorrida e gasto calórico total em ratos infartados.

7.1 Efeitos dos TC e TI na massa corporal e hipertrofia cardíaca em ratos IM

A massa corporal inicial e ao dos protocolos de TF ou sedentarismo foi semelhante entre os grupos estudados, demonstrando que nem o IM nem os protocolos de TF empregados foram eficientes em modificar a massa corporal. Diversos autores demonstram que o TF aeróbico em esteira rolante não modifica a massa corporal de ratos sem sobrepeso (HORTA, DE CARVALHO & MANDARIM-DE-LACERDA, 2005; VERAS-SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRAO & KRIEGER, 1997; ZANCHI et al., 2008).

Além disso, a razão massa do coração/ massa corporal, importante índice de hipertrofia cardíaca, foi semelhante entre os grupos IM-SED, IM-TC e IM-TI não havendo diferença em relação ao grupo SHAM. Estudos prévios, que avaliaram, após 21 dias da ligadura da artéria coronária, a relação entre a área infartada e a função ventricular em ratos (PFEFFER, PFEFFER, FISHBEIN, FLETCHER, SPADARO, KLONER & BRAUNWALD, 1979) demonstram que infartos pequenos (4 a 30% de área infartada) não causam prejuízos hemodinâmicos comparados aos ratos controle (SHAM), enquanto que área de infarto grande (maior que 45%) promove insuficiência cardíaca congestiva com redução do débito cardíaco. Deste modo, o não desenvolvimento de hipertrofia cardíaca compensatória nos grupos IM pode ser atribuída ao pequeno percentual da área infartada nesses grupos (21 a 27%).

Embora resultados prévios do nosso laboratório (ZANCHI et al., 2008) demonstram que IM promove hipertrofia cardíaca e congestão pulmonar em ratos, o TF aeróbico em esteira não diminui estas alterações. Por outro lado, estudos recentes demonstram que o TF de natação atenua a hipertrofia miocárdica em ratos com áreas de infartos moderadas e grandes (ANDREWS PORTES, MAGALHAES SARAIVA, ALBERTA DOS SANTOS & TUCCI, 2009). Assim, o fato de ambos os protocolos de TC e TI, empregados no presente estudo, não terem modificado a razão massa coração/massa corporal pode ser devido a esta razão não estar significativamente alterada nos grupos IM comparados ao grupo SHAM.

7.2 Efeitos dos protocolos de TC e TI na capacidade funcional em ratos IM

A capacidade funcional ao exercício físico está relacionada com a severidade da disfunção ventricular pós-infarto, além de ser modificável pelo TF. O grupo IM-SED diminuiu significativamente a potência aeróbica e a tolerância ao exercício físico (avaliados após 4 semanas de infarto e pré-TF), evidenciado pela redução de 16% no VO_{2pico} e de 47% na distância total percorrida comparados ao grupo SHAM. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que avaliaram esses parâmetros em ratos infartados por ligadura da artéria coronária (JORGE, RODRIGUES, ROSA, MALFITANO, LOUREIRO, MEDEIROS, CURI, BRUM, LACCHINI, MONTANO, DE ANGELIS & IRIGOYEN, ; ZANCHI et al., 2008).

Por outro lado, os protocolos de TF foram eficientes em aumentar o VO_{2pico} (TC,+ 45% e TI, + 46%) e a distância total percorrida (TC,+ 230% e TI, + 210%) comparados ao grupo IM-SED. Esses resultados corroboram com outros estudos que demonstram que o TF aeróbico aumenta a capacidade aeróbica e a tolerância ao esforço em ratos infartados e com insuficiência cardíaca (CRIMI et al., 2009; MEDEIROS, ROLIM, OLIVEIRA, ROSA, MATTOS, CASARINI, IRIGOYEN, KRIEGER, KRIEGER, NEGRAO & BRUM, 2008; ZANCHI et al., 2008).

Interessantemente, os efeitos benéficos dos TC e TI na capacidade funcional dos ratos IM foram semelhantes entre si, e isso pode ser atribuído ao fato do volume total de treino (intensidade média x duração) ter sido propositadamente equalizado

de modo que os dois tipos de treinamento tivessem um mesmo intensidade média e gasto energético. Diferentemente dos nossos resultados, tem sido demonstrado que protocolos de TI apresentam resultados mais efetivos na melhora da capacidade funcional e vasomotoras, quando comparado com o TC, tanto em ratos (HARAM et al., 2009; KEMI, ELLINGSEN, CECI, GRIMALDI, SMITH, CONDORELLI & WISLOFF, 2007; YOUNG et al., 2005) como humanos (ROGNMO et al., 2004; TJONNA et al., 2008; WISLOFF, ELLINGSEN & KEMI, 2009; WISLOFF et al., 2007) com diversas patologias e fatores de risco associados.

No entanto, é importante destacar que o protocolo de treinamento intervalado usado por estes autores busca, principalmente, obter uma maior intensidade de treino comparado com treinamento contínuo. Assim, estes resultados mais efetivos atribuídos ao treinamento intervalado parecem dever-se não apenas a forma intervalada, mas principalmente a maior intensidade média (% relativa do VO_{2pico}) do treino obtido no TI. Além disso, a controvérsia acerca dos efeitos dos treinamentos contínuos versus intervalados pode ser atribuída às inúmeras possibilidades de combinações de carga (intensidade e duração) de treino (BILLAT, 2001a; GORMLEY, SWAIN, HIGH, SPINA, DOWLING, KOTIPALLI & GANDRAKOTA, 2008; MIDGLEY & MC NAUGHTON, 2006), bem como a responsividade ao treinamento físico associado à espécie e raça animal estudada (BARBATO, KOCH, DARVISH, CICILA, METTING & BRITTON, 1998).

De fato, diversos estudos tem verificado que os benefícios do TI são relacionados ao tempo em que o indivíduo permanece em uma maior intensidade, isto é, quanto mais tempo o indivíduo se exercitar próximo do VO_2 máx, maiores serão os benefícios desse tipo de treinamento (BILLAT, 2001a; b; BILLAT et al., 1999; GIBALA & MCGEE, 2008). Deste modo, os benefícios fisiológicos obtidos nesses estudos pelo treinamento aeróbico intervalado, podem ter sido em função do maior tempo de exercício realizado em uma carga de treino mais elevada, comparados ao treinamento aeróbico contínuo.

Portanto, este tema ainda precisa ser mais bem estudado de modo a possibilitar a caracterização dos benefícios do TF nos sistema vascular, considerando estes diversos fatores de interferências.

7.3 Efeitos dos protocolos de TC e TI na vasomotricidade aórtica em ratos IM

Quando à vasodilatação dependente do endotélio, nossos resultados demonstraram, no grupo IM-SED, uma diminuição significativa da resposta vasodilatadora máxima à acetilcolina comparada ao grupo SHAM, caracterizando uma disfunção endotelial. Estes resultados corroboram com outros estudos que demonstram que a disfunção endotelial é uma característica marcante no IM e na IC, tanto em ratos (BAUERSACHS, FLEMING, FRACCAROLLO, BUSSE & ERTL, 2001; BAUERSACHS & WIDDER, 2008) como em humanos (HAMBRECHT et al., 1998; KUBO, RECTOR, BANK, WILLIAMS & HEIFETZ, 1991; LINKE, ERBS & HAMBRECHT, 2008; SANTOS, ALVES, RONDON, BARRETTO, MIDDLEKAUFF & NEGRAO, 2005).

Por outro lado, os protocolos de TF empregados promoveram significativa melhora na vasodilatação dependente do endotélio em aorta torácica dos ratos IM, restaurando por completo esta resposta. No entanto, diferente da nossa hipótese inicial, não houve diferença entre os protocolos TC e TI nos efeitos benéficos na vasodilatação aórtica.

Outra característica marcante do grupo IM-SED, é o aumento da resposta vasoconstritora máxima à noradrenalina em aorta torácica, corroborando com resultados prévios de nosso laboratório (ZANCHI et al., 2008). Por outro lado, ambos os protocolos de TC e TI foram capazes de atenuar a resposta máxima à NE. De fato, Dora *et al* (DORA, DOYLE & DULING, 1997) demonstraram que o aumento nas concentrações de cálcio no músculo liso vascular, será rapidamente difundido através da membrana celular para as células endoteliais através das *"Gap junctions*" e esse aumento do cálcio no endotélio vai favorecer um aumento na produção de NO. Esse efeito parece ter uma relação com o controle da contração vascular. No IM esse efeito é perdido, por conta da disfunção endotelial e isso vai fazer com que não se tenha mais o controle da vasoconstrição, dessa maneira, aumentando a resposta contrátil.

7.4 Efeitos dos protocolos de TC e TI no estresse oxidativo e biodisponibilidade de óxido nítrico em ratos IM

A disfunção endotelial tem sido amplamente estudada em ratos e humanos (CAI & HARRISON, 2000; DEANFIELD, HALCOX & RABELINK, 2007; FELETOU & VANHOUTTE, 2006). Um dos mecanismos propostos para explicar a disfunção endotelial nos modelos de IM e IC é o estresse oxidativo vascular, resultante de uma produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) maior do que a capacidade do sistema de defesa antioxidante em eliminá-las (BAUERSACHS & WIDDER, 2008; GSCHWEND, BUIKEMA, HENNING, PINTO, DE ZEEUW & VAN GILST, 2003).

De fato, diversas alterações são envolvidas no aumento do estresse oxidativo pós-IM. Dentre essas alterações podemos destacar: redução do débito cardíaco, aumento do *shear stress* oscilatório, ativação da hiperatividade nervosa simpática e do sistema renina angiotensina, aumento do catabolismo muscular, entre outros. Por outro lado, diversos trabalhos demonstram os efeitos benéficos do exercício físico nessas variáveis (ERBS, HOLLRIEGEL, LINKE, BECK, ADAMS, GIELEN, MOBIUS-WINKLER, SANDRI, KRANKEL, HAMBRECHT & SCHULER, 2010; GIELEN, HAGEN, HALDER & HAMBRECHT, 2010; HAMBRECHT et al., 1998; NEGRAO & MIDDLEKAUFF, 2008).

Embora existam diferentes vias, enzimáticas e não enzimáticas produtoras de superóxido em tecidos vasculares, uma maior atividade do complexo enzimático NADPH oxidase tem sido identificado como uma importante fonte de superóxido no IM e IC. Além disso, o IM está associado a uma menor atividade do sistema de defesa antioxidante (AMUNDSEN, WISLOFF & SLORDAHL, 2007; ZANCHI et al., 2008), dificultando a eliminação de superóxido, o que facilita sua reação com óxido nítrico.

A produção aumentada e constante de superóxido faz com que ocorra uma rápida reação deste com o óxido nítrico, dessa maneira, reduzindo a sua biodisponibilidade e por outro lado, aumentando a produção de peróxido nitrito, o qual por sua vez possui efeitos deletérios para a célula (FORSTERMANN, 2010). Dessa forma, a menor biodisponibilidade de óxido nítrico é uma característica

fundamental na diminuição da resposta dilatadora e no aumento da resposta vasoconstritora pós IM.

Estudos demonstram que, em modelos animais com doença cardiovascular, há uma redução na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, em consequência de uma maior produção das EROs e consequentemente maior degradação do NO. Um dos responsáveis pelo aumento das EROs no vaso é a enzima NADPH oxidase, o qual por sua vez possui várias subunidades (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5). Quando ativada a enzima NOX-1 transfere elétrons da NADPH oxidase para o oxigênio molecular, dessa maneira, aumentando a produção de superóxido (LASSEGUE & GRIENDLING, 2010). No presente trabalho foi avaliada a expressão da enzima NOX-1.

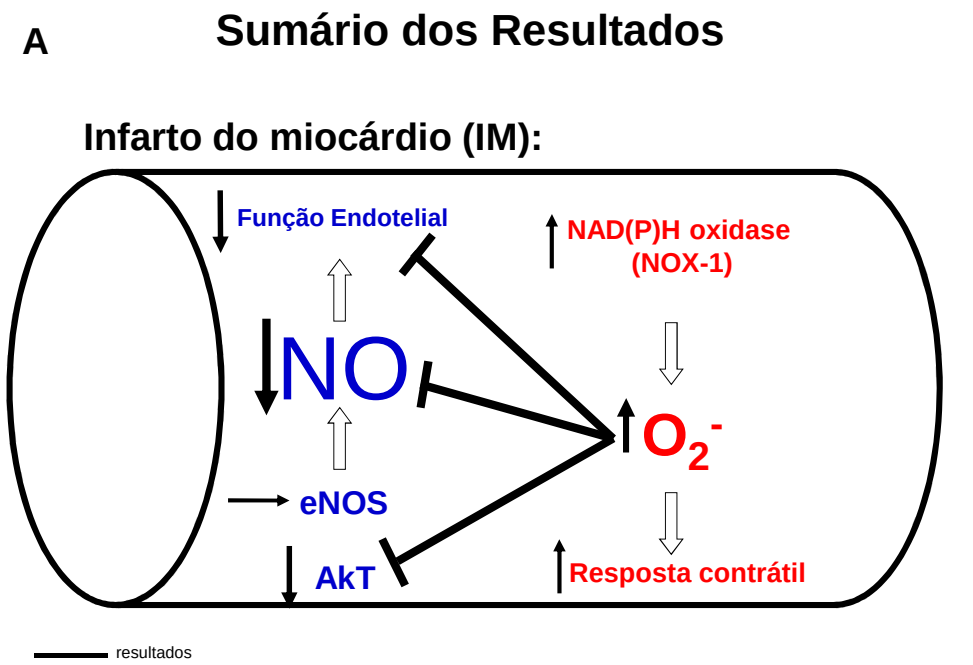
Os resultados do presente estudo demonstraram que a expressão protéica da subunidade da NADPH oxidase (NOX-1) estava aumentada no grupo IM-SED em relação ao grupo SHAM, dessa forma, demonstrando que havia uma maior produção de superóxido por essa enzima. Por outro lado, ambos os protocolos de treinamento físico foram eficientes em restaurar a produção de superóxido aos valores do grupo SHAM.

Deste modo, a menor resposta vasodilatadora e maior resposta vasoconstritora, parecem estar relacionadas aos seguintes resultados bioquímicos observados nas aortas do grupo IM-SED: a) maior expressão protéica da NOX-1, indicando maior produção de superóxido; b) maior índice de produção de superóxido (microscopia de fluorescência da DHE); c) igual expressão da eNOS fosforilada; d) menor expressão da AKT fosforilada (via de ativação da eNOS); e) menor índice de biodisponibilidade de NO (razão nitrito/nitrato). Deste modo, nossos resultados demonstram que os ratos IM-SED apresentavam menor biodisponibilidade de NO associado ao estresse oxidativo vascular.

Quanto aos efeitos dos diferentes protocolos de treinamento físico sobre os parâmetros bioquímicos vasculares associados ao estresse oxidativo e à biodisponibilidade de óxido nítrico nos grupos IM, podemos destacar que ambos os TC e TI foram eficientes em: a) diminuir a expressão da NOX-1 (via produtora de superóxido), restaurando-a para o valor semelhante ao grupo SHAM e b) aumentar a expressão da Akt fosforilada.

Por outro lado, o grupo IM-TI apresentou maior índice de produção de superóxido e menor índice de biodisponibilidade de NO, comparado com o grupo IM-TC. Entretanto, o grupo IM-TI teve efeitos benéficos nessas duas variáveis em relação ao grupo IM-SED. Nesse sentido, estudos avaliando a produção de superóxido em exercício físico intenso demonstram que logo após a atividade a resposta vasodilatadora estava diminuída e isso era devido há uma maior produção das EROs no vaso (GOTO et al., 2003; HARAM, ADAMS, KEMI, BRUBAKK, HAMBRECHT, ELLINGSEN & WISLOFF, 2006).

Abaixo se encontra o esquema dos principais resultados do presente estudo (FIGURA 16 A e B):



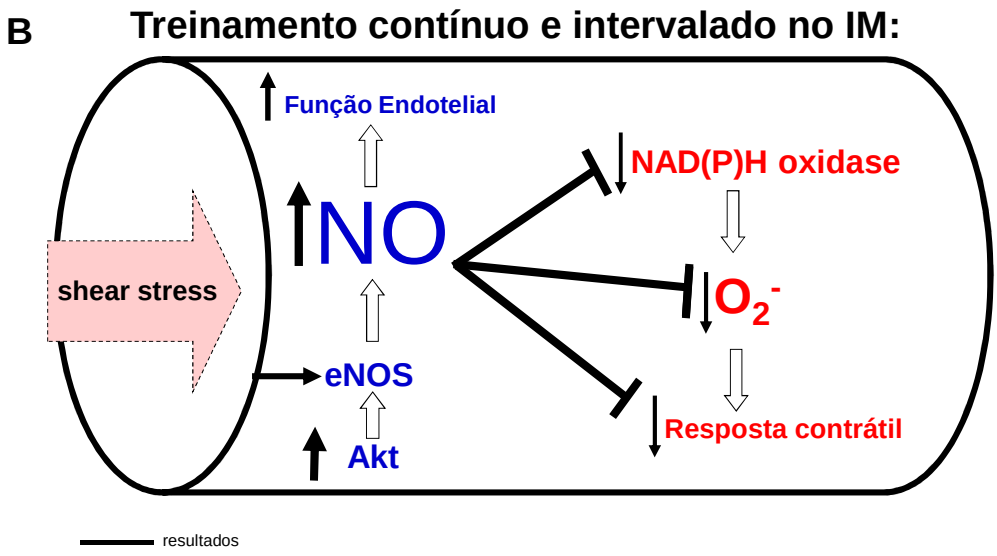


FIGURA 16 – Sumário esquemático dos resultados representando o efeito dos TC e TI no controle e biodisponibilidade de NO.

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que ambos os TC e TI são capazes de melhorar função endotelial (normalização da vasodilatação a acetilcolina e atenuação da vasoconstrição à noradrenalina) em aorta torácica de ratos infartados. Estes efeitos benéficos na função endotelial estão associados ao aumento da via de ativação da eNOS (maior expressão da Akt total e fosforilada), diminuição da produção de superóxido (redução da NOX-1) e maior biodisponibilidade de óxido nítrico. Além disso, ambos os TC e TI promoveram melhora na capacidade funcional dos ratos infartados (aumento VO_{2pico} e distância total percorrida).

REFERÊNCIAS

AMUNDSEN, B. H.; WISLOFF, U.; SLORDAHL, S. A. [Exercise training in cardiovascular diseases]. Tidsskr Nor Laegeforen, v.127, n.4, p.446-8, 2007

ANDERSON, T. J. Prognostic significance of brachial flow-mediated vasodilation. Circulation, v.115, n.18, p.2373-5, 2007

ANDREWS PORTES, L.; MAGALHAES SARAIVA, R.; ALBERTA DOS SANTOS, A.; TUCCI, P. J. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.36, n.4, p.394-9, 2009

ANVERSA, P.; BEGHI, C.; KIKKAWA, Y.; OLIVETTI, G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. Circ Res, v.58, n.1, p.26-37, 1986

BACURAU, A. V.; JARDIM, M. A.; FERREIRA, J. C.; BECHARA, L. R.; BUENO, C. R., JR.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; NEGRAO, C. E.; CASARINI, D. E.; CURI, R.; RAMIRES, P. R.; MORISCOT, A. S.; BRUM, P. C. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. J Appl Physiol, v.106, n.5, p.1631-40, 2009

BALLOR, D. L.; VOLOVSEK, A. J. Effect of exercise to rest ratio on plasma lactate concentration at work rates above and below maximum oxygen uptake. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, v.65, n.4, p.365-9, 1992

BARBATO, J. C.; KOCH, L. G.; DARVISH, A.; CICILA, G. T.; METTING, P. J.; BRITTON, S. L. Spectrum of aerobic endurance running performance in eleven inbred strains of rats. J Appl Physiol, v.85, n.2, p.530-6, 1998

BAUERSACHS, J.; FLEMING, I.; FRACCAROLLO, D.; BUSSE, R.; ERTL, G. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. Cardiovasc Res, v.51, n.2, p.344-50, 2001

BAUERSACHS, J.; WIDDER, J. D. Endothelial dysfunction in heart failure. Pharmacol Rep, v.60, n.1, p.119-26, 2008

BECHARA, L. R.; TANAKA, L. Y.; SANTOS, A. M.; JORDAO, C. P.; SOUSA, L. G.; BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P. R. A single bout of moderate-intensity exercise increases vascular NO bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta. J Smooth Muscle Res, v.44, n.3-4, p.101-11, 2008

BILLAT, L. V. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part I: aerobic interval training. Sports Med, v.31, n.1, p.13-31, 2001a

_____. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part II: anaerobic interval training. Sports Med, v.31, n.2, p.75-90, 2001b

BILLAT, V. L.; FLECHET, B.; PETIT, B.; MURIAUX, G.; KORALSZTEIN, J. P. Interval training at VO2max: effects on aerobic performance and overtraining markers. Med Sci Sports Exerc, v.31, n.1, p.156-63, 1999

BOCCHI, E. A.; BRAGA, F. G. M.; FERREIRA, S. M. A.; ROHDE, L. E. P.; DE OLIVEIRA, W. A.; DE ALMEIDA, D. R.; MOREIRA, M. V. C.; BESTETTI, R. B.; BORDIGNON, S.; AZEVEDO, C.; TINOCO, E. M.; ROCHA, R. M.; ISSA, V. S.; FERRAZ, A.; CRUZ, F. D.; GUIMARAES, G. V.; MONTERA, V. S. P.; ALBUQUERQUE, D. C.; BACAL, F.; SOUZA, G. E. C.; NETO, J. M. R.; CLAUSELL, N. O.; MARTINS, S. M.; SICILIANO, A.; DE SOUZA NETO, J. D.; MOREIRA, L. F.; TEIXEIRA, R. A.; MOURA, L. Z.; BECK-DA-SILVA, L.; RASSI, S.; AZEKA, E.; HOROWITZ, E.; RAMIRES, F.; SIMOES, M. V.; DE GASTRO, R. B. P.; SALEMI, V. M. C.; JR, H. V.; VILA, J. H.; SIMOES, R.; ALBANESI, F.; MONTERA, M. W. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. Arq Bras Cardiol, v.93, n.1 supl 1., p.1-71, 2009

BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. Am J Physiol Cell Physiol, v.285, n.3, p.C499-508, 2003

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-54, 1976

BREVETTI, G.; SILVESTRO, A.; SCHIANO, V.; CHIARIELLO, M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. Circulation, v.108, n.17, p.2093-8, 2003

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. J Appl Physiol, v.45, n.6, p.1009-15, 1978

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res, v.87, n.10, p.840-4, 2000

CHICCO, A. J. Exercise training in prevention and rehabilitation: which training mode is best? Minerva Cardioangiol, v.56, n.5, p.557-70, 2008

CLARKSON, P.; MONTGOMERY, H. E.; MULLEN, M. J.; DONALD, A. E.; POWE, A. J.; BULL, T.; JUBB, M.; WORLD, M.; DEANFIELD, J. E. Exercise training enhances endothelial function in young men. J Am Coll Cardiol, v.33, n.5, p.1379-85, 1999

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; CACCIATORE, F.; NAPOLI, C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. Nat Rev Cardiol, v.6, n.4, p.292-300, 2009

DAVIS, M. E.; CAI, H.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HARRISON, D. G. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.4, p.H1449-53, 2003

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation, v.115, n.10, p.1285-95, 2007

DORA, K. A.; DOYLE, M. P.; DULING, B. R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.12, p.6529-34, 1997

DUSSE, L. M.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão Sobre o Óxido Nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.39, n.4, p.343-350, 2003

ERBS, S.; HOLLRIEGEL, R.; LINKE, A.; BECK, E. B.; ADAMS, V.; GIELEN, S.; MOBIUS-WINKLER, S.; SANDRI, M.; KRANKEL, N.; HAMBRECHT, R.; SCHULER, G. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. Circ Heart Fail, v.3, n.4, p.486-94, 2010

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.291, n.3, p.H985-1002, 2006

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. Sports Med, v.36, n.4, p.327-58, 2006

FISHER, A. B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A. I.; NEREM, R. M. Endothelial cellular response to altered shear stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.281, n.3, p.L529-33, 2001

FORSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. Pflugers Arch, v.459, n.6, p.923-39, 2010

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, v.288, n.5789, p.373-6, 1980

GIBALA, M. J.; MCGEE, S. L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? Exerc Sport Sci Rev, v.36, n.2, p.58-63, 2008

GIELEN, S.; HAGEN, T.; HALDER, R.; HAMBRECHT, R. [Non-pharmacological therapy of chronic heart failure: the role of structured training programmes]. Gesundheitswesen, v.72, n.3, p.163-73; quiz 174-5, 2010

GIELEN, S.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. Circulation, v.103, n.1, p.E1-6, 2001

GORMLEY, S. E.; SWAIN, D. P.; HIGH, R.; SPINA, R. J.; DOWLING, E. A.; KOTIPALLI, U. S.; GANDRAKOTA, R. Effect of intensity of aerobic training on VO2max. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.7, p.1336-43, 2008

GOTO, C.; HIGASHI, Y.; KIMURA, M.; NOMA, K.; HARA, K.; NAKAGAWA, K.; KAWAMURA, M.; CHAYAMA, K.; YOSHIZUMI, M.; NARA, I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. Circulation, v.108, n.5, p.530-5, 2003

GRAHAM, D. A.; RUSH, J. W. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. J Appl Physiol, v.96, n.6, p.2088-96, 2004

GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W. C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. Circ Res, v.94, n.11, p.1408-17, 2004

GREEN, D. J.; FOWLER, D. T.; O'DRISCOLL, J. G.; BLANKSBY, B. A.; TAYLOR, R. R. Endothelium-derived nitric oxide activity in forearm vessels of tennis players. J Appl Physiol, v.81, n.2, p.943-8, 1996

GSCHWEND, S.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.; PINTO, Y. M.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. Eur J Heart Fail, v.5, n.2, p.147-54, 2003

HAMBRECHT, R.; FIEHN, E.; WEIGL, C.; GIELEN, S.; HAMANN, C.; KAISER, R.; YU, J.; ADAMS, V.; NIEBAUER, J.; SCHULER, G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. Circulation, v.98, n.24, p.2709-15, 1998

HARAM, P. M.; ADAMS, V.; KEMI, O. J.; BRUBAKK, A. O.; HAMBRECHT, R.; ELLINGSEN, O.; WISLOFF, U. Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, v.13, n.4, p.585-91, 2006

HARAM, P. M.; KEMI, O. J.; LEE, S. J.; BENDHEIM, M. O.; AL-SHARE, Q. Y.; WALDUM, H. L.; GILLIGAN, L. J.; KOCH, L. G.; BRITTON, S. L.; NAJJAR, S. M.; WISLOFF, U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovasc Res, v.81, n.4, p.723-32, 2009

HARRISON, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest, v.100, n.9, p.2153-7, 1997

HORTA, P. P.; DE CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. Life Sci, v.77, n.26, p.3336-43, 2005

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. Am J Physiol, v.253, n.5 Pt 2, p.H1074-82, 1987

JASPERSE, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Endothelial function and exercise training: evidence from studies using animal models. Med Sci Sports Exerc, v.38, n.3, p.445-54, 2006

JI, L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. Free Radic Biol Med, v.44, n.2, p.142-52, 2008

JOHNS, T. N.; OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. Ann Surg, v.140, n.5, p.675-82, 1954

JOHNSON, L. R.; RUSH, J. W.; TURK, J. R.; PRICE, E. M.; LAUGHLIN, M. H. Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. J Appl Physiol, v.90, n.3, p.1102-10, 2001

JORGE, L.; RODRIGUES, B.; ROSA, K. T.; MALFITANO, C.; LOUREIRO, T. C.; MEDEIROS, A.; CURI, R.; BRUM, P. C.; LACCHINI, S.; MONTANO, N.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. Eur Heart J,

JUNG, O.; MARKLUND, S. L.; GEIGER, H.; PEDRAZZINI, T.; BUSSE, R.; BRANDES, R. P. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. Circ Res, v.93, n.7, p.622-9, 2003

KANNEL, W. B. Incidence and epidemiology of heart failure. Heart Fail Rev, v.5, n.2, p.167-73, 2000

KEMI, O. J.; ELLINGSEN, O.; CECI, M.; GRIMALDI, S.; SMITH, G. L.; CONDORELLI, G.; WISLOFF, U. 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, p.354-61, 2007

KOBAYASHI, N.; TSURUYA, Y.; IWASAWA, T.; IKEDA, N.; HASHIMOTO, S.; YASU, T.; UEBA, H.; KUBO, N.; FUJII, M.; KAWAKAMI, M.; SAITO, M. Exercise training in patients with chronic heart failure improves endothelial function predominantly in the trained extremities. Circ J, v.67, n.6, p.505-10, 2003

KUBO, S. H.; RECTOR, T. S.; BANK, A. J.; WILLIAMS, R. E.; HEIFETZ, S. M. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. Circulation, v.84, n.4, p.1589-96, 1991

LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.30, n.4, p.653-61, 2010

LAURINDO, F. R. M. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. In: P. L. Luz, F. R. M. Laurindo, *et al* (Ed.). Endotélio e doenças cardiovasculares. São Paulo: Atheneu, 2005. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose

LEUNG, F. P.; YUNG, L. M.; LAHER, I.; YAO, X.; CHEN, Z. Y.; HUANG, Y. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). Sports Med, v.38, n.12, p.1009-24, 2008

LIBBY, E. B. D. P. Z. P. Tratado de Medicina Cardiovascular, v.2. 2003

LINKE, A.; ERBS, S.; HAMBRECHT, R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. Front Biosci, v.13, p.424-32, 2008

LUNDE, P. K.; SJAASTAD, I.; SCHIOTZ THORUD, H. M.; SEJERSTED, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. Acta Physiol Scand, v.171, n.3, p.277-94, 2001

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. Sports Med, v.33, n.14, p.1013-35, 2003

MARLETTA, M. A.; SPIERING, M. M. Trace elements and nitric oxide function. J Nutr, v.133, n.5 Suppl 1, p.1431S-3S, 2003

MCALLISTER, R. M.; JASPERSE, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. J Appl Physiol, v.98, n.2, p.753-61, 2005

MCALLISTER, R. M.; NEWCOMER, S. C.; LAUGHLIN, M. H. Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.1, p.173-8, 2008

MCCABE, T. J.; FULTON, D.; ROMAN, L. J.; SESSA, W. C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. J Biol Chem, v.275, n.9, p.6123-8, 2000

MEDEIROS, A.; ROLIM, N. P.; OLIVEIRA, R. S.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; CASARINI, D. E.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRAO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. J Appl Physiol, v.104, n.1, p.103-9, 2008

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? J Clin Invest, v.100, n.9, p.2146-52, 1997

MIDGLEY, A. W.; MC NAUGHTON, L. R. Time at or near VO2max during continuous and intermittent running. A review with special reference to considerations for the optimisation of training protocols to elicit the longest time at or near VO2max. J Sports Med Phys Fitness, v.46, n.1, p.1-14, 2006

MILLER, F. J., JR.; GUTTERMAN, D. D.; RIOS, C. D.; HEISTAD, D. D.; DAVIDSON, B. L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. Circ Res, v.82, n.12, p.1298-305, 1998

MINAMI, A.; ISHIMURA, N.; HARADA, N.; SAKAMOTO, S.; NIWA, Y.; NAKAYA, Y. Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Atherosclerosis, v.162, n.1, p.85-92, 2002

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.1, p.61-74, 1999

MYERS, J. Cardiology patient pages. Exercise and cardiovascular health. Circulation, v.107, n.1, p.e2-5, 2003

NEGRÃO, C. E. Exercício físico e endotélio. In: P. L. Luz, F. R. M. Laurindo, *et al* (Ed.). Endotélio e doenças cardiovasculares. São Paulo: Atheneu, 2005. Exercício físico e endotélio

NEGRAO, C. E.; MIDDLEKAUFF, H. R. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. Heart Fail Rev, v.13, n.1, p.51-60, 2008

NIEBAUER, J.; COOKE, J. P. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. J Am Coll Cardiol, v.28, n.7, p.1652-60, 1996

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FISHBEIN, M. C.; FLETCHER, P. J.; SPADARO, J.; KLONER, R. A.; BRAUNWALD, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res, v.44, n.4, p.503-12, 1979

PRAKASH, M.; MYERS, J.; FROELICHER, V. F.; MARCUS, R.; DO, D.; KALISETTI, D.; FRONING, J.; ATWOOD, J. E. Diagnostic exercise tests on 4000 consecutive men. Am Heart J, v.142, n.1, p.127-35, 2001

ROGNMO, O.; HETLAND, E.; HELGERUD, J.; HOFF, J.; SLORDAHL, S. A. High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, v.11, n.3, p.216-22, 2004

ROUSSEAU, D. L.; LI, D.; COUTURE, M.; YEH, S. R. Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. J Inorg Biochem, v.99, n.1, p.306-23, 2005

RUSH, J. W.; TURK, J. R.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.4, p.H1378-87, 2003

SANTOS, A. C.; ALVES, M. J.; RONDON, M. U.; BARRETTO, A. C.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRAO, C. E. Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.2, p.H593-9, 2005

SHEPHARD, R. J.; BALADY, G. J. Exercise as cardiovascular therapy. Circulation, v.99, n.7, p.963-72, 1999

TARPEY, M. M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. Circ Res, v.89, n.3, p.224-36, 2001

TJONNA, A. E.; LEE, S. J.; ROGNMO, O.; STOLEN, T. O.; BYE, A.; HARAM, P. M.; LOENNECHEN, J. P.; AL-SHARE, Q. Y.; SKOGVOLL, E.; SLORDAHL, S. A.; KEMI, O. J.; NAJJAR, S. M.; WISLOFF, U. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. Circulation, v.118, n.4, p.346-54, 2008

VERAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K. C.; GAVA, N. S.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol, v.273, n.6 Pt 2, p.H2627-31, 1997

WISLOFF, U.; ELLINGSEN, O.; KEMI, O. J. High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? Exerc Sport Sci Rev, v.37, n.3, p.139-46, 2009

WISLOFF, U.; STOYLEN, A.; LOENNECHEN, J. P.; BRUVOLD, M.; ROGNMO, 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.; 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, p.3086-94, 2007

WITHAM, M. D.; STRUTHERS, A. D.; MCMURDO, M. E. Exercise training as a therapy for chronic heart failure: can older people benefit? J Am Geriatr Soc, v.51, n.5, p.699-709, 2003

XU, X.; WAN, W.; POWERS, A. S.; LI, J.; JI, L. L.; LAO, S.; WILSON, B.; ERIKSON, J. M.; ZHANG, J. Q. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. J Mol Cell Cardiol, v.44, n.1, p.114-22, 2008

YOUNG, C. G.; KNIGHT, C. A.; VICKERS, K. C.; WESTBROOK, D.; MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S.; ISCHIROPOULOS, H.; BALLINGER, S. W. Differential effects of exercise on aortic mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.288, n.4, p.H1683-9, 2005

ZANCHI, N. E.; BECHARA, L. R.; TANAKA, L. Y.; DEBBAS, V.; BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P. R. Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. Eur J Appl Physiol, v.104, n.6, p.1045-52, 2008