**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE**

**Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia
muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico**

LUIZ ROBERTO GRASSMANN BECHARA

**SÃO PAULO
2012**

LUIZ ROBERTO GRASSMANN BECHARA

Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires

SÃO PAULO

2012

Nome: BECHARA, Luiz Roberto Grassmann

Título: Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Brum, por me dar a oportunidade de fazer parte de seu grupo, por acreditar em meu potencial, por confiar em meu trabalho, pela dedicação e paciência despendidas à minha formação, e por contribuir imensamente com o meu amadurecimento científico e pessoal. Sem dúvida nenhuma, um exemplo pessoal e profissional que deve ser seguido;

Ao professor Paulo Ramires, por me ingressar no meio científico-acadêmico, pela preocupação e empenho em minha formação, pela paciência, pelo apoio científico, pelo exemplo de pessoa e exemplo profissional, e além de tudo, pela amizade;

À minha mãe Luiza, ao meu pai Turco, e aos meus irmãos Milena, Alexandre, Maurício e Maíta, pelo carinho, compreensão e apoio que sempre tive, e por tudo o que fizeram e fazem por mim;

À minha namorada Vanessa Voltarelli, pelo amor, carinho, amizade, compreensão, paciência, sinceridade e exemplo. Uma pessoa maravilhosa que foi fundamental para que essa etapa da minha vida fosse concluída, não só por me ajudar direta e indiretamente nesse trabalho, mas principalmente por estar sempre ao meu lado, me apoiando e dando motivação para superar os desafios.

Aos pais da Vanessa, Silvio e Elizabeth, e ao Fabricio e à Marisa, por torcerem pelo meu sucesso pessoal e profissional;

À Vó Elza, Tia Zezé, Tia Lúdia e Tia Nely, por me apoiarem e participarem da minha vida;

A todos os amigos e familiares que me apoiam e fazem parte da minha vida. São muitos nomes que não caberiam nessa página;

Aos meus amigos que passaram ou ainda estão no laboratório, Amanda, Alê, Aline, André, Andréa, Bianco, Bozi, Bruno, Camila, Carmão, Chris, Dani, Guga, Humberto, Juliane, Julio, Kátia, Fabi, Fátima, Larissa, Luciane, Marcelão, Max, Nathalie, Paulo, Telma, Rodrigo, pela amizade agradável, pela colaboração e ajuda, pelos momentos divertidos que passamos juntos, e por tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso;

Aos técnicos, também amigos, Alex, Glória, Katt, Luciano, Marcele e Ney, pela colaboração e ajuda essenciais ao desenvolvimento do projeto.

À professora Edilamar Menezes de Oliveira e seus respectivos alunos, pela convivência, colaboração e aprendizado científico;

Ao professor Dr. Francisco Laurindo, pelo exemplo de pesquisador e por manter as portas de seu laboratório sempre abertas para que eu pudesse realizar os experimentos e concluir essa tese.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Vascular, em especial aos grandes amigos Leonardo Tanaka e Victor Debbas, pelo auxílio técnico, científico e pelas risadas. Em especial também à Denise Fernandes, que esteve sempre pronta para auxiliar no que fosse preciso, e contribuiu bastante para os resultados obtidos nesta tese.

Ao Dr. Paulo Magno Dourado, pela realização das avaliações ecocardiográficas;

À Dra. Ana Garippo, pelo auxílio no uso do microscópio confocal;

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, em especial aos secretários Ilza, Márcio, Mariana e Paulo, por darem o suporte necessário aos alunos de pós-graduação e estarem sempre prontos para ajudar;

À FAPESP pelo apoio financeiro (processo #2008/57252-3).

RESUMO

BECHARA, L.R.G. **Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico.** 2012. 147 f. Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em quadros mais avançados da insuficiência cardíaca (IC), além do comprometimento do miocárdio, observa-se uma importante perda de massa muscular esquelética, a qual contribui para o mau prognóstico e morbimortalidade dos pacientes. As espécies reativas de oxigênio (ROS) parecem estar diretamente envolvidas no desenvolvimento e progressão da atrofia muscular em doenças crônico-degenerativas. De fato, já é sabido que a IC está associada ao estresse oxidativo na musculatura esquelética, o qual parece contribuir para o catabolismo proteico culminando em atrofia muscular na síndrome, apesar desta relação de causa e efeito ainda ser pouco investigada. No entanto, as fontes envolvidas na produção exacerbada de ROS na musculatura esquelética em ratos com infarto do miocárdio ainda não foram caracterizadas. Como a NADPH oxidase é um complexo enzimático especializado em produzir ROS, e sabendo que esta família de enzimas pró-oxidantes é ativada por agentes pró-inflamatórios e alguns agonistas de receptores acoplados à proteína G que estão aumentados na IC, na primeira parte do projeto de pesquisa testou-se a hipótese de que as NADPH oxidases estariam hiperativadas nos músculos plantar e sóleo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo e consequente hiperativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma (SUP), culminando assim na atrofia deste tecido. Para testar esta hipótese, ratos Wistar foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio ou Sham e, quatro semanas pós-cirurgias, foram submetidos a oito semanas de tratamento com uma substância inibidora da NADPH oxidase (apocinina) ou placebo. Foram quantificados nos músculos plantar e sóleo: níveis de mRNA de componentes da família Nox da NADPH oxidase presentes no tecido muscular, bem como a atividade desse complexo enzimático; marcadores de estresse oxidativo; atividade de enzimas antioxidantes e concentração total de glutatona; níveis de mRNA de componentes do SUP e atividade do proteassoma; e o

trofismo muscular (Subprojeto 1). A segunda parte deste projeto testou a hipótese de que o treinamento físico aeróbico (TFA) previniria a hiperativação das NADPH oxidases na musculatura esquelética de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para uma diminuição do quadro de estresse oxidativo e menor ativação do SUP, prevenindo assim a atrofia deste tecido. Para testar esta hipótese, ratos Sham e infartados foram submetidos a oito semanas de TFA ou permaneceram sedentários (Subprojeto 2). As variáveis estudadas foram as mesmas relacionadas ao subprojeto 1. Os resultados do subprojeto 1 demonstraram que o infarto do miocárdio em ratos promove atrofia do músculo plantar desencadeada em parte pela ativação da NADPH oxidase, promovendo uma maior produção de ROS e consequente hiperativação do SUP. Além disso, o infarto do miocárdio promove atrofia do músculo sóleo, a qual também está associada a um aumento dos níveis de ROS e da atividade do proteassoma, porém independente da ativação da NADPH oxidase. Em relação ao subprojeto 2, nossos dados também demonstram que o TFA previne parcialmente a atrofia do músculo plantar de ratos infartados, prevenindo a hiperativação da NADPH oxidase e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio. Essa intervenção não farmacológica também previne a atrofia do músculo sóleo dos ratos infartados associada à redução das ROS e à redução da hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio, porém de forma independente da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase. Dessa forma, concluímos que a NADPH oxidase está envolvida de maneira músculo-específica com a produção de ROS levando a ativação do SUP e à atrofia muscular associada ao infarto crônico do miocárdio. O TFA é capaz de prevenir a atrofia muscular esquelética induzida pelo infarto do miocárdio associada a redução das ROS em ambos os músculos estudados. No músculo plantar, esta resposta está relacionada a uma redução na hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase, ressaltando a contribuição desse complexo para a geração de ROS em músculos glicolíticos de ratos infartados. O TFA consiste em importante ferramenta não farmacológica agindo na homeostase redox e proteica no músculo esquelético de ratos infartados.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, atrofia muscular, NADPH oxidase, estresse oxidativo, treinamento físico aeróbico.

ABSTRACT

BECHARA, L.R.G. **Contribution of NADPH oxidase enzyme complex in muscle atrophy of infarcted rats: role of aerobic exercise training.** 2012. 147 f. Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Although heart failure (HF) is a syndrome of cardiac origin, it promotes significant skeletal muscle atrophy in more advanced stages, which contributes to poor prognosis and increased mortality rate. Reactive oxygen species (ROS) seem to be directly involved in the development and progression of muscle atrophy in chronic degenerative diseases. In fact, HF is associated with skeletal muscle oxidative stress, which seems to contribute to protein catabolism and muscle atrophy. However, it is important to highlight that the sources involved in the exacerbated skeletal muscle ROS production in HF have not been characterized yet. NADPH oxidase enzyme complex is an important source of ROS production activated by proinflammatory cytokines and some G-protein-coupled receptors, which are increased in HF. Therefore, in the first part of the thesis, we tested whether NADPH oxidases would be overactivated in plantaris and soleus muscles of rats submitted to myocardial infarction, thus contributing to oxidative stress and consequent ubiquitin proteasome proteolytic system (UPS) hyperactivation, ultimately leading to muscle atrophy. To test this hypothesis, Wistar rats underwent myocardial infarction or Sham surgery and, four weeks post-surgery, rats underwent eight weeks of treatment with an NADPH oxidase inhibitor (apocynin) or placebo. It was quantified in plantaris and soleus muscles: mRNA levels of skeletal muscle-NOX family, as well as NADPH oxidase activity; oxidative stress markers; antioxidant enzymes activity and total glutathione concentration; mRNA levels of UPS components and proteasome activity; and muscle trophicity (Subproject 1). In the second part of the thesis we tested whether aerobic exercise training (AET) would prevent NADPH oxidases overactivity in plantaris and soleus muscles of rats submitted to myocardial infarction, thus decreasing oxidative stress and UPS hyperactivation, preventing skeletal muscle atrophy. To test this hypothesis, Sham and infarcted rats underwent eight weeks of AET or remained sedentary (Subproject 2). The variables studied were the same as

in Subproject 1. The results of the subproject 1 demonstrated that myocardial infarction in rats induces plantaris muscle atrophy triggered in part by overactivation of NADPH oxidase promoting increased ROS production paralleled by UPS hyperactivation. Moreover, myocardial infarction induced soleus muscle atrophy, which was also associated with increased ROS levels and proteasome overactivity, but independently of NADPH oxidase activation. Regarding the subproject 2, our data showed that AET partially prevented plantaris muscle atrophy in infarcted rats, preventing myocardial infarction-induced NADPH oxidase hyperactivation and UPS hyperactivation. AET also prevented soleus muscle atrophy in infarcted rats, which was associated with a ROS levels reduction and prevention of myocardial infarction-induced UPS hyperactivation, but independently of NADPH oxidase activity. Collectively, our data give support for the involvement of NADPH oxidase as a source of ROS production leading to UPS activation and skeletal muscle atrophy associated with chronic myocardial infarction, however this occurs in a muscle specific pattern. AET prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy and exacerbated ROS levels in both plantaris and soleus muscles. In plantaris muscle, this response is related to a prevention of NADPH oxidase hyperactivation, highlighting the contribution of this enzyme complex to ROS production in glycolytic muscles of infarcted rats. Finally, AET is an important nonpharmacologic tool acting in skeletal muscle redox and protein homeostasis of infarcted rats.

Key-words: myocardial infarction, muscle atrophy, NADPH oxidase, oxidative stress, aerobic exercise training

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1	Representação ilustrativa da hipótese de que as NADPH oxidases estariam hiperativadas na musculatura esquelética de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo e consequente hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), culminando assim na atrofia deste tecido.....	32
FIGURA 2	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma (A), massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B), distância total percorrida em esteira rolante em teste incremental até a exaustão (C), consumo máximo de oxigênio (VO ₂ max) (D) e massa corporal (E) dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* p<0,05 vs. Sham (-) apocinina; # p<0,05 vs. Infartados Sedentários.....	61
FIGURA 3	Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* p<0,05 vs.	

Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.....

64

FIGURA 4 Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.....

66

FIGURA 5 Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, níveis de hidroperóxidos lipídicos (C), e correlação entre atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação da DHE (D) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan e correlação de Pearson.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.....

68

FIGURA 6 Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathiona (C) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina,

Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.....

70

FIGURA 7 RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S (E), e correlação entre os níveis de produtos de oxidação da DHE e atividade do proteassoma (F) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan, e correlação de Pearson.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.....

72

FIGURA 8 Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tibia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.....

73

FIGURA 9 Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e

Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores..... 75

FIGURA 10 Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina..... 76

FIGURA 11 Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores..... 77

FIGURA 12 Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, e níveis de hidroperóxidos lipídicos (C) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; #

p<0,05 vs. Infartados (-) apocinina.....

79

FIGURA 13 Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathione (C) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* p<0,05 vs. Sham (-) apocinina; # p<0,05 vs. Infartados (-) apocinina.....

81

FIGURA 14 Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* p<0,05 vs. Sham (-) apocinina; # p<0,05 vs. Infartados (-) apocinina.....

83

FIGURA 15 Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado

	ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.....	85
FIGURA 16	Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.....	86
FIGURA 17	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma (A), massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B), distância total percorrida em esteira rolante em teste incremental até a exaustão (C), consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) (D) e atividade da enzima citrato sintase nos músculos plantar (E) e sóleo (F) dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	90
FIGURA 18	Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs.	

Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	93
--	----

FIGURA 19	Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	94
-----------	--	----

FIGURA 20	Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, níveis de hidroperóxidos lipídicos (C), e correlação entre atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação da DHE (D) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	96
-----------	--	----

FIGURA 21	Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathiona (C) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados
-----------	---

apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários.....

98

FIGURA 22 Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....

100

FIGURA 23 Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários.....

101

FIGURA 24 Expressão proteica de NF-kB na fração nuclear do músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.....

102

FIGURA 25	Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	104
FIGURA 26	Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	105
FIGURA 27	Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, e níveis de hidroperóxidos lipídicos (C) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	107

FIGURA 28	Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathione (C) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	108
FIGURA 29	Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	110
FIGURA 30	Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de <i>post hoc</i> de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.....	111

FIGURA 31 Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.....

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Grupos e número de animais utilizados para a obtenção dos resultados do presente projeto.....	47
TABELA 2	Primers utilizados para a avaliação da expressão de RNA mensageiro (NADPH oxidase).....	54
TABELA 3	Primers utilizados para a avaliação da expressão de RNA mensageiro (SUP).....	56
TABELA 4	Parâmetros ecocardiográficos dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina.....	60
TABELA 5	Parâmetros ecocardiográficos dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados.....	89

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Resumo dos principais resultados relacionados à primeira hipótese do estudo.....	87
QUADRO 2 Resumo dos principais resultados relacionados à segunda hipótese do estudo.....	113

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosine
Atrogin	Atrophy gene 1
Ca ²⁺	Íon Ca ²⁺
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Ct	Limiar comparativo de ciclos
DATASUS	Dados do Sistema Único de Saúde
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DHE	Dihidroetidina
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
DTNB	Ácido 5,5'ditiobis 2 nitrobenzóico (DTNB)
E1	Proteína ativadora
E2	Proteína carreadora
E3	Proteína ligase
FC	Frequência cardiac
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione

IC	Insuficiência cardíaca
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IM	Infarto do miocárdio
LPS	Lipopolissacarídeo
MuRF	Muscle ring finger 1
NAPDH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
phox	Phagocyte oxidase
PPVED	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPVES	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
RNA	Ácido ribonucleic
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SERCA	Proteína sarco-endo retículo Ca ²⁺ -ATPase
Sham	Cirurgia fictícia
SIVD	Espessura do septo interventricular na diástole
SIVS	Espessura do septo interventricular na sístole
SOD	Superóxido dismutase

SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TNF α	Fator de necrose tumoral α
VE	Ventrículo esquerdo
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio

Unidades

μ g	Micrograma
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro
Bpm	Batimento por minute
Cm	Centímetro
G	Gramma
L	Litro
M	Metro
Mg	Miligrama
Min	Minuto

Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
Ms	Milissegundo

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	34
2.1	Fisiopatologia da insuficiência cardíaca.....	34
2.2	Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca.....	35
2.2.1	Atrofia muscular esquelética.....	36
2.3	Papel das espécies reativas de oxigênio na atrofia muscular.....	38
2.3.1	NADPH oxidases e atrofia muscular esquelética.....	40
2.4	Apocinina e insuficiência cardíaca.....	42
2.5	Treinamento físico aeróbico e insuficiência cardíaca.....	43
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Geral.....	45
3.2	Específicos.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	Amostra.....	47

4.2	Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio.....	48
4.3	Função contrátil e dimensões do ventrículo esquerdo em sístole e diástole.....	48
4.4	Tratamento com apocinina.....	49
4.5	Protocolo de treinamento físico aeróbico.....	49
4.6	Tolerância ao esforço físico.....	50
4.7	Potência aeróbia máxima (VO ₂ máx).....	50
4.8	Coleta dos tecidos.....	50
4.9	Atividade da enzima citrato sintase.....	51
4.10	Atividade do complexo enzimático NADPH oxidase.....	52
4.11	Expressão de RNA mensageiro das isoformas Nox1, Nox2 e Nox4 e das subunidades p47phox e p22phox.....	53
4.12	Produtos da oxidação da dihidroetidina.....	54
4.13	Sistema de defesa antioxidante.....	54
4.13.1	Atividade da superóxido dismutase.....	54
4.13.2	Atividade da catalase.....	55
4.13.3	Concentração de glutathiona.....	55
4.14	Expressão de RNA mensageiro de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma.....	56
4.15	Atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina	56
4.16	Estrutura da musculatura esquelética.....	57
4.17	Avaliação da expressão proteica de NF-κB na fração nuclear.....	57
4.18	Análise estatística	58
5.	RESULTADOS.....	59

5.1	NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética de ratos infartados.....	59
5.1.1	Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase.....	63
5.1.2	Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase.....	75
5.2	Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética.....	88
5.2.1	Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e ao treinamento físico aeróbico.....	92
5.2.2	Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e ao treinamento físico aeróbico.....	102
6	DISCUSSÃO.....	114
6.1	NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio.....	115
6.1.1	Caracterização morfofuncional do modelo de infarto do miocárdio.....	115
6.1.2	Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase.....	118
6.1.3	Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase.....	123
6.2	Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio.....	127
6.2.1	Respostas morfofuncionais ao treinamento físico aeróbico.....	127
6.2.2	Respostas do músculo plantar ao treinamento físico aeróbico.....	128
6.2.3	Respostas do músculo sóleo ao treinamento físico aeróbico.....	131
7	CONCLUSÃO.....	134

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
---------------------------------	-----

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-hormonais, acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade, e caracterizada por sintomas como fadiga, dispnéia, e intolerância aos esforços físicos (LUNDE et al., 2001; CRIMI et al., 2009), os quais reduzem consideravelmente a autonomia e qualidade de vida destes pacientes (WILSON et al., 1999).

Dentre as principais etiologias da IC destaca-se o infarto do miocárdio (IM), que é caracterizado pelo suprimento insuficiente de sangue ao músculo cardíaco, causando elevação da pressão de enchimento ventricular, morte do tecido e severa disfunção cardíaca (HEART FAILURE SOCIETY OF, 2006; ZANNAD et al., 2008). O IM também pode repercutir sistemicamente em vários tecidos do organismo, como a musculatura esquelética (SIMKO e SIMKO, 1996; GORDON e VOIPIO-PULKKI, 1997), promovendo importantes alterações morfofuncionais capazes de agravar o prognóstico da síndrome da IC, uma vez que a capacidade funcional dos pacientes depende em grande parte do bom funcionamento do sistema muscular esquelético (CLARK, POOLE-WILSON e COATS, 1996; MIDDLEKAUFF, 2010).

De fato, algumas alterações morfofuncionais da musculatura esquelética já são bem conhecidas em pacientes com IC, como rarefação capilar, redução da densidade mitocondrial, diminuição da atividade de enzimas oxidativas, predomínio das fibras musculares do tipo II (brancas/rápidas/glicolíticas) em relação às do tipo I (vermelhas/lentas/oxidativas), e atrofia muscular (DREXLER et al., 1992; MIDDLEKAUFF, 2010). Dentre estas alterações apresentadas, a atrofia muscular vem se destacando na literatura desde que Anker et al. (1997) observaram que pacientes com insuficiência cardíaca e caquéticos apresentavam maior taxa de mortalidade quando comparados a pacientes não-caquéticos, sugerindo que a caquexia seria um preditor independente de mortalidade na insuficiência cardíaca.

A atrofia muscular resulta de uma proteólise aumentada associada à síntese proteica diminuída, culminando no catabolismo proteico, onde inúmeros sistemas proteolíticos contribuem para a degradação de proteínas celulares. Dentre esses sistemas, o sistema ubiquitina-proteassoma é considerado o principal envolvido neste quadro catabólico (TISDALE, 2005; VENTADOUR e ATTAIX, 2006), uma vez

que o mesmo é responsável por clivar cerca de 90% das proteínas citosólicas (SOLOMON e GOLDBERG, 1996). Além disso, as espécies reativas de oxigênio parecem estar diretamente envolvidas no desenvolvimento e progressão da atrofia muscular, já que foi demonstrado que o tratamento com antioxidantes atenua a perda de massa muscular em modelos animais (MCCLUNG et al., 2007; GUARNIER et al., 2010), ao passo que a exposição de miotubos musculares esqueléticos ao estresse oxidativo aumenta a degradação proteica (GOMES-MARCONDES e TISDALE, 2002; RUSSELL, ELEY e TISDALE, 2007), que parece estar diretamente relacionada ao aumento da expressão de importantes componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (LI et al., 2003; SHANG e TAYLOR, 2011).

Alguns estudos do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos demonstram que, tanto em humanos (LI et al., 2003; LINKE et al., 2005; SHANG e TAYLOR, 2011; CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012) quanto em modelos animais (COIRAULT et al., 2007; BACURAU et al., 2009; OHTA et al., 2011; CUNHA et al., 2012), a IC está associada ao estresse oxidativo na musculatura esquelética, o qual parece contribuir para a atrofia e disfunção muscular na síndrome, apesar desta relação causa-efeito ser ainda pouco investigada. Além disso, as fontes envolvidas nessa produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio observada na musculatura esquelética na IC ainda não foram caracterizadas.

Como a NADPH oxidase é um complexo enzimático especializado em produzir espécies reativas do oxigênio (BEDARD e KRAUSE, 2007) e também é expresso na musculatura esquelética (AL GHOLEH et al., 2011), e sabendo que essa família de enzimas pró-oxidantes é ativada por agentes pró-inflamatórios, como o TNF- α , e alguns agonistas de receptores acoplados à proteína G, como angiotensina II e noradrenalina, os quais estão todos aumentados na IC (MURDOCH et al., 2006), consideramos a hipótese de que este complexo enzimático poderia contribuir para o quadro de atrofia muscular na síndrome.

Portanto, a primeira parte deste projeto foi desenvolvida para testar a hipótese de que as NADPH oxidases estariam hiperativadas nos músculos plantar e sóleo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo e consequente hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), culminando assim na atrofia deste tecido, como ilustrado na FIGURA 1.

FIGURA 1. Representação ilustrativa da hipótese de que as NADPH oxidases estariam hiperativadas na musculatura esquelética de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo e consequente hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), culminando assim na atrofia deste tecido.

O treinamento físico aeróbico é atualmente recomendado para o tratamento e prevenção da IC, além de consistir em um estímulo mecânico muito importante para a manutenção da massa muscular (SCHULZE et al., 2002; ADAMS, DORING e SCHULER, 2008). Além disso, o treinamento físico aeróbico também é capaz de diminuir marcadores de estresse oxidativo muscular em modelos experimentais de atrofia muscular (KACZOR et al., 2007; BACURAU et al., 2009; CHEN et al., 2011), sugerindo que esta intervenção possa resultar em uma diminuição da ativação da via do NF- κ B e atenuar a perda de massa muscular promovida pela ativação exacerbada do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (MESSINA et al., 2006; BAR-SHAI et al., 2008). Portanto, é também importante conhecer como o complexo enzimático NADPH oxidase, bem como o sistema ubiquitina-proteassoma, respondem a este estímulo fisiológico crônico (treinamento físico) na musculatura esquelética de ratos infartados.

Assim, a segunda parte deste projeto foi desenvolvida para testar a hipótese de que o treinamento físico aeróbico previniria a hiperativação das NADPH oxidases

nos músculos plantar e sóleo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio, contribuindo para uma diminuição do quadro de estresse oxidativo e menor ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), prevenindo assim a atrofia deste tecido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca

Segundo a Sociedade Americana de Insuficiência Cardíaca, apesar dos avanços no diagnóstico e terapia, a IC continua sendo um primordial e crescente problema da sociedade americana (LINDENFELD et al., 2010). No Brasil, conforme relatado na III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica, a IC também representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e a morbimortalidade associada (BOCCHI et al., 2009). Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) apontam que em 2007 ocorreram 308.466 óbitos no Brasil devido a doenças do aparelho circulatório, representando aproximadamente 30% do total de óbitos no país naquele ano, sendo que a IC é a via final comum da maioria destas doenças. O problema tende a se agravar com o envelhecimento populacional, uma vez que a IC, já há algum tempo, tem sido a principal causa de internação de pacientes a partir dos 65 anos, de acordo com o DATASUS (ARAUJO et al., 2005).

A IC é definida pela Sociedade Americana de Insuficiência Cardíaca como uma síndrome causada por disfunção cardíaca, geralmente resultando da perda ou disfunção do miocárdio, caracterizada tanto pela dilatação ou hipertrofia do ventrículo esquerdo ou ambos. Se a disfunção é primeiramente sistólica e/ou diastólica, leva a anormalidades circulatórias e neuro-hormonais, geralmente resultando em sintomas característicos como retenção de fluidos, dispnéia e fadiga, especialmente ao esforço (LINDENFELD et al., 2010).

Dentre as principais etiologias da IC destaca-se o infarto do miocárdio (IM), que é caracterizado pelo suprimento insuficiente de sangue ao músculo cardíaco, causando elevação da pressão de enchimento ventricular, morte do tecido e severa disfunção cardíaca (HEART FAILURE SOCIETY OF, 2006; ZANNAD et al., 2008). O IM também pode repercutir sistemicamente em vários tecidos do organismo, como a musculatura esquelética (SIMKO e SIMKO, 1996; GORDON e VOIPIO-PULKKI, 1997), promovendo importantes alterações morfofuncionais capazes de agravar o prognóstico da síndrome da IC. Devido a esta importante prevalência da etiologia isquêmica na IC, o IM em animais é o modelo experimental mais utilizado para se

estudar alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana (ZORNOFF et al., 2009).

Na IC, observam-se alterações hemodinâmicas centrais, como diminuição do débito cardíaco durante o exercício físico ou, em casos graves, no repouso, a elevação da pressão de enchimento ventricular esquerdo e o aumento dos volumes sistólico e diastólico final, levando ao aumento da massa ventricular e a elevação da pressão pulmonar (JN, 1997; SJ, 2009). Em adição a essas anormalidades hemodinâmicas centrais, a IC está associada a alterações periféricas secundárias, como mudanças no metabolismo energético e desarranjo estrutural do músculo esquelético, diminuição na vasodilatação arterial e retenção de fluidos quando no estágio congestivo da síndrome. Essas alterações fundamentam os sintomas clássicos da IC, como fadiga, dispnéia e intolerância aos esforços, que cronicamente contribuem ainda mais para agravar o quadro e piorar o prognóstico do paciente (MEDEIROS et al., 2010).

2.2. Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca

Apesar de a IC ser uma síndrome de origem cardíaca, estudos demonstraram haver baixa correlação entre as variáveis hemodinâmicas e a capacidade de realização de exercícios físicos (MARANTZ et al., 1988; JONDEAU et al., 1992). Além disso, não foi observada melhora da capacidade física por meio de manipulações farmacológicas que acarretassem em aumento da função cardíaca em pacientes com IC (FRANCIOSA, PARK e LEVINE, 1981; MASKIN et al., 1983; MANCINI et al., 1990) bem como pelo incremento do fluxo sanguíneo muscular através da valvuloplastia percutânea por balão em pacientes com estenose mitral (MARZO, HERRMANN e MANCINI, 1993), o que sugeriu haver alterações intrínsecas importantes na musculatura esquelética que poderiam contribuir com o quadro de intolerância aos esforços em pacientes com IC.

De fato, várias alterações morfofuncionais intrínsecas da musculatura esquelética foram observadas e já são bem conhecidas em pacientes com IC, como rarefação capilar, redução da densidade mitocondrial, diminuição da atividade de enzimas oxidativas, predomínio das fibras musculares do tipo II (brancas/rápidas/glicolíticas) em relação às do tipo I (vermelhas/lentas/oxidativas),

aumento da apoptose e atrofia muscular (DREXLER et al., 1992; MIDDLEKAUFF, 2010; REHN et al., 2012), de forma que nem sempre todas estas alterações se manifestam em conjunto.

Existem alguns estudos que também demonstram aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) na musculatura esquelética em modelo experimental (SCHULZE et al., 2003) e em pacientes com IC (GIELEN et al., 2003; LINKE et al., 2005), e outros estudos que identificaram a presença de estresse oxidativo neste tecido também em modelos animais (COIRAULT et al., 2007; BACURAU et al., 2009; OHTA et al., 2011; CUNHA et al., 2012) e pacientes com a síndrome (LINKE et al., 2005; CUNHA et al., 2012). No entanto, apesar de ser proposta uma importante relação entre estes marcadores e as alterações morfofuncionais do músculo esquelético observadas na IC, não há na literatura estudos que demonstrem uma relação causal entre essas variáveis.

Dentre as alterações intrínsecas da musculatura esquelética cabe ressaltar a atrofia muscular que ganhou destaque na literatura desde que ANKER et al. (1997) observaram que pacientes com insuficiência cardíaca caquéticos apresentam maior taxa de mortalidade quando comparados a pacientes não-caquéticos, sugerindo que a caquexia é um preditor independente de mortalidade em portadores de insuficiência cardíaca. Em função disso, torna-se fundamental investigar estratégias que previnam ou atenuem a atrofia muscular na síndrome.

2.2.1. Atrofia muscular esquelética

A atrofia muscular é comum a várias doenças sistêmicas como câncer, AIDS, insuficiência renal, diabetes, tuberculose, e a insuficiência cardíaca, além do trauma severo e queimadura, sendo que, independente da origem, este quadro é caracterizado por diminuição do conteúdo proteico, do diâmetro da fibra muscular, da produção de força e da resistência à fadiga (TISDALE, 2005; SUKHANOV et al., 2011).

Este estado de atrofia muscular resulta de uma proteólise aumentada associada à síntese proteica reduzida, culminando no catabolismo proteico, onde inúmeros sistemas proteolíticos contribuem para a degradação de proteínas celulares.

Os principais processos responsáveis pela proteólise muscular esquelética incluem a via autofágica/lisossomal, as proteases ativadas por cálcio (calpaínas), e a via proteolítica dependente de ATP (sistema ubiquitina-proteassoma). Esses sistemas trabalham mais em harmonia do que individualmente no processo de degradação proteica (POWERS, KAVAZIS e MCCLUNG, 2007). Enquanto as proteases lisossomais são as principais responsáveis pela degradação de proteínas de membrana e organelas, como receptores, canais iônicos e mitocôndria, as calpaínas são responsáveis pelo desarranjo das miofibrilas, liberando estas proteínas para serem ubiquitinadas (HASSELGREN, WRAY e MAMMEN, 2002). Já o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) assume papel fundamental na degradação de proteínas citosólicas, já que este recebe os substratos dos outros sistemas.

O SUP é constituído de uma cascata de reações enzimáticas altamente organizadas que seleciona, marca e degrada proteínas alvo. Inicialmente, uma proteína ativadora (E1) utiliza ATP para ativar a ubiquitina. A ubiquitina ativada é transferida para E2 (proteína carreadora) que conjuga as ubiquitinas em um processo de poliubiquitinas. Em seguida, E3 (proteína ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína alvo. As E3 ligases são componentes chave do SUP, onde as mais expressas na musculatura esquelética são atrogin, MuRF e E3 α (LECKER et al., 2004). Quando a proteína alvo é ligada às ubiquitinas conjugadas pelas E3 ligases, esta é reconhecida pelo proteassoma 26S e degradada em pequenos peptídeos (8-12 aminoácidos) (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002).

Esse sistema é indicado como o principal envolvido na atrofia muscular em diversas doenças crônico-degenerativas (SUKHANOV et al., 2011), onde se observa aumento da expressão de RNA mensageiro e proteínas de algumas E3 ligases (atrogin e MuRF) (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001; STEVENSON et al., 2003), bem como das subunidades 20S α e β do proteassoma e de sua subunidade 19S reguladora (LECKER et al., 1999; PRICE, 2003; TISDALE, 2005), sendo que uma maior ativação do SUP associada à atrofia e disfunção muscular esquelética também foi observada em modelos experimentais de IC (LI et al., 2007; VAN HEES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

Assim, uma parte deste projeto foi voltada para avaliar se a via de degradação proteica ubiquitina-proteassoma está ativada e contribui para a atrofia muscular em um modelo experimental de infarto do miocárdio. Além disso, como o

treinamento físico é um importante componente na manutenção da massa muscular em pacientes com insuficiência cardíaca (ADAMS, DORING e SCHULER, 2008), avaliamos também o efeito desta intervenção não farmacológica nesta via proteolítica.

2.3. Papel das espécies reativas de oxigênio na atrofia muscular

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são pequenas moléculas derivadas do oxigênio, que incluem radicais livres como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), peroxila ($RO_2^{\cdot}$), e alcoxil ($RO^{\cdot}$), e também espécies não radicalares que são agentes oxidantes e/ou agentes facilmente convertidos em radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A geração de ROS pode ocorrer como um subproduto de outras reações biológicas da mitocôndria, peroxissomos, citocromo *P*-450 e outros elementos celulares, bem como por sistemas que geram ROS não como um subproduto, mas sim pela própria função primária deste sistema enzimático, como é o caso da família das NADPH oxidases (BEDARD e KRAUSE, 2007). Já a remoção de ROS ocorre por um sistema complexo e finamente organizado de defesa antioxidante composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e também pelo tripeptídeo glutathione (GSH), que apresenta propriedades redutoras por conter o aminoácido cisteína, sendo considerado o agente redutor citosólico mais importante das células (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou dano molecular, é o que é atualmente definido como estresse oxidativo (JONES, 2006).

Atualmente, já é sabido que as ROS também são produzidas no músculo esquelético, tanto no repouso quanto durante o processo de contração muscular, servindo como segundos mensageiros nas vias de sinalização celular que regulam tanto processos fisiológicos normais quanto processos patológicos (REID, 2001). Além disso, alguns estudos têm demonstrado um aumento na produção de ROS e em marcadores de estresse oxidativo em alguns modelos de atrofia muscular

(KONDO, MIURA e ITOKAWA, 1991; LAWLER, SONG e DEMAREE, 2003; BACURAU et al., 2009), ao passo que essa perda de massa muscular parece ser prevenida pela administração de antioxidantes exógenos (APPELL, DUARTE e SOARES, 1997; BETTERS et al., 2004; MCCLUNG et al., 2007; GUARNIER et al., 2010), sendo que dois sistemas pró-oxidantes (NADPH oxidase e mitocôndria) são sugeridos como as principais fontes de ROS em músculos atrofiados (SUKHANOV et al., 2011).

Três mecanismos foram postulados por POWERS, KAVAZIS e DERUISSEAU (2005) pelo qual o estresse oxidativo na musculatura esquelética poderia aumentar a proteólise e atrofia muscular: (1) o estresse oxidativo leva a uma sobrecarga de cálcio e ativação de proteases ativas por cálcio, como calpaínas; (2) o estresse oxidativo ativa caspase-3 e por meio desse mecanismo estimula o sistema proteassoma 20S; (3) o estresse oxidativo aumenta a expressão de atrogin e MuRF e consequentemente ativa o sistema proteassomal.

Além disso, posteriormente foi sugerido que uma das vias que intermedeia essa relação é a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (POWERS, KAVAZIS e MCCLUNG, 2007), que é um fator de transcrição redox sensível capaz de aumentar a expressão de importantes componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (LI et al., 1998; WYKE, RUSSELL e TISDALE, 2004).

No entanto, até a presente data não é totalmente compreendido como as ROS contribuem para o desenvolvimento e progressão da atrofia muscular, principalmente no que diz respeito à atrofia muscular induzida por infarto do miocárdio.

Por outro lado, sabe-se que o treinamento físico aeróbico é capaz de diminuir marcadores de estresse oxidativo muscular em modelos experimentais de atrofia muscular (KACZOR et al., 2007; BACURAU et al., 2009), podendo resultar em uma restauração do aumento da ativação da via do NF- κ B e atenuar a perda de massa muscular pelo sistema ubiquitina-proteassoma (MESSINA et al., 2006; BAR-SHAI et al., 2008). Assim, outra parte deste projeto foi voltada para verificar se a atrofia muscular de ratos infartados é acompanhada por um aumento de marcadores de estresse oxidativo e da ativação da via do NF- κ B na musculatura esquelética. Além disso, verificamos também qual o efeito do treinamento físico moderado nessas variáveis.

2.3.1. NADPH oxidases e atrofia muscular esquelética

As NADPH oxidases constituem complexos enzimáticos transmembrana, cuja função biológica é gerar ROS pela transferência de elétrons do doador NADPH (ou em alguns casos NADH) para o oxigênio molecular (BEDARD e KRAUSE, 2007; AL GHOULEH et al., 2011). A NADPH oxidase é composta por seis subunidades: duas proteínas transmembrana (p22phox e gp91phox), que formam o flavocitocromo b558 e são formadoras do sítio catalítico da enzima, três proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox – phox de “phagocyte oxidase”) e uma GTPase (Rac1 ou Rac2). A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático, e a ativação da enzima se dá pela fosforilação da proteína citoplasmática p47phox, levando todo o complexo citoplasmático a migrar para a membrana e se associar ao citocromo b558 (BEDARD e KRAUSE, 2007).

Por muito tempo acreditou-se que a NADPH oxidase fosse exclusiva de fagócitos, mas nos últimos anos, seis homólogos da gp91phox/Nox2 foram encontrados em células não fagocíticas e denominados Nox1, Nox3, Nox4, Nox5 (NADPH oxidase 1, 2, 3, 4 e 5), DUOX1 e DUOX2 (dual oxidase 1 e 2); sendo que na nova terminologia, a gp91phox é denominada Nox2 e serviu de protótipo para seus homólogos (BEDARD e KRAUSE, 2007). Estes sete complexos constituem então a família Nox das enzimas NADPH oxidases, sendo que existem diferenças significantes entre estes tipos celulares, como as subunidades estruturais, a preferência por substratos e o tempo de atividade (GRIENDLING, SORESCU e USHIO-FUKAI, 2000).

Combinando com a localização diversificada das enzimas Nox na célula e a sua justaposição com vias de sinalização específicas, a regulação fina das atividades destes complexos enzimáticos fornece uma modulação precisa dos níveis de ROS para controlar os eventos de sinalização celular dependentes destas espécies químicas (AL GHOULEH et al., 2011).

Estudos recentes sugerem um papel da NADPH oxidase na musculatura esquelética, onde já foram identificadas neste tecido as isoformas Nox4 (CHENG et al., 2001; SPURNEY et al., 2008) e Nox2 (CHENG et al., 2001; JAVESGHANI et al., 2002; RUSH et al., 2005; HIDALGO et al., 2006; SPURNEY et al., 2008; AL

GHOULEH et al., 2011), além das subunidades p22phox, p47phox e p67phox (JAVESGHANI et al., 2002). Além disso, essas enzimas Nox no músculo esquelético parecem estar estrategicamente associadas ao retículo sarcoplasmático (XIA et al., 2003) e ao túbulo T das membranas (JAVESGHANI et al., 2002; HIDALGO et al., 2006).

É interessante notar que parece haver uma dependência do complexo NADPH oxidase na degradação proteica de miotubos musculares esqueléticos pelo sistema ubiquitina-proteassoma devido a uma maior ativação da via NF- κ B (RUSSELL, ELEY e TISDALE, 2007), o que sugere uma relação importante desse complexo enzimático com a atrofia muscular esquelética. De fato, Whitehead et al. (2010) (WHITEHEAD et al., 2010) encontraram aumento da expressão de subunidades da NADPH oxidase e aumento da produção de ROS por esse complexo enzimático na musculatura esquelética de camundongos com distrofia muscular (mdx). Além disso, um estudo recente (SEMPRUN-PRIETO et al., 2011) demonstrou que a indução de atrofia muscular esquelética por meio da infusão crônica de angiotensina II (Ang II) em animais estava diretamente relacionada a um aumento na produção de ROS pela NADPH oxidase, já que a inibição desse complexo com apocinina preveniu o aumento da produção de ROS. Além disso, a atrofia muscular mediada por Ang II foi bastante atenuada em animais que não expressavam p47phox, proteína chave da ativação da NADPH oxidase.

Apesar de poucos estudos sugerirem a participação importante do complexo enzimático NADPH oxidase no desenvolvimento da atrofia muscular esquelética, nenhum estudo foi ainda conduzido para avaliar a contribuição do complexo na atrofia muscular de ratos infartados.

Como as NADPH oxidases são ativadas por agentes pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, etc.) e alguns agonistas de receptores acoplados à proteína G (angiotensina II, noradrenalina, endotelina-1, etc.) que estão aumentados na insuficiência cardíaca (MURDOCH et al., 2006), supomos que este complexo possa contribuir para o quadro de atrofia muscular na síndrome. Assim, outra parte deste projeto foi voltada para avaliar a participação dos complexos enzimáticos NADPH oxidases na atrofia muscular esquelética de animais infartados, bem como sua participação na ativação da via NF- κ B e sistema ubiquitina-proteassoma. Além disso, verificamos o comportamento destas enzimas sob estímulo fisiológico do treinamento físico.

2.4. Apocinina e insuficiência cardíaca

Uma das ferramentas utilizadas no presente projeto para avaliar a contribuição das NADPH oxidases na atrofia muscular induzida pelo infarto do miocárdio será a administração crônica de um inibidor deste complexo enzimático, a apocinina.

Considerando o efeito deletério da produção exacerbada de ROS, o qual pode ser mediado pelas enzimas da família Nox, algumas substâncias têm sido estudadas como inibidores da NADPH oxidase (WILLIAMS e GRIENDLING, 2007). Entre estas substâncias, a apocinina tem sido o composto de escolha da grande maioria dos trabalhos que objetivam avaliar o envolvimento do complexo enzimático NADPH oxidase em modelos experimentais *in vivo*, já que pode ser administrada oralmente e sem apresentar toxicidade em doses já suficientes para inibir esse complexo enzimático (BEDARD e KRAUSE, 2007; WILLIAMS e GRIENDLING, 2007; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008).

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), composto pertencente à classe dos metóxi-catecóis, foi descrita pela primeira vez em 1883 por Schmiedeberg quando foi isolada das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense). Em 1971, foi isolada das raízes da planta nativa do Himalaia *Picrorhiza kurroa*, muito utilizada na medicina tradicional indiana (STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008). Desde então, tem sido utilizada como um potente inibidor não tóxico da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase em fagócitos e em células não fagocíticas, apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente conhecido (BEDARD e KRAUSE, 2007; WILLIAMS e GRIENDLING, 2007; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008).

Recentemente, alguns estudos também começaram a utilizar a apocinina como ferramenta para investigar a participação da NADPH oxidase em modelos experimentais de IC, onde efeitos importantes de prevenção da disfunção cardíaca (MATSUSHIMA et al., 2009; LIU et al., 2010) e da disfunção endotelial coronariana (ZHANG et al., 2009) foram encontrados nestes animais. Além disso, um único estudo bastante recente demonstrou que a atividade da NADPH oxidase está aumentada na musculatura esquelética de camundongos com IC induzida por infarto do miocárdio, e que o tratamento com apocinina foi capaz de abolir esse aumento de

atividade (OHTA et al., 2011). No entanto, a relação do aumento da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase com alterações morfofuncionais da musculatura esquelética não foi avaliado neste e em outros estudos, e ainda não é conhecida na literatura.

2.5. Treinamento físico aeróbico e insuficiência cardíaca

Durante os últimos anos, tem-se acumulado dados convincentes para os benefícios do treinamento físico na IC, demonstrando que o mesmo é uma estratégia terapêutica importante para o tratamento da síndrome (BRUM et al., 2011), não somente por promover importantes adaptações no controle neuro-hormonal (NEGRAO et al., 1993; ROVEDA et al., 2003) e na função cardíaca (ERBS et al., 2003), mas também por provocar diferentes adaptações bioquímicas, estruturais e funcionais na musculatura esquelética, melhorando a tolerância aos esforços físicos, a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes (MEDEIROS et al., 2010; PIEPOLI et al., 2011).

O treinamento físico aeróbico promove melhoras significativas na vasodilatação dependente do endotélio (ADAMOPOULOS et al., 1993; HORNIG, MAIER e DREXLER, 1996), e aumento da densidade capilar em pacientes com IC (SCARPELLI et al., 1999), além de aumentar a densidade mitocondrial, a atividade de enzimas oxidativas, e promover adaptações importantes na regulação da massa muscular dos pacientes, consequentemente contribuindo para a melhora da tolerância ao esforço (HAMBRECHT et al., 1997; MEDEIROS et al., 2010; PIEPOLI et al., 2011).

Cabe ressaltar que o treinamento físico aeróbico também é capaz de diminuir o estresse oxidativo e a inflamação no músculo esquelético, diminuindo o nível de oxidação de biomoléculas e prevenindo algumas alterações morfofuncionais tanto em pacientes com IC (GIELEN et al., 2003; LINKE et al., 2005; GIELEN et al., 2012), quanto em modelos animais (NUNES et al., 2008), como também observado em estudos do nosso grupo (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012).

Como o treinamento físico aeróbico é atualmente recomendado para o tratamento e prevenção da IC e consiste em um estímulo mecânico muito importante para a manutenção da massa muscular (SCHULZE et al., 2002; ADAMS, DORING e

SCHULER, 2008), além de diminuir marcadores de estresse oxidativo em modelos animais de atrofia muscular (KACZOR et al., 2007; BACURAU et al., 2009; CHEN et al., 2011; CUNHA et al., 2012), foi também de nosso interesse investigar como o complexo enzimático NADPH oxidase responde a esse estímulo fisiológico crônico na musculatura esquelética de ratos infartados.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar a contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados, e o efeito do treinamento físico aeróbico na ativação desse complexo enzimático e na regulação da massa muscular esquelética.

3.2. Específicos

1- Estudar o papel da NADPH oxidase na ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e na atrofia muscular esquelética de ratos infartados. Para isso, avaliamos em ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham) ou infartados, tratados ou não-tratados com apocinina (substância que inibe a NADPH oxidase):

- a função e a estrutura cardíacas;
- o consumo máximo de oxigênio e a tolerância à realização de exercício físico progressivo em esteira rolante;
- a expressão de RNA mensageiro de algumas isoformas da NADPH oxidase (Nox1, Nox2 e Nox4) e das subunidades p47phox e p22phox nos músculos plantar e sóleo;
- a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase nos músculos plantar e sóleo;
- os produtos da oxidação da dihidroetidina nos músculos plantar e sóleo;
- os níveis de hidroperóxidos lipídicos nos músculos plantar e sóleo;
- a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, e a concentração de glutathione nos músculos plantar e sóleo;
- a expressão de RNA mensageiro de alguns componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (Atrogin, MuRF, e subunidades C5 e C2 do proteassoma) nos músculos plantar e sóleo;

- a atividade do proteassoma nos músculos plantar e sóleo;
- a massa dos músculos plantar e sóleo;
- a área de secção transversa das fibras tipo I e tipo II dos músculos plantar e sóleo;
- a expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear dos músculos plantar e sóleo.

2- Estudar o efeito do treinamento físico aeróbico na ativação da NADPH oxidase e do sistema ubiquitina-proteassoma na musculatura esquelética de ratos infartados e seu efeito na modulação da massa muscular desses animais. Para isso, avaliamos em ratos Sham ou infartados, treinados ou sedentários, os mesmos itens supracitados no objetivo específico 1. Além disso, incluímos a mensuração da atividade da enzima citrato sintase nos músculos plantar e sóleo, importante marcador de eficácia do treinamento físico aeróbico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

Foram estudados ratos machos (Wistar) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com oito semanas de idade no início do experimento, que permaneceram em gaiolas com quatro animais, onde foram alimentados com dieta laboratorial padrão (Nuvilab®CRU, Nuvital Nutrientes, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida entre 22-23°C e foi adotado ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos propostos para o presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CEP#2008/40). Os ratos foram distribuídos em grupos de acordo com os objetivos específicos do projeto (TABELA 1), e serão detalhados nos tópicos a seguir.

Tabela 1: Grupos e número de animais utilizados para a obtenção dos resultados do presente projeto.

Grupos				
Subprojeto 1:	Sham (-) apocinina (n=9)	Sham (+) apocinina (n=8)	Infartados (-) apocinina (n=11)	Infartados (+) apocinina (n=11)
Subprojeto 2:	Sham Sedentários (n=9)	Sham Treinados (n=7)	Infartados Sedentários (n=11)	Infartados Treinados (n=9)

Subprojeto 1: Propõe estudar o papel da NADPH oxidase na ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e na atrofia muscular esquelética de ratos infartados. Subprojeto 2: Propõe estudar o efeito do treinamento físico aeróbico na ativação da NADPH oxidase e do sistema ubiquitina-proteassoma na musculatura esquelética de ratos infartados e seu efeito na modulação da massa muscular desses animais.

4.2. Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio

Utilizamos no presente estudo modelo animal de infarto do miocárdio induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior (JOHNS e OLSON, 1954). Os animais do grupo infartado foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, ip) e ketamina (50mg/kg, ip), intubados e artificialmente ventilados (70 incursões/minuto; 2,5 mL/incursão). Na sequência foi realizada incisão torácica e ligadura da artéria coronária descendente esquerda. Ao final do procedimento, o tórax foi fechado e os gases remanescentes em seu interior retirados para restabelecimento do diferencial pressórico de gases (retirada do pneumotórax), permitindo a respiração natural dos animais. Os animais do grupo Sham foram submetidos a procedimento cirúrgico de mesma duração, mimetizando o estresse cirúrgico.

4.3. Função contrátil e dimensões do ventrículo esquerdo em sístole e diástole

A função contrátil cardíaca foi avaliada por ecocardiograma em modo M, quatro e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos, a qual foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Magno Martins Dourado do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. Os ratos foram anestesiados, colocados em posição supina e submetidos à tricotomia do tórax. As dimensões cardíacas foram mensuradas por ecocardiógrafo (Acuson Sequoia 512) equipado com transdutor linear de 14 Mhz e as medidas ecocardiográficas seguiram recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

As medidas realizadas foram: dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo (DDFVE), dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo (DSFVE), espessura do septo interventricular na diástole (SIVD), espessura do septo interventricular na sístole (SIVS), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPD) e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPS); e a função contrátil do ventrículo esquerdo foi determinada por meio da fração de

encurtamento (FE), calculada pela fórmula: $FE (\%) = [(DDFVE - DSFVE) / DDFVE] \times 100$.

4.4. Tratamento com apocinina

Uma parte dos animais de ambos os grupos (Infartados e Sham) foram submetidos ao tratamento com apocinina com o intuito de inibir a NADPH oxidase e estudar a contribuição deste complexo na atrofia muscular e nos outros objetivos específicos do presente projeto. A apocinina (Sigma Aldrich Company, EUA) foi administrada diariamente aos animais por gavagem (30mg/kg/dia) por um período de oito semanas, iniciando-se após o período de recuperação da cirurgia (quatro semanas após infarto). Esta concentração de apocinina foi escolhida em função de outros estudos que administraram esta mesma quantidade tanto em ratos (HAYASHI et al., 2005; BAUMER et al., 2007; PECHANOVA, JENDEKOVA e VRANKOVA, 2009; OELZE et al., 2011) quanto em camundongos (LI et al., 2010) durante curtos e longos períodos e observaram a sua eficácia em inibir o complexo enzimático sem apresentar efeitos tóxicos aos animais. Os grupos tratados com apocinina foram denominados Sham (+) apocinina e Infartados (+) apocinina, ao passo que os animais não tratados com apocinina foram denominados Sham (-) apocinina e Infartados (-) apocinina quando utilizados na comparação com os tratados.

4.5. Protocolo de treinamento físico aeróbico

Outra parte dos animais de ambos os grupos (Infartados e Sham) foram submetidos a um protocolo de treinamento físico aeróbico em esteira rolante após a realização da determinação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), a qual será descrita no tópico seguinte (item 4.7). Os animais foram submetidos à corrida em esteira com inclinação de vinte graus, cinco dias por semana, durante oito semanas, iniciando-se após o período de recuperação da cirurgia (quatro semanas após infarto), conforme protocolo adaptado de (HARAM et al., 2009) e (FERREIRA et al., 2007). Os animais realizaram aquecimento de dez minutos a 40% do VO_{2max} antes de cada sessão de treinamento, a qual consistiu de sessenta minutos de exercício

em intensidade moderada (60% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$). A velocidade de corrida foi ajustada ao final da quarta semana de treinamento físico, por meio dos testes abaixo descritos.

Os grupos treinados foram denominados Sham treinados e Infartados treinados, ao passo que os animais não submetidos ao treinamento físico foram denominados Sham sedentários e Infartados sedentários quando utilizados na comparação com os treinados.

4.6. Tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico foi avaliada quatro e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, inclinada a vinte graus, sendo iniciado na velocidade de 6m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, conforme protocolo adaptado de (HARAM et al., 2009) e (FERREIRA et al., 2007). A velocidade máxima de corrida foi registrada e a distância total percorrida calculada. Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações (10 min/dia).

4.7. Potência aeróbia máxima ($\text{VO}_{2\text{máx}}$)

O $\text{VO}_{2\text{máx}}$ foi mensurado quatro e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos, por meio de teste de corrida em esteira, como descrito acima. Os animais realizaram o teste em esteira rolante montada dentro de uma câmara metabólica conectada por tubos a um analisador de oxigênio e bomba de ar responsável pela manutenção do fluxo de gases dentro da câmara. O aparelho foi calibrado após cada teste e o $\text{VO}_{2\text{máx}}$ calculado pela fórmula $(p\text{O}_{2\text{amb}} - p\text{O}_{2\text{máx}}) \times 3500 / m$, onde $p\text{O}_{2\text{amb}}$ representa a fração de oxigênio no ar ambiente, $p\text{O}_{2\text{máx}}$ a fração expirada de oxigênio, 3500 o fluxo de ar em mL/min e "m" a massa corporal em quilogramas.

4.8. Coleta dos tecidos

Quarenta e oito horas após as reavaliações pós-tratamento com apocinina ou treinamento físico (12 semanas após procedimentos cirúrgicos), os animais foram

sacrificados por decapitação e os músculos esqueléticos plantar e sóleo, bem como coração, pulmões e fígado foram cuidadosamente dissecados, pesados e congelados em nitrogênio líquido ou em freezer (-80°C), dependendo do experimento a que foram destinados. Pulmões e fígado foram submetidos à secagem em estufa (37°C) e pesados a cada 24 horas até que não houvesse mais alteração de massa, permitindo o cálculo da razão massa úmida:massa seca como um índice de edema pulmonar e hepático, respectivamente.

Os músculos plantar, composto predominantemente de fibras do tipo II/brancas/glicolíticas, e sóleo, composto predominantemente de fibras do tipo I/vermelhas/oxidativas, foram estrategicamente selecionados para avaliar as alterações musculoesqueléticas induzidas pelo infarto do miocárdio e pelas intervenções utilizadas no projeto devido ao fato destes músculos apresentarem características distintas do ponto de vista estrutural, contrátil e metabólico, bem como no aspecto pró e antioxidante.

4.9. Atividade da enzima citrato sintase

A atividade máxima da enzima citrato sintase foi determinada por método fotométrico, por meio da quantificação do complexo formado entre CoA com ácido 5,5'ditiobis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio. Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugados à 12000g durante 15 minutos (4°C). A mistura de ensaio foi constituído por Tris-Base (100mM), EDTA (1mM), DTNB (0,2mM), acetil-CoA (0,1mM), Triton X-100 (1%, v:v) e amostra. A reação é iniciada pela adição de oxaloacetato (0,5mM) e a leitura de absorbância em 412nm é acompanhada por 10 minutos a 25°C (ALP, NEWSHOLME e ZAMMIT, 1976). A atividade foi dada em nmol de substrato consumido por minuto e os resultados corrigidos pela quantidade de proteína citosólica utilizada no ensaio.

4.10. Atividade do complexo enzimático NADPH oxidase

Para verificar a participação do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular em ratos infartados e o efeito do treinamento físico e tratamento com apocinina nessa enzima, foi avaliada a atividade da NADPH oxidase em homogeneizados de fração de membrana obtidos por ultracentrifugação sequencial como descrito anteriormente (LAURINDO et al., 2002). Resumidamente, aproximadamente 40 miligramas dos músculos plantar e sóleo foram homogeneizados em tampão de lise A (Tris 50 mM pH 7,4 contendo EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM). Os homogeneizados foram sonicados (3 ciclos a 8W de 10 segundos), centrifugados para retirada de mitocôndrias e núcleos (18.000g por 15 min), e os sobrenadantes foram centrifugados a 100.000g por 1h para obtenção da fração enriquecida de membranas. As dosagens de proteína foram realizadas com reagente Bradford (BioRad, EUA). As frações de membrana (20µg de proteína) foram incubadas com DHE (50 µM) e DNA de timo de bezerro (1,25 µg/mL) em PBS/DTPA, em presença de NADPH (50 µM), volume final de 120 µL, por 30 min, a 37°C, no escuro. A fluorescência total foi medida (λ_{exc} 510nm, λ_{em} 595nm) em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (SpectraMax M5, Molecular Devices).

Além da fluorescência medida pela oxidação da sonda DHE, mais específica para avaliar a oxidação por ânions superóxido, avaliamos também a atividade da NADPH oxidase pela sonda Amplex Red[®], mais específica para avaliar a oxidação por peróxido de hidrogênio. Para isso, fração de membrana (20 µg) foi incubada com NADPH (250µM) em PBS (pH 7,4 contendo DTPA 100µM) na presença de HRP (0,175U/mL) e reagente Amplex Red (140µM) a 37°C no escuro em placa de 96 poços (volume final de 120 µL). A fluorescência total foi medida (λ_{exc} 510nm, λ_{em} 590nm) em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (SpectraMax M5, Molecular Devices).

4.11. Expressão de RNA mensageiro das isoformas Nox1, Nox2 e Nox4 e das subunidades p47phox e p22phox

Além da atividade da NADPH oxidase, foi avaliada a expressão de RNA mensageiro (RNAm) das isoformas Nox1, Nox2 e Nox4 e das subunidades p47phox e p22phox nos músculos plantar e sóleos dos animais estudados.

Para avaliar a expressão de RNA mensageiro, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando Trizol (Invitrogen, SP, Brasil). As concentrações de RNA foram determinadas por medida de absorbância de 260 nm. A pureza do RNA foi determinada pelo cálculo da razão das absorbâncias de 260nm e 280nm (espectrofotometria por NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich, Brasil). O RNA isolado foi armazenado a -70°C até sua utilização para a reação em cadeia da polimerase (PCR para a confecção de cDNA). Para a transcrição reversa (cDNA) foi realizada utilizando Revertaid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, EUA), onde 2 µg de RNA total serão adicionados numa reação contendo oligo dT (0.5 µg), RiboLock™ RNase inhibitor (20u), 1 mM de dNTP mix, RevertAid™ Reverse Transcriptase (200u), totalizando uma solução final de 20 µL (Fermentas, EUA), a qual foi incubada a 42°C por 1h mais 10 min a 70°C para término da transcrição reversa. A expressão de RNA mensageiro foi avaliada por PCR em tempo real utilizando primers específicos (TABELA 2) e Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, EUA). A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando os seguintes parâmetros de ciclos: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s cada ciclo e 60°C por 1min. A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foi feita pelo Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e para cada gene de interesse como o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene normalizador, no caso, a ciclofilina. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão de RNAm de interesse (DDCt) foi realizado por subtração do DCt do grupo Sham para o correspondente DCt dos outros grupos. Os resultados foram representados em % do Sham.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão de RNA mensageiro (NADPH oxidase).

Genes	Forward	Reverse
Ciclofilina	5'-TGGCAAGCATGTGGTCTTTGGGAAG-3'	5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGCCATTC-3'
Nox1	5'-CTACAGTAGAAGCCAACAGGCCAT-3'	5'-ACTGTCACGTTTGGAGACTGGATG-3'
Nox2	5'-CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT-3'	5'-CAATCCCAGCTCCCACTAACATCA-3'
Nox4	5'-GCCCTGAAGAATATTTGATGTGGTGACTCAC-3'	5'-CAGCTTCAGAGTGAGTGAGTTCAGCTCCTC- 3'
p22phox	5'-CAGCCATCCGGGGTGAGCAGTG- 3'	5'-GGGGTTGGTAGGTGGCTGCTTGATG-3'
p47phox	5'-CATCCCTCCATGGCCTCTGCGTC-3'	5'-GTCAGCACAGGAAGCTCAGGCAGGACAG-3'

4.12. Produtos da oxidação da dihidroetidina

A dihidroetidina (DHE) é uma molécula não fluorescente que ao ser oxidada por ROS produz produtos que se intercalam no DNA e emitem fluorescência. A fluorescência total (observada em microscópio de fluorescência) derivada da oxidação da DHE permite a análise da produção total de ROS em tecidos.

Para análise de fluorescência total, secções dos músculos plantar e sóleo (10 µm) foram incubadas com DHE (10µM) a 37°C por 30 min (SULLIVAN-GUNN et al., 2011). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta (projeto Multiusuários Fapesp 04/08908-2) e a intensidade de fluorescência foi quantificada por meio do programa Image J (Scion Corporation based on NIH image, EUA).

4.13. Sistema de defesa antioxidante

4.13.1. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por um método que consiste na inibição da redução de citocromo C por radicais superóxidos gerados pelo sistema xantina-xantina oxidase, proporcionada pela SOD presente na amostra testada, que compete com citocromo C pelos radicais gerados (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).

Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugados em 12000g durante 15 minutos (4°C). Inicialmente, a taxa de redução de citocromo C foi avaliada na ausência de amostra, pela leitura da taxa de alteração de absorbância em 550nm durante 5 minutos, em solução contendo citocromo C (19mM), xantina (1,18mM) e xantina oxidase diluídos em tampão fosfato (0,05 M, pH 7,8). A concentração de xantina oxidase foi ajustada para uma taxa de redução de citocromo C de 0,025 unidades de absorbância por minuto (UA/min). Na sequência a taxa de redução de citocromo C foi acompanhada durante 5 minutos na presença da amostra diluída na solução supracitada. A atividade de SOD da amostra foi então calculada pela diferença entre a taxa de oxidação de citocromo C na ausência e na presença de amostra.

4.13.2. Atividade da catalase

A atividade da catalase foi avaliada pelo acompanhamento da decomposição de peróxido de hidrogênio adicionado às amostras, por meio de leitura de absorbância em 240nm. Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugados a 12000g durante 15 minutos (4°C). A fração sobrenadante foi utilizada no ensaio. Peróxido de hidrogênio foi adicionado ao lisado na concentração final de 10mM e a absorbância em 240nm foi acompanhada durante 4 minutos. A taxa de decaimento da absorbância corresponde à atividade de catalase presente na amostra testada.

4.13.3. Concentração de glutathiona

Para avaliar os níveis totais de glutathiona, principal agente redutor celular, utilizamos um kit de detecção fluorescente (Glutathione Fluorescent Detection Kit, Arbor Assays LLC, EUA).

Aproximadamente 15mg dos músculos foram homogeneizados em tampão fosfato gelado (100mM, pH 7) e centrifugados a 14000rpm por 10min a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com um volume igual de ácido sulfosalicílico (5%) gelado. Os níveis de glutathiona foram avaliados por fluorescência

(λ_{exc} 390 nm, λ_{em} 510 nm) em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (Wallac Victor² 1420-Multilabel Counter, PerkinElmerTM, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.14. Expressão de RNA mensageiro de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma

Para verificar a participação do SUP na atrofia muscular induzida pelo infarto e o efeito do treinamento físico ou tratamento com apocinina nesse sistema, foi avaliada a expressão de RNA mensageiro de MuRF, Atrogin, e das subunidades C2 (subunidade α - regulatória) e C5 (subunidade β - catalítica) do proteassoma no músculo plantar nos animais estudados. O método utilizado para esta avaliação é o mesmo descrito no tópico 4.11, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos (TABELA 3).

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão de RNA mensageiro (SUP).

Genes	Forward	Reverse
Atrogin	5'-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT-3'	5'-GTTGAATCTTCTGGAATCCAG GAT-3'
MuRF	5'-GTGTGAGGTGCCTACTTGCT-3'	5'-ACTCAGCTCCTCCTTCACCT-3'
subunidade C5	5'-GCTGCTCGACAACCAAGGTTGGCTTC -3'	5'-CAGTGTACACATCCCTCTCGGCTGCAG-3'
subunidade C2	5'-TTGAAGAAAGACCACAGAGAAAAGCACAGC-3'	5'-GTATGCCCTGCATCCTCATGTCCTC-3'

4.15. Atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina

A atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S foi avaliada nos músculos plantar e sóleo dos animais estudados por meio de ensaio fluorimétrico, utilizando o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), conforme descrito por Lu et al (LU et al., 2008). O buffer utilizado no ensaio contém detergentes que atuam como ativadores para a atividade da peptidase. A atividade da peptidase é determinada pela liberação do grupo AMC (amido-4-methylcoumarin), após degradação detectada por fluorímetro (λ_{exc} 390nm, λ_{em} 460nm).

4.16. Estrutura da musculatura esquelética

Para confirmar a atrofia muscular nos ratos infartados e verificar a eficácia das estratégias terapêuticas adotadas nesse projeto, além da massa total, avaliamos também a área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II dos músculos plantar e sóleo. Após ser congelado em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, os músculos foram cortados em criostato em secções transversais de 10 µm para processamento posterior. A avaliação da área de secção transversa foi realizada por meio da reação para miosina ATPase (BROOKE e KAISER, 1970), utilizando soluções em pH diferentes (10,3 ou 4,6). As fibras do tipo I (lentas e oxidativas) reagem fortemente na solução ácida, podendo ser identificadas em aquisições microscópicas como as fibras mais escuras, enquanto as fibras do tipo II (rápidas e glicolíticas) podem ser identificadas como sendo as mais claras. O inverso ocorre na solução básica. A área de cada fibra muscular foi mensurada e a média calculada.

4.17. Avaliação da expressão proteica de NF-κB na fração nuclear

A expressão de NF-κB foi avaliada na fração nuclear dos músculos plantar e sóleo por meio da técnica de Western blotting. Os músculos foram homogeneizados por meio de homogeneizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments) em volumes (10x sua massa) de tampão de lise PBS contendo um coquetel de inibidor de proteases (1:100; Sigma-Aldrich-EUA). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por quinze minutos a 4°C, para a separação do sobrenadante. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (Biorad-EUA). As amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (sodium- dodecyl- sulfate) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida utilizando um tampão de corrida (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo Tris-Base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,0375%. As membranas foram lavadas duas vezes com solução TBS-T (Tris-Base 50 mM, NaCl 0.9% e Tween 20 0,1%). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de

uma mistura contendo TBS-T e BSA (5%) por 120 minutos em temperatura ambiente com agitação constante. A membrana, então, foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (NFkB, coelho - Abcam - Inglaterra) em solução bloqueadora por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, EUA).

Para verificar a eficiência de transferência utilizamos s-Ponceau (0.2% s-Ponceau, 5% ácido acético). Foi utilizado anticorpo secundário conjugado a peroxidase (IgG anti-coelho ECL, Amersham Biosciences, EUA) anti o anticorpo primário, utilizado na titulação sugerida pelo fabricante. As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa Image J (Scion Corporation based on NIH image).

4.18. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de média±erro padrão da média e comparados pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores (doença e tratamento). No caso de interação significativa, foi utilizado o teste *post-hoc* de Duncan. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos de animais que foram submetidos à cirurgia de indução de infarto do miocárdio e cirurgia fictícia (Sham), os quais foram submetidos às intervenções propostas no projeto (oito semanas de tratamento com apocinina ou treinamento físico) com início quatro semanas após as cirurgias.

Esses resultados serão apresentados em duas partes, de acordo com os objetivos específicos do projeto:

Subprojeto 1: Estudar o papel da NADPH oxidase na ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e na atrofia muscular esquelética de ratos infartados.

Subprojeto 2: Estudar o efeito do treinamento físico aeróbico na ativação da NADPH oxidase e do sistema ubiquitina-proteassoma na musculatura esquelética de ratos infartados e seu efeito na modulação da massa muscular desses animais.

Os subtópicos referentes aos subprojetos 1 e 2 descritos acima serão, respectivamente: 5.1. NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética de ratos infartados; e 5.2. Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética.

Vale a pena destacar que, durante a cirurgia dos ratos, obtivemos 52% de mortalidade dos animais, e durante todo o protocolo o índice de mortalidade foi menor que 1%. É importante destacar que somente animais infartados com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo inferior a 35% na quarta semana pós-cirurgia foram incluídos no estudo. Dessa forma 27% dos animais infartados sobreviventes foram descartados.

5.1. NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética de ratos infartados

Todos os resultados apresentados neste tópico referem-se ao período final do desenho experimental, ou seja, doze semanas após as cirurgias para indução do infarto do miocárdio ou Sham, correspondendo ao final de oito semanas de tratamento com apocinina, o qual teve início quatro semanas após procedimentos cirúrgicos.

É importante destacar que os animais dos grupos Sham (-) apocinina e Sham (+) apocinina foram distribuídos de forma que a massa corporal, a tolerância ao esforço físico e a função contrátil do ventrículo esquerdo fossem similares entre os grupos no início do tratamento com apocinina (quatro semanas após cirurgias). O mesmo foi realizado para os grupos Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina.

Como podemos observar na TABELA 4 e na FIGURA 2A, doze semanas pós-cirurgias os animais Infartados (-) apocinina apresentaram aumento no diâmetro ventricular ao final da sístole (Sham (-) apocinina: $4,99 \pm 0,30$ mm; Infartados (-) apocinina: $6,68 \pm 0,52$ mm, $p < 0,05$), acompanhado de prejuízo significativo (36% em relação ao Sham (-) apocinina) na função contrátil cardíaca quando comparados aos ratos Sham (-) apocinina, demonstrando a eficácia da cirurgia em promover disfunção ventricular esquerda. O tratamento com apocinina por oito semanas não promoveu alteração no aumento significativo do diâmetro ventricular ao final da sístole observados nos animais Infartados (-) apocinina (TABELA 4) e nem no prejuízo significativo observado na função contrátil cardíaca desses animais (FIGURA 2A), persistindo assim a disfunção cardíaca no grupo Infartados (+) apocinina. O tratamento com apocinina não alterou a função contrátil nos animais Sham.

Tabela 4: Parâmetros ecocardiográficos dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina.

	Sham (-) apocinina	Sham (+) apocinina	Infartados (-) apocinina	Infartados (+) apocinina
DSFVE (mm)	$4,99 \pm 0,30$	$5,33 \pm 0,35$	$6,68 \pm 0,52^*$	$6,91 \pm 0,65^*$
DDFVE (mm)	$8,12 \pm 0,36$	$8,20 \pm 0,28$	$8,71 \pm 0,41$	$8,91 \pm 0,56$
SIVS (mm)	$1,89 \pm 0,09$	$1,70 \pm 0,11$	$1,68 \pm 0,12$	$1,56 \pm 0,13$
SIVD (mm)	$1,12 \pm 0,09$	$0,92 \pm 0,06^*$	$0,99 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,04^*$
PPVES (mm)	$2,34 \pm 0,13$	$2,51 \pm 0,13$	$2,63 \pm 0,14$	$2,25 \pm 0,19$
PPVED (mm)	$1,38 \pm 0,10$	$1,46 \pm 0,08$	$1,33 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,09$

Diâmetro sistólico (DSFVE) e diastólico (DDFVE) finais do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular ao final da sístole (SIVS) e diástole (SIVD), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES) e diástole (PPVED) ao final do tratamento dos animais com apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

Os dados referentes às características morfofuncionais dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina estão apresentados na FIGURA 2.

FIGURA 2. Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma (A), massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B), distância total percorrida em esteira rolante em teste incremental até a exaustão (C), consumo máximo de oxigênio (VO₂max) (D) e massa corporal (E) dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

Como esperado e corroborando os dados ecocardiográficos, os animais Infartados (-) apocinina apresentaram aumento da massa cardíaca corrigida pela

massa corporal ($3,1 \pm 0,18 \text{ mg/g}$) quando comparados aos animais do grupo Sham (-) apocinina ($2,83 \pm 0,24 \text{ mg/g}$) (FIGURA 2B), caracterizando o remodelamento cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio.

Além disso, o tratamento com apocinina não alterou a massa cardíaca dos animais Sham (grupo Sham (+) apocinina) e também não promoveu alteração no aumento da massa cardíaca observada nos animais infartados (grupo Infartados (+) apocinina) (FIGURA 2B).

Como podemos observar na FIGURA 2C e 2D, os ratos Infartados (-) apocinina não apresentaram alterações significativas na distância total percorrida no teste até a exaustão ($314,0 \pm 18,3 \text{ m}$) e nem no VO_2max ($52,3 \pm 1,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) quando comparados aos ratos Sham (-) apocinina ($340,9 \pm 17,8 \text{ m}$ e $55,6 \pm 3,4 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente) no final do desenho experimental. Por outro lado, quatro semanas após as cirurgias havia sido observada menor tolerância ao esforço físico nos animais Infartados (-) apocinina (distância percorrida: $326,0 \pm 11,3 \text{ m}$) quando comparados aos ratos Sham (-) apocinina (distância percorrida: $373,8 \pm 10,8 \text{ m}$).

Em relação ao tratamento com apocinina, este não foi capaz de promover alterações entre os grupos tanto na distância total percorrida em teste incremental até a exaustão (Sham (-) apocinina: $340,9 \pm 17,8 \text{ m}$; Sham (+) apocinina: $329,3 \pm 10,1 \text{ m}$; Infartados (-) apocinina: $314,0 \pm 18,3 \text{ m}$; Infartados (+) apocinina: $306,6 \pm 12,6 \text{ m}$) quanto no consumo máximo de oxigênio (Sham (-) apocinina: $55,6 \pm 3,4 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Sham (+) apocinina: $59,3 \pm 5,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Infartados (-) apocinina: $52,3 \pm 1,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Infartados (+) apocinina: $50,2 \pm 2,2 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (FIGURA 2C e 2D), sugerindo que a NADPH oxidase não está associada à capacidade funcional dos ratos.

Quanto à massa corporal dos animais, apesar de todos os grupos apresentarem valores similares desta variável no início dos experimentos (antes dos procedimentos cirúrgicos), podemos observar na FIGURA 2E que ao final do desenho experimental (doze semanas pós-cirurgia) a massa corporal dos ratos Infartados (-) apocinina apresentou-se significativamente menor que os animais Sham (-) apocinina ($426,0 \pm 11,9$ vs $477,4 \pm 18,0 \text{ g}$, respectivamente).

Apesar de o tratamento com apocinina não alterar a função contrátil cardíaca, a massa cardíaca e a tolerância ao esforço físico, esta intervenção foi eficaz em

prevenir parcialmente o menor ganho de massa corporal induzido pelo infarto do miocárdio, uma vez que a massa corporal dos animais Infartados (+) apocinina não foi diferente dos animais Sham (-) apocinina, distinto do que encontramos em relação aos animais Infartados (-) apocinina (FIGURA 2E).

Partindo para o foco principal do estudo, que foi estudar a musculatura esquelética desses animais, tivemos como estratégia avaliar as alterações musculoesqueléticas induzidas pelo infarto do miocárdio e o efeito da inibição da NADPH oxidase em dois músculos com características distintas do ponto de vista estrutural, contrátil e metabólico, bem como no aspecto pró e antioxidante. Os músculos estudados foram o plantar, composto predominantemente de fibras do tipo II/brancas/glicolíticas, e o sóleo, composto predominantemente de fibras do tipo I/vermelhas/oxidativas.

Os resultados serão apresentados em dois tópicos, sendo o primeiro tópico relacionado às respostas observadas no músculo plantar e o segundo tópico relacionado às respostas observadas no músculo sóleo.

5.1.1. Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase

Considerando a primeira hipótese deste estudo, o primeiro passo do projeto foi investigar se as NADPH oxidases estavam hiperativadas na musculatura esquelética dos ratos submetidos ao infarto do miocárdio, e caso estivessem, investigar se o tratamento com apocinina teria sido eficaz em inibir este complexo enzimático.

Como podemos observar na FIGURA 3, os animais Infartados (-) apocinina não apresentaram alterações nas expressões de RNAm dos homólogos Nox1 (FIGURA 3A) e Nox4 (FIGURA 3C) e das subunidades p47phox (FIGURA 3D) e p22phox (FIGURA 3E) no músculo plantar quando comparados ao grupo Sham (-) apocinina. No entanto, foi observado um aumento significativo da expressão de RNAm de Nox 2 (FIGURA 3B) no músculo plantar dos animais Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina. O tratamento com apocinina não alterou a expressão de RNAm de p22phox entre os grupos, porém os

animais Infartados (+) apocinina apresentaram uma diminuição significativa na expressão de RNAm de Nox4 e da subunidade organizadora p47phox quando comparados aos animais Infartados (-) apocinina, além de não alteraram a expressão de RNAm de Nox2 que já estava aumentada no músculo plantar dos animais Infartados (-) apocinina. O tratamento com apocinina também promoveu alterações nos plantares dos animais Sham, diminuindo a expressão de RNAm de Nox1, Nox 4 e p47phox, e aumentando a expressão de RNAm de Nox2 nos animais Sham (+) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina.

PLANTAR

FIGURA 3. Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Além da expressão de RNAm dos homólogos previamente identificados na literatura como expressos na musculatura esquelética (Nox1, Nox2 e Nox4) e das subunidades p47phox e p22phox, também foi avaliada a atividade da NADPH oxidase pela oxidação da dihidroetidina (DHE – mais específica para oxidação por ânions superóxido) e pela oxidação da sonda Amplex Red (mais específica para oxidação por peróxido de hidrogênio) nos músculos plantares dos animais estudados.

Acompanhando o aumento da expressão de RNAm de Nox2, foi observado aumento significativo da atividade da NADPH oxidase com a sonda DHE no músculo plantar dos animais Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina (FIGURA 4A), ao passo que a atividade da NADPH oxidase avaliada com a sonda Amplex Red foi similar entre os grupos (FIGURA 4B). Estas respostas nos indicam que o complexo enzimático NADPH oxidase está aumentado no musculo plantar dos animais infartados, onde o homólogo Nox2 parece ser o responsável por este aumento da atividade, uma vez que sua expressão de RNAm está aumentada e a maior atividade parece ser mais específica para ânions superóxido, principal produto da Nox2.

O tratamento com apocinina não alterou a atividade na NADPH oxidase tanto nos animais Sham (+) apocinina quanto nos animais Infartados (+) apocinina quando avaliada pela oxidação de Amplex Red (FIGURA 4B). No entanto, o tratamento com apocinina nos animais Infartados (+) apocinina foi eficaz em prevenir o aumento da atividade da NADPH oxidase observada no músculo plantar dos animais Infartados (-) apocinina quando utilizada a sonda DHE (FIGURA 4A), demonstrando a efetividade do nosso tratamento em inibir esse complexo enzimático.

PLANTAR

FIGURA 4. Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Como podemos observar na FIGURA 5A e 5B, o aumento da expressão de Nox2 e da atividade da NADPH oxidase no músculo plantar dos ratos Infartados (-) apocinina foi acompanhando por um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE nos cortes histológicos destes músculos quando comparados aos animais Sham (-) apocinina. Além disso, foi observado maior concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo plantar dos ratos Infartados (-) apocinina comparados aos ratos Sham (-) apocinina (FIGURA 5C).

O tratamento com apocinina não alterou os níveis de produtos da oxidação da DHE nos animais Sham (+) apocinina, porém foi eficaz em diminuir significativamente esses níveis nos animais Infartados (+) apocinina quando comparados aos animais Infartados (-) apocinina, atingindo valores semelhantes aos ratos Sham (-) apocinina. Além disso, o tratamento com apocinina promoveu uma atenuação parcial da concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo plantar dos ratos Infartados (+) apocinina, uma vez que seus valores deixaram de ser estatisticamente diferentes dos ratos Sham (-) apocinina (FIGURA 5C).

Esses dados, em conjunto com a correlação positiva e significativa entre a atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação de DHE (FIGURA 5D), sugerem que o infarto do miocárdio promoveu um desequilíbrio redox no

músculo plantar, o qual parece estar relacionado com uma hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase.

PLANTAR

FIGURA 5. Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, níveis de hidroperóxidos lipídicos (C), e correlação entre atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação da DHE (D) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan e correlação de Pearson. * $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Uma vez que o balanço redox não é apenas modulado pela produção de espécies reativas de oxigênio, mas também pelo sistema de defesa antioxidante, avaliamos no músculo plantar dos animais estudados a atividade das enzimas SOD e catalase, e os níveis da glutathione, principal tampão redox celular.

Como podemos observar na FIGURA 6, os animais Infartados (-) apocinina apresentaram menor atividade da enzima SOD (A) quando comparados aos animais Sham (-) apocinina, não promovendo alterações na atividade da catalase (B) e nos níveis de glutathione (C). O tratamento com apocinina não alterou estas respostas em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que o efeito da apocinina em prevenir o aumento nos níveis de produtos da oxidação da DHE e de hidroperóxidos lipídicos não parece estar associado com uma melhora do sistema de defesa antioxidante.

PLANTAR

FIGURA 6. Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathiona (C) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

Atualmente já é sabido que as espécies reativas de oxigênio estão associadas, direta ou indiretamente, com uma hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma na musculatura esquelética. Em função disso, avaliamos no músculo plantar dos animais estudados, a expressão de RNAm de importantes componentes

do SUP, como os atrogenes Atrogin e MuRF, e as subunidades C5 (catalítica) e C2 (regulatória) do proteassoma. Além disso, avaliamos a atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S.

Como demonstrado na FIGURA 7, apesar de os animais Infartados (-) apocinina não apresentarem alteração na expressão de RNAm de MuRF (B) e da subunidade C2 do proteassoma (D), observa-se aumento tanto das expressões de RNAm de Atrogin (A) e da subunidade C5 (C) quanto da atividade do proteassoma (E) nos plantares desses animais quando comparados ao grupo Sham (-) apocinina, demonstrando a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio.

Um fato interessante é que os animais Infartados (+) apocinina apresentaram valores significativamente menores na expressão de RNAm de Atrogin (A), MuRF (B) e subunidade C5 do proteassoma (C) no músculo plantar quando comparados aos ratos Infartados (-) apocinina, culminando assim em uma prevenção parcial do aumento da atividade do proteassoma em consequência do infarto do miocárdio (E).

Esses dados sugerem que o infarto do miocárdio promoveu uma hiperativação do SUP no músculo plantar, o qual parece estar relacionado com uma hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase.

PLANTAR

FIGURA 7. RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), atividade do proteassoma no sítio quimi tripsina da porção 20S (E), e correlação entre os níveis de produtos de oxidação da DHE e atividade do proteassoma (F) no músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan, e correlação de Pearson.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Essa hiperativação do SUP, associada com a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase, foi acompanhada por uma menor massa do músculo plantar (FIGURA 8A e 8B) e menor área de secção transversa das fibras do tipo I (FIGURA 8C) e do tipo II (FIGURA 8D) desses músculos observada nos animais

Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina, demonstrando a atrofia muscular esquelética induzida pelo infarto do miocárdio

O tratamento com apocinina, além de diminuir a hiperativação da NADPH oxidase e do SUP nos animais Infartados (+) apocinina, também foi eficaz em prevenir parcialmente tanto a perda de massa absoluta e relativa do músculo plantar, quanto a menor área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II observada nos animais Infartados (-) apocinina em relação aos animais Sham (-) apocinina (FIGURA 8A-D).

Esses dados demonstram que a atrofia do músculo plantar induzida pelo infarto do miocárdio está associada com uma hiperativação do SUP, provavelmente causada pela hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase, já que a inibição deste complexo enzimático preveniu a hiperativação deste sistema de degradação proteica e a perda de massa muscular.

FIGURA 8. Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

Um importante candidato responsável por intermediar esta relação entre as espécies reativas do oxigênio, o SUP e o desenvolvimento e progressão da atrofia muscular em quadros catabólicos é o fator de transcrição redox sensível NF- κ B. Como não conseguimos avaliar a atividade deste fator pelo ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), avaliamos a sua expressão proteica na fração nuclear do músculo plantar dos animais estudados, o qual não foi diferente entre os quatro grupos estudados (FIGURA 9). No entanto, estes dados de NF- κ B ainda são inconclusivos e sua participação ou não neste fenótipo será estudada para o manuscrito resultante desta tese.

FIGURA 9. Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo plantar dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.

5.1.2. Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase

Neste tópico, serão apresentados os resultados obtidos no músculo sóleo, onde tivemos o intuito de comparar as respostas deste músculo com os resultados encontrados no músculo plantar.

Como podemos observar na FIGURA 10, os animais Infartados (-) apocinina não apresentaram alterações nas expressões de RNAm dos homólogos Nox1 (FIGURA 10A) e Nox4 (FIGURA 10C) e da subunidade p22phox (FIGURA 10E) no músculo sóleo quando comparados ao grupo Sham (-) apocinina. No entanto, assim como no plantar, foi observado um aumento significativo da expressão de RNAm de Nox 2 (FIGURA 10B), porém uma diminuição significativa da expressão de RNAm da subunidade p47phox (FIGURA 10D) no músculo sóleo dos animais Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina.

O tratamento com apocinina também não alterou a expressão de RNAm de p22phox entre os grupos no músculo sóleo e, diferente do observado no plantar, os animais Infartados (+) apocinina não apresentaram uma diminuição significativa na expressão de RNAm de Nox4 e da subunidade organizadora p47phox quando comparados aos animais Infartados (-) apocinina, porém apresentaram uma prevenção parcial do aumento da expressão de RNAm de Nox2 observada no sóleo dos animais Infartados (-) apocinina, assim como no plantar. O tratamento com apocinina nos animais Sham reduziu a expressão de RNAm de p47phox, não alterando a expressão de RNAm de Nox1, Nox2 e Nox4 nos sóleos dos animais Sham (+) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina (FIGURA 10A-E).

Esses resultados já demonstram a resposta diversificada dos dois músculos aos mesmos estímulos (infarto do miocárdio e tratamento com apocinina).

SÓLEO

FIGURA 10. Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

Quando avaliamos a atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina e Infartados (-) apocinina tanto com a sonda DHE (FIGURA 11A) quanto com a sonda Amplex Red (FIGURA 11B), não observamos diferenças entre os dois grupos nestas variáveis, nos indicando que, diferente do plantar, o complexo enzimático NADPH oxidase não parece estar aumentado no músculo sóleo dos animais infartados, apesar do aumento da expressão de RNAm

de Nox2 observado nesse músculo. Como também foi observada diminuição da expressão de RNAm de p47phox nos sóleos dos animais Infartados (-) apocinina em relação aos animais Sham (-) apocinina, sugere-se que esta menor expressão esteja compensando o aumento de Nox2 observado nos animais Infartados (-) apocinina, resultando em não alteração da atividade da NADPH oxidase.

O tratamento com apocinina não alterou a atividade desse complexo enzimático tanto nos animais Sham (+) apocinina quanto nos animais Infartados (+) apocinina quando avaliada pelas duas sondas utilizadas (FIGURA 11A e 11B).

SÓLEO

FIGURA 11. Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.

Como podemos observar na FIGURA 12A e 12B, apesar de não ser observada alteração na atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo dos ratos Infartados (-) apocinina, foi observado um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE nos cortes histológicos destes músculos quando comparados aos animais Sham (-) apocinina, sugerindo que este aumento da oxidação da DHE não parece estar associado à atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo, diferente do observado no plantar, podendo ser atribuído talvez a alguma outra fonte de produção de ROS nesse músculo. Além disso, ao contrário do plantar, não foi observada alteração na concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo

dos ratos Infartados (-) apocinina comparados aos ratos Sham (-) apocinina (FIGURA 12C).

O tratamento com apocinina não alterou os níveis de produtos da oxidação da DHE nos sóleos dos animais Sham (+) apocinina, porém foi eficaz em diminuir significativamente esses níveis nos animais Infartados (+) apocinina quando comparados aos animais Infartados (-) apocinina, atingindo valores semelhantes aos ratos Sham (-) apocinina, sugerindo que a apocinina possa também estar modulando outras vias de regulação redox no músculo sóleo, as quais podem inclusive ser moduladas pela NADPH oxidase, como a mitocôndria (FIGURA 12A e 12B).

Diferente do plantar, o tratamento com apocinina não alterou os níveis de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo dos ratos Infartados (+) apocinina, uma vez que os animais Infartados (-) apocinina não aumentaram seus valores em relação aos ratos Sham (-) apocinina (FIGURA 12C).

FIGURA 12. Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, e níveis de hidroperóxidos lipídicos (C) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante, podemos observar na FIGURA 13 que, similar ao observado no músculo plantar, os animais Infartados (-) apocinina apresentaram menor atividade da enzima SOD (A) no músculo sóleo quando comparados aos animais Sham (-) apocinina, não promovendo alterações na

atividade da catalase (B) e nos níveis de glutathione (C). No entanto, diferente do observado no plantar, o tratamento com apocinina preveniu no músculo sóleo dos animais Infartados (+) apocinina a queda da atividade da SOD (A) observada nos animais Infartados (-) apocinina, aumentando também a atividade da catalase (B) nesse músculo tanto dos animais Infartados (+) apocinina quanto nos animais Sham (+) apocinina, não promovendo alteração nos níveis de glutathione (C).

Esse efeito da apocinina de prevenir a queda da atividade da SOD e aumentar a atividade da catalase no músculo sóleo dos animais Infartados (+) apocinina pode ter contribuído para o menor nível de produtos da oxidação da DHE desse grupo quando comparado aos animais Infartados (-) apocinina.

FIGURA 13. Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathiona (C) no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Avaliando também no músculo sóleo dos animais estudados a expressão de RNAm dos componentes do SUP, diferente do que observamos no plantar, não foi observada alteração na expressão de RNAm de Atrogin, MuRF, subunidade C5 e subunidade C2 do proteassoma (FIGURA 14A-D) nos animais Infartados (-)

apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina. No entanto, assim como no plantar, o infarto do miocárdio aumentou a atividade do proteassoma no músculo sóleo dos animais Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina (FIGURA 14E), independente de alteração na atividade da NADPH oxidase, porém associada ao aumento nos níveis de produtos da oxidação da DHE.

Em relação ao tratamento com apocinina, observamos que os animais Infartados (+) apocinina apresentaram valores significativamente maiores na expressão de RNAm da subunidade C5 do proteassoma (C) no músculo sóleo quando comparados aos ratos Infartados (-) apocinina, porém, assim como no plantar, observou-se uma prevenção parcial do aumento da atividade do proteassoma no sóleo dos animais Infartados (+) apocinina, a qual estava aumentada nos animais Infartados (-) apocinina (FIGURA 14E).

SÓLEO

FIGURA 14. Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S no músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina; # $p < 0,05$ vs. Infartados (-) apocinina.

Essa aumento na atividade do proteassoma, apesar de não estar associada com a uma aumento da atividade da NADPH oxidase, foi associada ao aumento nos produtos da oxidação da DHE e foi acompanhada por uma menor massa do músculo sóleo (FIGURA 15A e 15B) e menor área de secção transversa das fibras do tipo I (FIGURA 15C) e do tipo II (FIGURA 15D) desses músculos observada nos animais Infartados (-) apocinina quando comparados aos animais Sham (-) apocinina,

demonstrando também a atrofia do músculo sóleo induzida pelo infarto do miocárdio, como observada no músculo plantar.

O tratamento com apocinina, além de prevenir o aumento do proteassoma nos sóleos dos animais Infartados (+) apocinina, também foi eficaz em prevenir parcialmente tanto a perda de massa absoluta e relativa do músculo sóleo, quanto a menor área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II observada nos animais Infartados (-) apocinina em relação aos animais Sham (-) apocinina (FIGURA 15A-D).

Esses dados demonstram que a atrofia do músculo sóleo induzida pelo infarto do miocárdio, assim como no plantar, está associada com uma maior atividade do proteassoma e com um aumento nos produtos da oxidação da DHE, porém, diferente do plantar, não está associada à hiperativação da NADPH oxidase, apesar de a inibição deste complexo enzimático com apocinina prevenir a hiperativação do proteassoma, diminuir os níveis de produtos da oxidação da DHE e prevenir a perda de massa muscular.

SÓLEO

FIGURA 15. Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham (-) apocinina.

A expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo não foi diferente entre os quatro grupos estudados (FIGURA 16).

FIGURA 16. Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo dos animais Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.

O QUADRO 1 ilustra os principais resultados relacionados à primeira hipótese do estudo.

QUADRO 1: Resumo dos principais resultados relacionados à primeira hipótese do estudo.

Características Morfofuncionais						
Variáveis	Sham (+) apo		Infartados (-) apo		Infartados (+) apo	
Fração de encurtamento	↔		↓		↓ ↔	
Massa cardíaca	↔		↑		↑ ↔	
Distância percorrida e VO ₂ max	↔		↔		↔ ↔	
Massa corporal	↔		↓		↔ ↔	
Respostas musculoesqueléticas ao infarto do miocárdio e ao tratamento com apocinina						
Variáveis	Plantar			Sóleo		
	Sham (+) apo	Infartados (-) apo	Infartados (+) apo	Sham (+) apo	Infartados (-) apo	Infartados (+) apo
Expressão de RNAm - Nox1	↓ ↓	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - Nox2	↑	↑	↑ ↔	↔	↑	↔ ↔
Expressão de RNAm - Nox4	↓ ↓	↔	↓ ↓	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - p47phox	↓ ↓	↔	↓ ↓	↓	↓	↓ ↔
Expressão de RNAm - p22phox	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Atividade NADPH oxidase -DHE	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Atividade NADPH oxidase - AR	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Produtos da oxidação de DHE	↓	↑	↔ ↓	↔	↑	↔ ↓
Hidroperóxidos lipídicos	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Atividade da SOD	↔	↓	↓ ↔	↔	↓	↔ ↔
Atividade da Catalase	↔	↔	↔ ↔	↑ ↑	↔	↑ ↑
Níveis totais de Glutathiona	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - Atrogin	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - MuRF	↔	↔	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - sub. C5	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↑ ↑
Expressão de RNAm - sub. C2	↑	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Atividade do proteassoma	↔	↑	↔ ↔	↔	↑	↔ ↔
Massa muscular	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔
AST fibras do tipo I	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔
AST fibras do tipo II	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔
Expressão proteica de NFκB	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔

↔ sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição, vs. Sham (-) apocinina

↔ sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição, vs. Infartados (-) apocinina

5.2 Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética

Todos os resultados apresentados neste tópico referem-se ao período final do desenho experimental, ou seja, doze semanas após as cirurgias para indução do infarto do miocárdio ou Sham, correspondendo ao final de oito semanas de treinamento físico aeróbico, o qual teve início quatro semanas após procedimentos cirúrgicos.

É importante destacar que os animais dos grupos Sham Sedentários e Sham Treinados foram distribuídos de forma que a massa corporal, a tolerância ao esforço físico e a função contrátil do ventrículo esquerdo fossem similares entre os grupos no início do protocolo de treinamento físico (quatro semanas após cirurgias). O mesmo foi realizado para os grupos Infartados Sedentários e Infartados Treinados.

Como podemos observar na TABELA 5 e na FIGURA 17A, doze semanas pós-cirurgias os animais Infartados Sedentários apresentaram aumento no diâmetro ventricular ao final da sístole (Sham Sedentários: $4,99 \pm 0,30$ mm; Infartados Sedentários: $6,68 \pm 0,52$ mm, $p < 0,05$), acompanhado de prejuízo significativo (36%) na função contrátil cardíaca quando comparados aos ratos Sham Sedentários, demonstrando a eficiência da cirurgia em promover disfunção ventricular esquerda.

Oito semanas de treinamento físico aeróbico foram eficazes em prevenir parcialmente o prejuízo significativo na fração de encurtamento (FIGURA 17A) e o aumento no diâmetro ventricular ao final da sístole observados nos animais Infartados Sedentários (TABELA 5), revertendo assim parcialmente a disfunção contrátil cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio. Não foram observadas alterações na função contrátil cardíaca e nos parâmetros ecocardiográficos entre os grupos Sham Sedentários e Sham treinados (FIGURA 17A e TABELA 5).

Os dados referentes aos parâmetros ecocardiográficos dos animais Sham sedentários, Sham treinados, Infartados sedentários e Infartados treinados estão representados na TABELA 5.

Tabela 5: Parâmetros ecocardiográficos dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados.

	Sham Sedentários	Sham Treinados	Infartados Sedentários	Infartados Treinados
DSFVE (mm)	4,99±0,30	5,16±0,39	6,68±0,52*	5,60±0,51
DDFVE (mm)	8,12±0,36	8,01±0,22	8,71±0,41	8,17±0,45
SIVS (mm)	1,89±0,09	2,05±0,20	1,68±0,12	1,79±0,16
SIVD (mm)	1,12±0,09	1,14±0,08	0,99±0,05	1,00±0,07
PPVES (mm)	2,34±0,13	2,63±0,17	2,63±0,14	2,32±0,12
PPVED (mm)	1,38±0,10	1,51±0,08	1,33±0,05	1,31±0,10

Diâmetro sistólico (DSFVE) e diastólico (DDFVE) finais do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular ao final da sístole (SIVS) e diástole (SIVD), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES) e diástole (PPVED) ao final do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários.

Os dados referentes às características morfofuncionais dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados estão apresentados na FIGURA 17.

FIGURA 17. Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma (A), massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B), distância total percorrida em esteira rolante em teste incremental até a exaustão (C), consumo máximo de oxigênio (VO₂max) (D) e atividade da enzima citrato sintase nos músculos plantar (E) e sólido (F) dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Como demonstrado no tópico anterior, os animais Infartados Sedentários apresentaram aumento da massa cardíaca corrigida pela massa corporal ($3,1 \pm 0,18 \text{ mg/g}$) quando comparados aos animais do grupo Sham Sedentários ($2,83 \pm 0,24 \text{ mg/g}$) (FIGURA 17B), caracterizando o remodelamento cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio.

O treinamento físico aeróbico não alterou a massa cardíaca dos animais Sham Treinados e também não alterou nos ratos Infartados Treinados o aumento da massa cardíaca observado nos animais Infartados Sedentários (FIGURA 17B). Apesar da ocorrência de maior massa cardíaca relativa à massa corporal do grupo Infartados Treinados, demonstramos na FIGURA 17A que tal grupo apresentou uma prevenção importante da disfunção contrátil ventricular, o que sugere a sobreposição dos perfis patológico e fisiológico do crescimento cardíaco promovidos pelo infarto e treinamento físico, respectivamente.

Como podemos observar na FIGURA 17C e 17D, os ratos Infartados Sedentários não apresentaram alterações significativas na distância total percorrida no teste até a exaustão ($314,0 \pm 18,3\text{m}$) e nem no VO_2max ($52,3 \pm 1,6\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) quando comparados aos ratos Sham Sedentários ($340,9 \pm 17,8\text{m}$ e $55,6 \pm 3,4\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente) no final do desenho experimental. No entanto, os animais Infartados Sedentários apresentaram diminuição significativa na atividade de uma enzima chave envolvida no metabolismo aeróbico de produção de energia, a citrato sintase, nos músculos plantar (FIGURA 17E) e sóleo (FIGURA 17F) quando comparados aos ratos do grupo Sham Sedentários, sendo esta uma alteração muscular esquelética frequentemente observada em pacientes com IC.

Ambos os grupos treinados (Sham Treinados e Infartados Treinados) apresentaram aumento da tolerância ao esforço físico e do consumo máximo de oxigênio quando comparados aos animais Sham Sedentários e Infartados Sedentários (FIGURA 17C e 17D). Além disso, ambos os grupos treinados (Sham Treinados e Infartados Treinados) apresentaram aumento da atividade da enzima citrato sintase em relação aos animais dos grupos Sham Sedentários e Infartados sedentários, tanto no músculo plantar (FIGURA 17E) quanto no músculo sóleo (FIGURA 17F). Este efeito do treinamento físico aeróbico em aumentar a tolerância ao esforço e o metabolismo oxidativo nos comprova a efetividade do protocolo de treinamento físico aeróbico utilizado no presente projeto.

Partindo para o foco principal do estudo, que foi estudar a musculatura esquelética desses animais, tivemos como estratégia avaliar as alterações musculoesqueléticas induzidas pelo infarto do miocárdio e o efeito do treinamento

físico aeróbico nestas variáveis tanto no músculo plantar quanto no músculo sóleo, como justificado no tópico anterior.

Os resultados encontrados também serão apresentados em dois tópicos, sendo o primeiro tópico relacionado às respostas observadas no músculo plantar e o segundo tópico relacionado às respostas observadas no músculo sóleo.

5.2.1. Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e ao treinamento físico aeróbico

Considerando a segunda hipótese deste estudo e baseando-se nos resultados apresentados no Tópico 5.1, o primeiro passo foi investigar se o treinamento físico aeróbico promoveria alterações na expressão de RNAm dos constituintes das NADPH oxidase e na atividade deste complexo enzimático.

Como podemos observar na FIGURA 18, os animais Infartados Sedentários não apresentaram alterações nas expressões de RNAm dos homólogos Nox1 (FIGURA 18A) e Nox4 (FIGURA 18C) e das subunidades p47phox (FIGURA 18D) e p22phox (FIGURA 18E) no músculo plantar quando comparados ao grupo Sham Sedentários. No entanto, foi observado um aumento significativo da expressão de RNAm de Nox 2 (FIGURA 18B) no músculo plantar dos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários. O treinamento físico aeróbico não alterou a expressão de RNAm de Nox1, p47phox e p22phox entre os grupos (FIGURA 18A, D e E), porém os animais Infartados Treinados apresentaram uma prevenção parcial do aumento da expressão de RNAm de Nox2 observado nos animais Infartados Sedentários (FIGURA 18B), apresentando valores similares aos animais Sham Sedentários. Além disso, o treinamento físico aeróbico aumentou a expressão de RNAm de Nox4 tanto nos animais Sham Treinados quanto nos animais Infartados Treinados quando comparados aos animais Sham Sedentários e Infartados Sedentários (FIGURA 18C).

PLANTAR

FIGURA 18. Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Além da expressão de RNAm de Nox1, Nox2 e Nox4, e das subunidades p47phox e p22phox, também foi avaliada a atividade da NADPH oxidase pela oxidação da sonda DHE e pela oxidação da sonda Amplex Red nos músculos plantares dos animais estudados.

Acompanhando o aumento da expressão de RNAm de Nox2, foi observado aumento significativo da atividade da NADPH oxidase com a sonda DHE no músculo plantar dos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham

Sedentários (FIGURA 19A), ao passo que a atividade da NADPH oxidase avaliada com a sonda Amplex Red foi similar entre os grupos (FIGURA 19B).

O treinamento físico aeróbico não alterou a atividade na NADPH oxidase tanto nos animais Sham Treinados quanto nos animais Infartados Treinados quando avaliada pela oxidação de Amplex Red (FIGURA 19B). No entanto, o treinamento físico aeróbico, assim como observado com o tratamento com apocinina, foi eficaz em prevenir o aumento da atividade da NADPH oxidase observada no músculo plantar dos animais Infartados Sedentários quando utilizada a sonda DHE (FIGURA 19A), demonstrando o efeito do treinamento físico aeróbico em prevenir o aumento da ativação da NADPH oxidase induzido pelo infarto do miocárdio.

FIGURA 19. Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Como podemos observar na FIGURA 20A e 20B, o aumento da expressão de Nox2 e da atividade da NADPH oxidase no músculo plantar dos ratos Infartados Sedentários foi acompanhado por um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE nos cortes histológicos destes músculos quando comparados aos animais Sham Sedentários. Além disso, foi observado maior concentração de hidroperóxidos

lipídicos no músculo plantar dos ratos Infartados Sedentários comparados aos ratos Sham Sedentários (FIGURA 20C).

O treinamento físico aeróbico não alterou os níveis de produtos da oxidação da DHE nos animais Sham Treinados, porém foi eficaz em diminuir significativamente esses níveis nos animais Infartados Treinados quando comparados aos animais Infartados Sedentários, ao passo que foi observada uma correlação positiva e significativa entre a atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação de DHE quando avaliados o efeito do infarto e do treinamento físico aeróbico (os quatro grupos) nestas variáveis (FIGURA 20D). Além disso, assim como no tratamento com apocinina, o treinamento físico aeróbico promoveu uma atenuação parcial da concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo plantar dos ratos Infartados Treinados, uma vez que seus valores deixaram de ser estatisticamente diferentes dos ratos Sham Sedentários (FIGURA 20C).

Esses dados sugerem que o infarto do miocárdio promoveu um desequilíbrio redox no músculo plantar, e que o treinamento físico aeróbico restaurou este equilíbrio com uma importante participação do seu efeito em inibir a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase induzida pelo infarto.

PLANTAR

FIGURA 20. Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, níveis de hidroperóxidos lipídicos (C), e correlação entre atividade da NADPH oxidase e os níveis de produtos de oxidação da DHE (D) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante, podemos observar na FIGURA 21 que os animais Infartados Sedentários apresentaram menor atividade da enzima SOD (A) quando comparados aos animais Sham Sedentários, não promovendo alterações na atividade da catalase (B) e nos níveis de glutathione (C). O treinamento físico aeróbico, diferente do observado com o tratamento com apocinina, preveniu nos animais Infartados Treinados a queda da atividade da SOD que tinha sido observada nos animais Infartados Sedentários (FIGURA 21A). No entanto, o treinamento físico aeróbico não alterou a atividade da catalase (Figura 21B) e a concentração de glutathione (Figura 21C) no músculo plantar de ambos Sham Treinados e Infartados Treinados.

FIGURA 21. Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathione (C) no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários.

Como demonstrado na FIGURA 22, apesar de os animais Infartados Sedentários não apresentarem alteração na expressão de RNAm de MuRF (B) e da subunidade C2 do proteassoma (D), observa-se aumento tanto das expressões de RNAm de Atrogin (A) e da subunidade C5 (C) quanto da atividade do proteassoma

(E) nos plantares desses animais quando comparados ao grupo Sham Sedentários, demonstrando a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio.

Os animais Infartados Treinados apresentaram valores significativamente menores na expressão de RNAm de Atrogin (FIGURA 22A) no músculo plantar quando comparados aos ratos Infartados Sedentários, prevenindo parcialmente também o aumento da expressão de RNAm da subunidade C5 do proteassoma (FIGURA 22C) e o aumento da atividade do proteassoma (FIGURA 22E) observados nos plantares dos animais Infartados Sedentários.

Esses dados sugerem que o treinamento físico aeróbico previne a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio no músculo plantar, o qual parece estar relacionado com uma prevenção da hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase.

PLANTAR

FIGURA 22. Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S no músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * p<0,05 vs. Sham Sedentários; # p<0,05 vs. Infartados Sedentários.

Essa hiperativação do SUP, associada com a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase, foi acompanhada por uma menor massa do músculo plantar (FIGURA 23A e 23B) e menor área de secção transversa das fibras do tipo I (FIGURA 23C) e do tipo II (FIGURA 23D) desses músculos observada nos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários, ao passo que o treinamento físico aeróbico, além de diminuir a hiperativação da

NADPH oxidase e do SUP nos animais Infartados Treinados, também foi eficaz em prevenir tanto a perda de massa absoluta e relativa do músculo plantar, quanto a menor área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II observada nos animais Infartados Sedentários em relação aos animais Sham Sedentários (FIGURA 23A-D).

Esses dados demonstram que o treinamento físico aeróbico previne a atrofia do músculo plantar de ratos infartados, prevenindo a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio.

FIGURA 23. Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p<0,05$ vs. Sham Sedentários.

A expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo plantar não foi alterada nem pelo infarto do miocárdio e nem pelo treinamento físico aeróbico (FIGURA 24).

FIGURA 24. Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo plantar dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.

5.2.2. Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e ao treinamento físico aeróbico

Neste tópico, serão apresentados os resultados obtidos no músculo sóleo, onde tivemos o intuito de comparar as respostas deste músculo com os resultados encontrados no músculo plantar.

Como podemos observar na FIGURA 25, os animais Infartados Sedentários não apresentaram alterações nas expressões de RNAm dos homólogos Nox1 (FIGURA 25A) e Nox4 (FIGURA 25C) e da subunidade p22phox (FIGURA 25E) no músculo sóleo quando comparados ao grupo Sham Sedentários. No entanto, assim como no plantar, foi observado um aumento significativo da expressão de RNAm de Nox 2 (FIGURA 25B), porém uma diminuição significativa da expressão de RNAm da subunidade p47phox (FIGURA 25D) no músculo sóleo dos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários.

O treinamento físico aeróbico não alterou a expressão de RNAm de Nox1, Nox4 e p22phox entre os grupos no músculo sóleo, porém os animais Infartados Treinados apresentaram menor expressão de RNAm de Nox2 (Figura 25B) e maior expressão de RNAm de p47phox (FIGURA 25D) neste músculo quando comparados aos animais Infartados Sedentários, retornando estes valores para os encontrados nos animais Sham Sedentários. O treinamento físico aeróbico não promoveu alterações nesses genes nos animais Sham treinados (FIGURA 25A-E), diferente do observado no músculo plantar.

Estes resultados demonstram a resposta diversificada dos dois músculos na expressão de RNAm dos componentes do complexo enzimático NADPH oxidase tanto ao infarto do miocárdio quanto ao treinamento físico aeróbico.

SÓLEO

FIGURA 25. Expressão de RNA mensageiro dos homólogos Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) e das subunidades p47phox (D) e p22phox (E) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Quando avaliamos a atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários e Infartados Sedentários tanto com a sonda DHE (FIGURA 26A) quanto com a sonda Amplex Red (FIGURA 26B), não observamos diferenças entre os dois grupos nestas variáveis.

O treinamento físico aeróbico não alterou a atividade desse complexo enzimático tanto nos animais Sham Treinados quanto nos animais Infartados Treinados quando avaliada pelas duas sondas utilizadas (FIGURA 26A e 26B).

SÓLEO

FIGURA 26. Atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE, mais específica para ânions superóxido (A), e pela oxidação da sonda Amplex Red, mais específica para peróxido de hidrogênio (B), no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Como podemos observar na FIGURA 27A e 27B, apesar de não ser observada alteração na atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo dos ratos Infartados Sedentários, foi observado um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE nos cortes histológicos destes músculos quando comparados aos animais Sham Sedentários. Além disso, ao contrário do plantar, não foi observada alteração na concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo dos ratos Infartados Sedentários comparados aos ratos Sham Sedentários (FIGURA 27C).

O treinamento físico aeróbico não alterou os níveis de produtos da oxidação da DHE nos sóleos dos animais Sham Treinados, porém, assim como no músculo plantar, foi eficaz em diminuir significativamente esses níveis nos animais Infartados Treinados quando comparados aos animais Infartados Sedentários, atingindo valores semelhantes aos ratos Sham Sedentários, sugerindo que o treinamento físico possa também estar modulando outras vias de regulação redox no músculo sóleo (FIGURA 27A e 27B).

Diferente do plantar, o treinamento físico aeróbico não alterou os níveis de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo dos ratos Infartados Treinados, uma vez que os animais Infartados Sedentários não aumentaram seus valores em relação aos ratos Sham Sedentários (FIGURA 27C).

SÓLEO

A

B

C

FIGURA 27. Imagens representativas (A) e quantificação da intensidade de fluorescência (B) dos produtos de oxidação da DHE, e níveis de hidroperóxidos lipídicos (C) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante, podemos observar na FIGURA 28 que, similar ao observado no músculo plantar, os animais Infartados Sedentários apresentaram menor atividade da enzima SOD (A) no músculo sóleo quando comparados aos animais Sham Sedentários, não promovendo alterações na atividade da catalase (B) e nos níveis de glutathione (C). No entanto, assim como observado no plantar, o treinamento físico aeróbico preveniu no músculo sóleo dos animais Infartados Treinados a queda da atividade da SOD (FIGURA 28A) observada nos animais Infartados Sedentários, não promovendo alterações na atividade da catalase (FIGURA 28B) e nos níveis de glutathione (FIGURA 28C).

Esse efeito do treinamento físico aeróbico de prevenir a queda da atividade da SOD no músculo sóleo dos animais Infartados Treinados pode ter contribuído para o menor nível de produtos da oxidação da DHE desse grupo quando comparado aos animais Infartados Sedentários.

FIGURA 28. Atividade das enzimas SOD (A) e catalase (B), e concentração de glutathiona (C) no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Avaliando também no músculo sóleo dos animais estudados a expressão de RNAm dos componentes do SUP, diferente do que observamos no plantar, não foi observada alteração na expressão de RNAm de Atrogin, MuRF, subunidade C5 e subunidade C2 do proteassoma (FIGURA 29A-D) nos animais Infartados

Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários. No entanto, assim como no plantar, o infarto do miocárdio aumentou a atividade do proteassoma no músculo sóleo dos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários (FIGURA 29E), independente de alteração na atividade da NADPH oxidase, porém associada ao aumento nos níveis de produtos da oxidação da DHE.

Em relação ao treinamento físico aeróbico, observamos que os animais Infartados Treinados apresentaram valores significativamente menores na expressão de RNAm de MuRF (FIGURA 29C) no músculo sóleo quando comparados aos ratos Sham Sedentários, porém, assim como no plantar, observou-se uma prevenção do aumento da atividade do proteassoma no sóleo dos animais Infartados Treinados, sem este valor significativamente menor do que os observados nos animais Infartados Sedentários (FIGURA 29E).

FIGURA 29. Expressão de RNA mensageiro dos atrogenes Atrogin (A) e MuRF (B), das subunidades catalítica C5 (C) e reguladora C2 (D), e atividade do proteassoma no sítio quimi tripsina da porção 20S no músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

Esse aumento na atividade do proteassoma, apesar de não estar associada com a uma aumento da atividade da NADPH oxidase, foi associada ao aumento nos produtos da oxidação da DHE e foi acompanhada por uma menor massa do músculo sóleo (FIGURA 30A e 30B) e menor área de secção transversa das fibras do tipo I (FIGURA 30C) e do tipo II (FIGURA 30D) desses músculos observada nos animais Infartados Sedentários quando comparados aos animais Sham Sedentários,

demonstrando também a atrofia do músculo sóleo induzida pelo infarto do miocárdio, como observada no músculo plantar.

O treinamento físico aeróbico, além de prevenir o aumento do proteossoma nos sóleos dos animais Infartados Treinados, também foi eficaz em prevenir tanto a perda de massa absoluta e relativa do músculo sóleo, quanto prevenir parcialmente a menor área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II observada nos animais Infartados Sedentários em relação aos animais Sham Sedentários (FIGURA 30A-D).

Esses dados demonstram que o treinamento físico aeróbico, assim como no músculo plantar, previne a atrofia do músculo sóleo de ratos infartados, prevenindo o maior nível de espécies reativas de oxigênio e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio, porém sem alterar a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase, diferente do observado no plantar.

FIGURA 30. Massa absoluta (A), massa corrigida pelo comprimento da tíbia (B) e área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (C) e do tipo II (D) do músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan.* $p < 0,05$ vs. Sham Sedentários; # $p < 0,05$ vs. Infartados Sedentários.

A expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo não foi diferente entre os quatro grupos estudados (FIGURA 31).

FIGURA 31. Expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo sóleo dos animais Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foi realizado ANOVA de dois fatores.

O QUADRO 2 ilustra os principais resultados relacionados à segunda hipótese do estudo.

QUADRO 2: Resumo dos principais resultados relacionados à segunda hipótese do estudo.

Características Morfofuncionais						
Variáveis	Sham Treinados		Infartados Sed		Infartados Treinados	
Fração de encurtamento	↔		↓		↓ ↔	
Massa cardíaca	↔		↑		↑ ↔	
Distância percorrida e VO ₂ max	↑↑		↔		↑↑	
Respostas musculoesqueléticas ao infarto do miocárdio e ao tratamento com apocinina						
Variáveis	Plantar			Sóleo		
	Sham Treinados	Infartados Sedentários	Infartados Treinados	Sham Treinados	Infartados Sedentários	Infartados Treinados
Atividade da citrato sintase	↑↑	↓	↔ ↑	↑↑	↓	↔ ↑
Expressão de RNAm - Nox1	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - Nox2	↔	↑	↔ ↓	↔	↑	↔ ↓
Expressão de RNAm - Nox4	↑↑	↔	↑↑	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - p47phox	↔	↔	↔ ↔	↔	↓	↔ ↑
Expressão de RNAm - p22phox	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Atividade NADPH oxidase -DHE	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Atividade NADPH oxidase - AR	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Produtos da oxidação de DHE	↔	↑	↔ ↓	↔	↑	↔ ↓
Hidroperóxidos lipídicos	↔	↑	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Atividade da SOD	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↑
Atividade da Catalase	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Níveis totais de Glutaciona	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - Atrogin	↔	↑	↔ ↓	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - MuRF	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↓ ↔
Expressão de RNAm - sub. C5	↔	↑	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Expressão de RNAm - sub. C2	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
Atividade do proteassoma	↔	↑	↔ ↓	↑	↑	↔ ↓
Massa muscular	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↑
AST fibras do tipo I	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔
AST fibras do tipo II	↔	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔
Expressão proteica de NFκB	↔	↔	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔

↔ sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição, vs. Sham Sedentários

↔ sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição, vs. Infartados Sedentários

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram pela primeira vez a participação do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular esquelética induzida pelo infarto do miocárdio em ratos, e o efeito do treinamento físico aeróbico na redução da ativação desse complexo enzimático e prevenção da atrofia muscular esquelética pós infarto.

Confirmando a primeira hipótese do estudo, comprovou-se que o infarto do miocárdio em ratos promove atrofia do músculo plantar (glicolítico) desencadeada em parte por uma maior ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, promovendo uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e consequente hiperativação do sistema ubiquitina proteassoma. Além disso, também foi demonstrado que o infarto do miocárdio promove atrofia do músculo sóleo (oxidativo), a qual também está associada a um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e da atividade do proteassoma, porém não está associada a um aumento da atividade da NADPH oxidase.

Em relação à segunda hipótese do estudo, comprovou-se que o treinamento físico aeróbico previne parcialmente a atrofia do músculo plantar de ratos infartados, prevenindo a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio. Além disso, o treinamento físico aeróbico, assim como no músculo plantar, previne a atrofia do músculo sóleo dos ratos infartados, prevenindo o maior nível de espécies reativas de oxigênio e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio, porém sem alterar a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase.

Da mesma forma em que os resultados foram apresentados no Tópico 5, a discussão dos dados será apresentada em dois subtópicos, de acordo com as hipóteses descritas acima. Esses tópicos serão: 6.1. NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio; e 6.2. Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio.

6.1. NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio

Neste tópico serão discutidos os resultados dos grupos Sham (-) apocinina, Sham (+) apocinina, Infartados (-) apocinina e Infartados (+) apocinina, apresentados no tópico 5.1.

6.1.1. Caracterização morfofuncional do modelo de infarto do miocárdio

O modelo de infarto do miocárdio foi escolhido neste estudo pois, dentre as etiologias da insuficiência cardíaca, a etiologia isquêmica é a mais prevalente em países desenvolvidos ocidentais e no Brasil (BOCCHI et al., 2009; LINDENFELD et al., 2010). Além disso, há décadas o modelo de infarto do miocárdio em ratos tem sido utilizado para mimetizar as alterações cardiovasculares observadas em eventos isquêmicos prolongados (FISHBEIN, MACLEAN e MAROKO, 1978), na tentativa de melhor entender as alterações ocorridas e desenvolver terapias eficazes contra os prejuízos cardiovasculares e sistêmicos desencadeados pela lesão cardíaca.

Como demonstrado nos Resultados, na avaliação ecocardiográfica realizada doze semanas após as cirurgias, foi observado que o infarto do miocárdio promoveu um importante prejuízo (36%) na função contrátil cardíaca dos animais, demonstrando a eficácia da cirurgia em promover a disfunção ventricular esquerda. Além disso, os animais infartados apresentaram aumento do diâmetro ventricular ao final da sístole e aumento da massa cardíaca corrigida pela massa corporal, caracterizando o remodelamento cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio. Esses resultados de disfunção e remodelamento cardíacos corroboram os dados reportados em trabalhos anteriores com o mesmo modelo de infarto do miocárdio em ratos (TRUEBLOOD et al., 2005; RONDON et al., 2006).

O tratamento com apocinina por oito semanas não promoveu alterações no fenótipo cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio, permanecendo assim a disfunção e remodelamento cardíacos nos animais infartados tratados com apocinina. Além disso, a apocinina também não alterou a função e estrutura cardíacas nos animais Sham.

Alguns estudos já observaram efeitos importantes da inibição da NADPH oxidase com apocinina na prevenção da disfunção e remodelamento cardíacos após infarto do miocárdio em modelos animais (MATSUSHIMA et al., 2009; LIU et al., 2010), sendo que estes estudos iniciaram o tratamento com esta substância imediatamente após os procedimentos cirúrgicos. No entanto, o uso de apocinina com início após o desenvolvimento da disfunção e remodelamento cardíaco, como realizado no presente estudo, ainda não foi reportado. Com estes dados da literatura e os resultados aqui apresentados, sugere-se que a apocinina possa exercer efeito preventivo, mas não de restauração, na disfunção e remodelamento cardíacos após infarto em modelos animais. Como esse não foi o objetivo principal deste estudo, mais estudos serão necessários para compreender os efeitos do uso de apocinina sobre a função e remodelamento cardíacos.

Além da disfunção e remodelamento cardíacos, outro marcador clássico observado em pacientes com IC é a intolerância à realização de esforços físicos e o menor consumo máximo de oxigênio. Como demonstrado nos Resultados, não observamos diferenças entre os grupos Sham e Infartados tanto na distância total percorrida no teste até a exaustão quanto no VO_2max no final do desenho experimental. No entanto, uma intolerância ao esforço físico induzida pelo infarto do miocárdio havia sido observada quatro semanas após as cirurgias, momento em que estratificamos os animais nos diferentes grupos experimentais. Esse efeito bifásico do curso temporal da tolerância ao esforço após infarto do miocárdio já foi observado anteriormente (TRUEBLOOD et al., 2005), onde os autores demonstraram uma queda imediata da capacidade de exercício físico seguida de uma fase de recuperação associada com uma hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio em ratos. Em seguida, foi observada uma queda progressiva da tolerância ao esforço físico que ocorreu independente de alterações na estrutura e função contrátil do ventrículo esquerdo. Além disso, esse efeito bifásico observado em ratos infartados parece estar diretamente relacionado com o tamanho do infarto gerado (BECH et al., 1989), sendo mais caracterizado em infartos de tamanhos médios, o qual foi observado em nossos ratos (~30% de área infartada).

Em relação ao tratamento com apocinina, este não foi capaz de promover alterações entre os grupos tanto na distância total percorrida em teste incremental

até a exaustão quanto no consumo máximo de oxigênio, sugerindo que a NADPH oxidase não está associada à capacidade funcional dos ratos, apesar de um estudo demonstrar que o tratamento com apocinina (10mM na água de beber) concomitante com infusão Ang II por sete dias em camundongos preveniu a intolerância ao esforço físico gerada pela administração isolada da Ang II, prevenindo o prejuízo na respiração mitocondrial e a queda na atividade dos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons promovidos pelo tratamento com Ang II (YOKOTA et al., 2009). No entanto, o tratamento com apocinina não alterou a tolerância ao esforço dos animais que não foram tratados com apocinina, assim como observado no nosso estudo, onde não foi observado alteração no desempenho no teste até a exaustão realizado pelos animais.

Quanto à massa corporal dos animais, apesar de todos os grupos apresentarem valores similares desta variável no início dos experimentos (antes dos procedimentos cirúrgicos) e de todos os ratos ganharem massa durante o protocolo experimental, comportamento esse característico da fase de maturação corporal em que se encontram, os animais infartados apresentaram menor ganho de massa corporal durante o período estudado. Este é um achado muito interessante já que a perda de massa corporal é um dos índices utilizados para caracterizar a caquexia cardíaca, que é um preditor independente de mortalidade em pacientes com IC (ANKER et al., 1997). Apesar de o tratamento com apocinina não alterar a função contrátil cardíaca, a massa cardíaca e a tolerância ao esforço físico, esta intervenção foi eficaz em prevenir parcialmente o menor ganho de massa corporal induzido pelo infarto do miocárdio.

Esses resultados de caracterização morfofuncional confirmaram o fenótipo geralmente observado no modelo de infarto do miocárdio em ratos, e nos deram segurança para continuar o estudo e investigar se esse modelo promoveria as alterações musculoesqueléticas que seriam investigadas no projeto.

Partindo para o objetivo principal do estudo, que foi estudar a musculatura esquelética desses animais, como mencionado nos tópicos anteriores, tivemos como estratégia avaliar as alterações musculoesqueléticas induzidas pelo infarto do miocárdio e o efeito da inibição da NADPH oxidase em dois músculos com

características distintas do ponto de vista estrutural, contrátil e metabólico, bem como no aspecto pró e antioxidante.

A discussão dos resultados encontrados será apresentada em dois subtópicos, sendo o primeiro subtópico relacionado às respostas observadas no músculo plantar e o segundo subtópico relacionado às respostas observadas no músculo sóleo.

6.1.2. Respostas do músculo plantar ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase

Considerando a primeira hipótese deste estudo, o primeiro passo do projeto foi investigar se as NADPH oxidases estavam hiperativadas na musculatura esquelética dos ratos submetidos ao infarto do miocárdio, e caso estivessem, investigar se o tratamento com apocinina seria eficaz em inibir este complexo enzimático.

Confirmando nossa hipótese, apesar do infarto do miocárdio não promover alterações no RNAm das subunidades Nox1, Nox4, p47phox e p22phox do complexo enzimático NADPH oxidase no tempo avaliado, os animais infartados apresentaram aumento do RNAm da subunidade Nox2 no músculo plantar, o qual foi acompanhado por uma aumento na atividade da NADPH oxidase avaliada pela oxidação da sonda DHE. Estas respostas sugerem que o complexo enzimático NADPH oxidase está aumentado no músculo plantar dos animais infartados, onde o homólogo Nox2 parece ser o responsável por este aumento da atividade, uma vez que sua expressão de RNAm está aumentada e a maior atividade do complexo enzimático observada parece ser mais específica para a produção de ânions superóxido, principal produto da Nox2 (BROWN e GRIENDLING, 2009).

Um único estudo publicado em 2011 também demonstrou que a atividade da NADPH oxidase estava aumentada na musculatura esquelética de camundongos com IC induzida por infarto do miocárdio (OHTA et al., 2011). No entanto, esta atividade foi avaliada no lisado total, e não na fração enriquecida de membrana como em nosso estudo. Além disso, as enzimas Nox envolvidas neste aumento da atividade observado não foram investigadas. Assim, o presente projeto é o primeiro

a demonstrar um aumento da atividade da NADPH oxidase induzida por infarto do miocárdio em ratos, e associada à maior expressão de RNAm de Nox2.

Apesar de não ter sido avaliado neste estudo, acredita-se que este aumento na atividade da NADPH oxidase e na expressão de RNAm de Nox2 seja decorrente de aumento nos níveis circulantes e locais de citocinas pró-inflamatórias, AngII e catecolaminas, os quais já foram demonstrados estar aumentados tanto em modelos experimentais (SCHULZE et al., 2003; BACURAU et al., 2009) quanto em pacientes com IC (GIELEN et al., 2003; LINKE et al., 2005). No entanto, pretendemos avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias e Ang II no músculo destes animais para o manuscrito a ser submetido a publicação referente a este estudo.

Como proposto no presente projeto, o tratamento com apocinina foi efetivo em prevenir o aumento da atividade da NADPH oxidase observado no músculo plantar dos animais Infartados, nos possibilitando assim avaliar a participação desse complexo enzimático no fenótipo muscular induzido pelo infarto do miocárdio.

Apesar de a apocinina apresentar algumas particularidades quanto a sua especificidade, sua ação antioxidante e a sua dependência ou não de peroxidases (WILLIAMS e GRIENDLING, 2007; HEUMULLER et al., 2008; SIMONYI et al., 2012), esta tem sido o composto de escolha da grande maioria dos trabalhos que objetivam avaliar o envolvimento do sistema NADPH oxidase em modelos experimentais *in vivo*, já que pode ser administrada oralmente e sem apresentar toxicidade em doses já suficientes para inibir esse complexo enzimático (BEDARD e KRAUSE, 2007; WILLIAMS e GRIENDLING, 2007; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008), como também observado no presente estudo. No entanto, o seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido. Sabe-se que a apocinina inibe a formação do complexo enzimático, interferindo na interação entre p47phx e p22phox (BEDARD e KRAUSE, 2007; WILLIAMS e GRIENDLING, 2007; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a apocinina também diminui tanto a translocação de p47phox para a membrana quanto a sua expressão proteica (BARBIERI et al., 2004).

No presente projeto, a inibição da atividade da NADPH oxidase observada nos ratos infartados tratados com apocinina não estava associada com uma prevenção do aumento na expressão de RNAm de Nox2, mas sim com uma diminuição nos níveis de RNAm de Nox4 e da subunidade organizadora p47phox, o

que também foi observado nos animais Sham. Esses resultados sugerem que este efeito crônico da apocinina nos animais infartados seja mediado não apenas pela inibição da formação do complexo enzimático mas também por uma redução nos níveis de RNAm de Nox4 e p47phox, ao passo que a redução de Nox1, Nox4 e p47phox observada nos animais Sham tratados com apocinina foi compensada pelo aumento da expressão de Nox2, não alterando assim sua atividade em relação aos ratos Sham não tratados com apocinina.

Acompanhando a hiperativação da NADPH oxidase induzida pelo infarto, observamos um desbalanço redox no músculo plantar dos animais infartados, caracterizado por um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE e por maior concentração de hidroperóxidos lipídicos nesses músculos. Este desbalanço redox induzido pelo infarto do miocárdio teve uma participação importante da NADPH oxidase, uma vez que a sua inibição com apocinina preveniu este desbalanço. No entanto, não podemos descartar a participação de outras vias importantes de geração de espécies reativas de oxigênio, como a mitocôndria (MARIN-GARCIA, GOLDENTHAL e MOE, 2001), e nem descartar uma deficiência no sistema de defesa antioxidante contribuindo para esse desbalanço redox, uma vez que a atividade da SOD estava diminuída no plantar dos ratos infartados.

Alguns estudos do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos já demonstram que, tanto em humanos (LI et al., 2003; LINKE et al., 2005; SHANG e TAYLOR, 2011; CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012) quanto em modelos animais (COIRAULT et al., 2007; BACURAU et al., 2009; OHTA et al., 2011; CUNHA et al., 2012), a IC está associada ao estresse oxidativo na musculatura esquelética. Os dados do presente projeto confirmam estes achados relatados na literatura e demonstram que o complexo enzimático NADPH oxidase contribui para este quadro de estresse oxidativo induzido pela disfunção cardíaca no músculo plantar.

Atualmente já é sabido que as espécies reativas de oxigênio estão associadas, direta ou indiretamente, com uma hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma na musculatura esquelética (KRIEGENBURG et al., 2011), sistema este de fundamental importância na degradação proteica, principalmente em quadros catabólicos, uma vez que o SUP é um sistema responsável por clivar cerca de 90% das proteínas citosólicas na musculatura esquelética (SOLOMON e GOLDBERG, 1996). A literatura relacionada ao tema indica já há algum tempo, que

um aumento leve ou moderado do estresse oxidativo intracelular é capaz de ativar o SUP por aumentar a disponibilidade de substratos a serem degradados (SHANG, GONG e TAYLOR, 1997). De fato, uma maior ativação do SUP na musculatura esquelética de animais e pacientes com IC tem sido observada e associada a um aumento no estresse oxidativo (CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012). Nossos resultados suportam uma possível relação entre o estresse oxidativo e a atividade do SUP, uma vez que demonstramos um aumento da ativação do SUP no músculo plantar dos ratos infartados, caracterizado pelo aumento tanto das expressões de RNAm de Atrogin e da subunidade C5 do proteassoma quanto da atividade do proteassoma.

Esse aumento da ativação do SUP apresentou uma correlação significativa com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio advindas em grande parte pelo aumento da ativação da NADPH oxidase, já que o tratamento com apocinina preveniu parcialmente a ativação do SUP (Figura 7E). De fato, o tratamento com apocinina diminuiu a expressão de RNAm de Atrogin, MuRF e da subunidade C5 do proteassoma no plantar dos animais infartados, e também preveniu parcialmente o aumento da atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S. Esse é o primeiro estudo que demonstra o efeito do tratamento com apocinina no SUP na musculatura esquelética de ratos infartados, e os dados obtidos sugerem que o infarto do miocárdio promove uma hiperativação do SUP no músculo plantar, a qual parece estar relacionada a uma hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase.

Um fato bastante interessante é que essa hiperativação do SUP, associada com a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase, foi acompanhada por uma menor massa do músculo plantar e menor área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo II desses músculos nos ratos infartados, demonstrando a atrofia muscular esquelética induzida pelo infarto do miocárdio, a qual já foi demonstrada por outros trabalhos do nosso grupo (BACURAU et al., 2009; BUENO et al., 2010; CUNHA et al., 2012). Não obstante, o tratamento com apocinina, além de diminuir a hiperativação da NADPH oxidase e do SUP nos animais Infartados, também foi eficaz em prevenir parcialmente essa atrofia do plantar, independente do tipo de fibra muscular, ressaltando a participação do complexo enzimático para a geração

de espécies reativas de oxigênio e indução de atrofia muscular no músculo plantar em ratos com infarto do miocárdio.

Alguns estudos já propuseram que a ativação da NADPH oxidase poderia culminar em atrofia muscular esquelética. Whitehead et al. (2010) (WHITEHEAD et al., 2010) encontraram aumento da expressão de subunidades da NADPH oxidase e aumento da produção de ROS por esse complexo enzimático na musculatura esquelética de camundongos com distrofia muscular (mdx). Além disso, um estudo recente (SEMPRUN-PRIETO et al., 2011) demonstrou que a indução de atrofia muscular esquelética por meio da infusão crônica de Ang II em animais estava diretamente relacionada a um aumento na produção de ROS pela NADPH oxidase, já que a inibição desse complexo com apocinina preveniu o aumento da produção de ROS. Além disso, a atrofia muscular mediada por Ang II foi bastante atenuada em animais que não expressavam p47phox, proteína chave da ativação da NADPH oxidase. No entanto, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar a contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase com a atrofia muscular induzida por infarto do miocárdio.

Um importante candidato responsável por intermediar esta relação entre as espécies reativas do oxigênio geradas pela NADPH oxidase, o SUP e o desenvolvimento e progressão da atrofia muscular em quadros catabólicos é o fator de transcrição redox sensível NF- κ B (LI et al., 1998; WYKE, RUSSELL e TISDALE, 2004; POWERS, KAVAZIS e MCCLUNG, 2007), uma vez que a maior atividade deste fator de transcrição está diretamente envolvida com a degradação proteica de miofibrilos musculares esqueléticos tratados com Ang II, e o tratamento com antioxidantes é capaz de prevenir este aumento de atividade e a degradação dos miofibrilos (RUSSELL, ELEY e TISDALE, 2007).

Não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão proteica de NF- κ B na fração nuclear do músculo plantar dos animais estudados. No entanto, para excluir a participação deste fator de transcrição no fenótipo observado neste projeto, precisamos avaliar sua atividade pelo ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA). Esse experimento está sendo padronizado no laboratório para que os resultados sejam incluídos no manuscrito final a ser submetido a publicação.

6.1.3. Respostas do músculo sóleo ao infarto do miocárdio e à inibição da NADPH oxidase

Neste tópico, serão discutidos os resultados obtidos no músculo sóleo, onde tivemos o intuito de comparar as respostas deste músculo com os resultados encontrados no músculo plantar. Como já descrito anteriormente, o músculo sóleo apresenta características distintas do ponto de vista estrutural, contrátil e metabólico, bem como no aspecto pró e antioxidante, quando comparados ao músculo plantar.

Como pudemos observar nos Resultados, o infarto do miocárdio também promoveu atrofia do músculo sóleo, a qual também foi associada a um aumento da atividade do proteassoma, porém não foi associada a um aumento da atividade da NADPH oxidase, como havia sido observada no plantar, demonstrando que os músculos sóleo e plantar também apresentam respostas distintas em relação a contribuição desse complexo enzimático à disfunção cardíaca. Além disso, esses músculos também apresentam respostas distintas ao tratamento com apocinina.

Como observado no plantar, o infarto do miocárdio também induziu um aumento na expressão de RNAm da Nox2 no músculo sóleo. Porém, esse aumento de Nox2 ocorreu em paralelo a uma menor expressão de RNAm de p47phox nesse músculo, sugerindo que a menor expressão dessa subunidade organizadora tenha compensado o aumento de Nox2, culminando em manutenção da atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo em resposta ao infarto do miocárdio, já que a atividade de Nox2 é dependente de p47phox (BEDARD e KRAUSE, 2007; BROWN e GRIENDLING, 2009).

Sugere-se que essa diferença de resposta entre os músculos na atividade da NADPH oxidase ocorre devido a sua predominância de tipo de fibras musculares, uma vez que foi demonstrado que as fibras do tipo I (predominantes no sóleo) são mais resistentes ao tratamento com agentes inflamatórios (endotoxinas e TNF- α) quando comparadas as fibras do tipo II (predominantes no plantar) (YU et al., 2008), agentes esses conhecidos por ativarem o referido complexo enzimático.

Além disso, sabe-se também que os músculos oxidativos são mais resistentes ao estresse oxidativo quando comparados aos músculos glicolíticos (YU et al., 2008; GENG et al., 2011), o que também já foi observado na IC (GENG et al., 2011), uma

vez que esses músculos apresentam um sistema de defesa antioxidante mais desenvolvido, como pode ser observado no presente projeto (atividade da SOD e catalase, e níveis totais de glutathione). Além disso, essa maior resistência das fibras oxidativas ao estresse oxidativo parece estar relacionada a uma maior síntese de óxido nítrico devido a uma maior expressão das enzimas óxido nítrico sintases (YU et al., 2008; GENG et al., 2011), modulada também por PGC-1 α (GENG et al., 2011). De fato, como demonstrado nos Resultados, apesar de observado um aumento dos níveis de produtos de oxidação da DHE nos cortes histológicos dos animais infartados, não foi observada alteração na concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo desses ratos, a qual estava aumentada no músculo plantar.

É importante destacar que, diferente do plantar, este aumento da oxidação da DHE não parece estar associado à atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo, podendo ser atribuído talvez a alguma outra fonte de produção de ROS nesse músculo, como a mitocôndria, presente em número expressivo nesse tipo de fibra muscular e que também apresenta sua função prejudicada na IC (MARIN-GARCIA, GOLDENTHAL e MOE, 2001). Além disso, a diminuição da atividade da SOD observada no sóleo dos animais infartados também pode ter contribuído para esse aumento dos níveis de superóxido.

De maneira interessante, apesar de a atividade da NADPH oxidase não estar aumentada no sóleo dos animais infartados, o tratamento com apocinina preveniu o aumento dos níveis dos produtos da oxidação da DHE nesses animais, o que foi acompanhado por uma prevenção do aumento da expressão de RNAm de Nox2 e da diminuição da atividade da SOD, e por um aumento da taxa de remoção de peróxido de hidrogênio. Esses dados sugerem que a apocinina possa estar agindo como antioxidante, como discutido acima, e/ou também estar modulando outras vias de regulação redox no músculo sóleo, alvos da NADPH oxidase, como por exemplo, a mitocôndria.

De fato, já é sabido que alguns homólogos da família Nox estão expressos na mitocôndria, modulando inclusive a taxa de produção de ROS dessa organela (GRAHAM et al., 2010; KURODA et al., 2010). Com isso, não podemos descartar a hipótese de que, além do seu efeito antioxidante, a apocinina esteja inibindo a maior

produção de ROS em função da modulação da ativação da NADPH oxidase, diminuindo a geração de ROS por outras fontes. Como avaliamos a atividade da NADPH oxidase na fração enriquecida de membranas, não sabemos se a atividade dessas Noxs mitocondriais está alterada nos animais infartados, uma vez que as mitocôndrias são eliminadas em um dos passos da centrifugação.

Independente de participação da atividade da NADPH oxidase, o aumento dos níveis de produtos da oxidação da DHE, assim como no plantar, foi associado a um aumento da atividade do proteassoma no músculo sóleo dos animais infartados, o qual também foi prevenido pelo tratamento com apocinina. No entanto, este aumento da atividade do proteassoma no sóleo não parece ter sido provocado por um aumento na ubiquitinação de proteínas e nem por um aumento da expressão das subunidades do proteassoma, já que a expressão de RNAm das E3 ligases Atrogin e MuRF e das subunidades C5 e C2 do proteassoma não foram alteradas nesse músculo, diferente do observado no músculo plantar. Essa resposta diferenciada dos músculos oxidativos em relação aos glicolíticos na alteração da expressão de RNAm de atrogenes já foi demonstrada em animais tratados com LPS e TNF- α , e parece ser mediada por uma menor resposta do estresse oxidativo no músculo sóleo (YU et al., 2008). Porém, esse aumento na produção de ROS observada nos sóleos dos animais infartados parece já ter sido suficiente para promover uma ativação direta do proteassoma (KRIEGENBURG et al., 2011), por meio da oxidação de cisteínas específicas presentes em sua estrutura, ao passo que a restauração do balanço redox com o tratamento com apocinina preveniu parcialmente esta possível ativação do proteassoma por oxidação.

Os músculos com predominância glicolítica (brancos), como o plantar, são mais afetados no que se refere à massa muscular em condições que desencadeiam a atrofia, tais como jejum, tratamento com glicocorticoides e doenças sistêmicas (WING e GOLDBERG, 1993; WING, HAAS e GOLDBERG, 1995; PEPATO et al., 1996), quando comparados a músculos oxidativos, como o sóleo, que são mais resistentes ao estímulo atrofico (SHAH et al., 1983; MINNAARD et al., 2005). No entanto, como observado no plantar, o infarto do miocárdio também induziu atrofia do músculo sóleo, caracterizada pela menor massa desse músculo e pela menor área de secção transversa das fibras tipo I e tipo II. E de maneira interessante, o tratamento com apocinina foi eficaz em prevenir parcialmente tanto a perda de

massa do sóleo quanto a menor área de secção transversa das fibras do tipo I e tipo II.

Esses dados demonstram que a atrofia do músculo sóleo induzida pelo infarto do miocárdio, assim como no plantar, está associada a uma maior atividade do proteassoma e a um desbalanço redox, porém, diferente do plantar, não está associada à hiperativação da NADPH oxidase, apesar de a inibição deste complexo enzimático com apocinina prevenir a hiperativação do proteassoma, diminuir os níveis de produtos da oxidação da DHE e prevenir a perda de massa muscular.

Como já discutido acima, esses dados sugerem que a apocinina possa estar modulando a massa do sóleo por meio do seu efeito antioxidante e também por estar modulando outras vias de regulação redox no músculo sóleo, alvos da NADPH oxidase.

Esses dados, em conjunto com os dados do plantar, demonstram pela primeira vez uma relação significativa entre o aumento na produção de ROS e a atrofia muscular esquelética em ratos infartados, onde a NADPH oxidase parece estar mais envolvida com a atrofia dos músculos glicolíticos do que a atrofia dos músculos oxidativos.

Com estes resultados relacionados à primeira hipótese do estudo, comprovou-se que o infarto do miocárdio em ratos promove atrofia do músculo plantar (glicolítico) desencadeada em parte por uma importante participação da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, promovendo uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e consequente hiperativação do sistema ubiquitina proteassoma. Além disso, também foi demonstrado que o infarto do miocárdio promove atrofia do músculo sóleo (oxidativo), a qual também está associada a um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e da atividade do proteassoma, porém não está associada a um aumento da atividade da NADPH oxidase.

6.2. Treinamento físico aeróbico, NADPH oxidase e atrofia muscular esquelética em modelo experimental de infarto do miocárdio

Neste tópico serão discutidos os resultados dos grupos Sham Sedentários, Sham Treinados, Infartados Sedentários e Infartados Treinados, apresentados no tópico 5.2.

6.2.1. Respostas morfofuncionais ao treinamento físico aeróbico

Durante os últimos anos, tem-se acumulado dados convincentes para os benefícios do treinamento físico na IC, demonstrando que o treinamento físico consiste em uma estratégia terapêutica importante para o tratamento da síndrome (BRUM et al., 2011), não somente por promover adaptações importantes no controle neuro-hormonal (NEGRAO et al., 1993; ROVEDA et al., 2003) e na função cardíaca (ERBS et al., 2003), mas também por provocar diferentes adaptações bioquímicas, estruturais e funcionais na musculatura esquelética, melhorando a tolerância aos esforços físicos, a qualidade de vida e o prognóstico desses pacientes (MEDEIROS et al., 2010; PIEPOLI et al., 2011).

Como demonstrado nos Resultados, oito semanas de treinamento físico aeróbico foram eficazes em prevenir parcialmente a disfunção contrátil cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio, porém não promoveram alterações no aumento da massa cardíaca observado nos animais Infartados Sedentários. Estes resultados de preservação da disfunção cardíaca com o treinamento físico em modelos experimentais já é bem consistente na literatura (ROLIM et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009) e, em conjunto com a maior massa cardíaca, nos sugere que houve sobreposição dos perfis patológico e fisiológico do crescimento cardíaco promovidos pelo infarto e treinamento físico, respectivamente. Tal fenômeno foi descrito previamente em animais espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento físico aeróbio, que apresentaram hipertrofia cardíaca ainda mais pronunciada do que os animais hipertensos sedentários, porém demonstraram também importante ganho de função ventricular e ativação de vias moleculares responsáveis pela hipertrofia cardíaca fisiológica nos animais treinados

(GARCIARENA et al., 2009; KOLWICZ et al., 2009), o que também foi demonstrado por nosso grupo em outro modelo de IC (OLIVEIRA et al., 2009).

Além de prevenir a disfunção cardíaca, o treinamento físico aeróbico também promoveu adaptações consideradas clássicas quanto a avaliação da efetividade do protocolo de treinamento utilizado, como aumento da tolerância ao esforço físico, do consumo máximo de oxigênio, e da atividade da enzima citrato sintase nos músculos sóleo e plantar. Esses dados, também demonstrados por nosso grupo em diferentes modelos experimentais de IC (RONDON et al., 2006; BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012) e em pacientes (ANTUNES-CORREA et al., 2012), nos comprova a efetividade do protocolo de treinamento físico aeróbico utilizado no presente projeto.

Vale destacar que, assim como demonstrado anteriormente (BRASSARD et al., 2006), a disfunção cardíaca promoveu prejuízo na atividade da enzima citrato sintase em ambos os músculos estudados, caracterizando a alteração metabólica que também é observada em pacientes com IC (METTAUER et al., 2001).

Esses resultados encontrados demonstraram a efetividade do protocolo de treinamento físico aeróbico aplicado e nos permitiram testar a segunda hipótese do presente estudo.

Seguindo a mesma estrutura do tópico anterior, a discussão dos resultados encontrados será apresentada em dois subtópicos, sendo o primeiro subtópico relacionado às respostas ao treinamento físico observadas no músculo plantar e o segundo subtópico relacionado às respostas ao treinamento físico observadas no músculo sóleo.

6.2.2. Respostas do músculo plantar ao treinamento físico aeróbico

Atualmente já é sabido que o treinamento físico aeróbico promove inúmeras adaptações periféricas em pacientes com IC (SCARPELLI et al., 1999), apresentando melhoras significativas na vasodilatação dependente do endotélio (ADAMOPOULOS et al., 1993; HORNIG, MAIER e DREXLER, 1996) e aumento da densidade capilar, além de aumentar a densidade mitocondrial, a atividade de enzimas oxidativas, e promover adaptações importantes na regulação da massa

muscular dos pacientes, consequentemente contribuindo para a melhora da tolerância ao esforço (HAMBRECHT et al., 1997; MEDEIROS et al., 2010; PIEPOLI et al., 2011). Cabe ressaltar que o treinamento físico aeróbico também é capaz de diminuir o estresse oxidativo e a inflamação no músculo esquelético, diminuindo o nível de oxidação de biomoléculas e prevenindo algumas alterações morfofuncionais tanto em pacientes com IC (GIELEN et al., 2003; LINKE et al., 2005; GIELEN et al., 2012), quanto em modelos animais (NUNES et al., 2008), como também observado em estudos do nosso grupo (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012).

De fato, no presente projeto foi confirmado que o treinamento físico aeróbico diminui o estresse oxidativo na musculatura esquelética de animais submetidos ao infarto do miocárdio, o qual foi caracterizado pelos menores níveis de produtos da oxidação da DHE no músculo plantar e pela prevenção parcial do aumento dos níveis de hidroperóxidos lipídicos que estavam aumentados no plantar dos animais Infartados Sedentários.

Com esses resultados, e considerando a segunda hipótese deste estudo, investigamos se o treinamento físico aeróbico, além de prevenir o estresse oxidativo, promoveria alterações na expressão de RNAm dos constituintes do complexo enzimático NADPH oxidase e na sua atividade.

Confirmando nossa hipótese inicial, o treinamento físico aeróbico foi efetivo em prevenir o aumento da atividade da NADPH oxidase observado no músculo plantar dos animais Infartados, o que foi associado com uma menor expressão de RNAm de Nox2 nos animais Infartados Treinados. Acredita-se que essa menor atividade do complexo enzimático promovida pelo treinamento físico, associada à prevenção da menor atividade da SOD observada nos animais Infartados Treinados, tenha uma importante contribuição na restauração do balanço redox promovida pelo treinamento físico nos animais infartados, uma vez que encontramos uma correlação positiva e significativa entre a atividade da NADPH oxidase e a intensidade de fluorescência da oxidação da DHE.

Sugere-se que um dos mecanismos envolvidos nesta atenuação da ativação da NADPH oxidase com o treinamento físico aeróbico seria o fato desta intervenção não farmacológica ser capaz de diminuir os níveis de importantes agentes ativadores deste complexo enzimático, como citocinas pró-inflamatórias, Ang II e catecolaminas, o que já é bem estabelecido na literatura em doenças

cardiovasculares (GIELEN et al., 2003; BRUM et al., 2006; NEGRAO e MIDDLEKAUFF, 2008; BACURAU et al., 2009).

Um fato que nos chamou a atenção foi o aumento da expressão de RNAm de Nox4 em ambos os grupos treinados, a qual é uma Nox envolvida na produção de peróxido de hidrogênio, importante mensageiro sinalizador (STONE e YANG, 2006). Estudos recentes tem demonstrado que a Nox4 apresenta um importante papel protetor na vasculatura durante estresse isquêmico e inflamatório (SCHRODER et al., 2012). Além disso, alguns estudos começaram a demonstrar que a Nox4 também está envolvida com a angiogênese na musculatura esquelética, inclusive em resposta ao treinamento físico (SCHRODER et al., 2012). No entanto, pouco se sabe ainda em relação ao papel da Nox4 na musculatura esquelética, e este aumento de expressão de RNAm com o treinamento físico precisa ser mais bem investigado.

Ainda existem poucos estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico na expressão e atividade da NADPH oxidase, sendo que estes estudos avaliaram esta relação em vasos sanguíneos (ZANCHI et al., 2008), tecido adiposo (SAKURAI et al., 2009), medula espinhal (GAO et al., 2007), cérebro (AGARWAL et al., 2011) e coração (BAI et al., 2009). No entanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar a relação entre o treinamento físico aeróbico e a expressão e atividade do complexo enzimático NADPH oxidase na musculatura esquelética de ratos infartados.

Um resultado bastante interessante foi que o treinamento físico diminuiu a atividade da NADPH oxidase e o estresse oxidativo no músculo plantar, e este efeito foi associado a prevenção da hiperativação do SUP e da atrofia desse músculo.

Gielen et al (GIELEN et al., 2012) demonstraram em um estudo bem recente que o treinamento físico aeróbico diminuía a expressão de MuRF na musculatura esquelética de pacientes com IC. Além disso, nosso grupo recentemente publicou um estudo com modelo experimental de IC demonstrando que essa prevenção da hiperativação do SUP com o treinamento físico aeróbico, caracterizada pela diminuição da atividade do proteassoma e da expressão das E3 ligases Atrogin, MuRF e E3- α , e da atrofia muscular, estava associada com um menor nível de estresse oxidativo, corroborando os dados do presente estudo. No entanto, nosso trabalho acrescenta à literatura referente ao tema, que esse efeito preventivo do treinamento físico no estresse oxidativo, SUP e atrofia está também associado com

uma menor ativação do complexo enzimático na musculatura esquelética desencadeada pela disfunção cardíaca.

Contudo, não podemos descartar a hipótese de que outras vias de regulação redox possam estar sendo moduladas pelo treinamento físico em nosso modelo, uma vez que o treinamento físico é capaz de melhorar tanto a função e biogênese mitocondrial (HOLLOSZY, 2008; SILVA et al., 2009) quanto melhorar o sistema de defesa antioxidante (ENNEZAT et al., 2001; LINKE et al., 2005). Além disso, outros mecanismos independentes de modulação redox também podem estar associados com essa prevenção da atrofia do muscular com o treinamento físico observada nos animais infartados, como a melhora da perfusão tecidual, causada pela melhora da função cardíaca, função endotelial e capilarização (ADAMOPOULOS et al., 1993; HORNIG, MAIER e DREXLER, 1996; BACURAU et al., 2009), e uma maior ativação de vias envolvidas com a síntese proteica mediada pelo estímulo mecânico do exercício (SHEFER e BENAYAHU, 2012).

6.2.3. Respostas do músculo sóleo ao treinamento físico aeróbico

Há tempos já é sabido que os diferentes músculos esqueléticos respondem de maneira diferente ao mesmo protocolo de treinamento físico (FULLER, BALDWIN e FULLER, 2006). Isso também é uma verdade para os músculos avaliados no presente estudo (sóleo e plantar) (FULLER, BALDWIN e FULLER, 2006; FERREIRA et al., 2010), apesar de ambos serem ativados durante a corrida em esteira rolante (BONEN et al., 1990). No presente projeto, também observamos respostas diferenciadas dos músculos plantar e sóleo ao treinamento físico aeróbico realizado pelos ratos infartados na ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, nos marcadores de estresse oxidativo e na ativação do SUP.

Assim como no músculo plantar, o treinamento físico aeróbico preveniu o aumento da expressão de RNAm de Nox2 no sóleo dos animais infartados, porém apresentou uma resposta compensatória ao restaurar a menor expressão de RNAm de p47phox observada nos animais infartados, não alterando assim a atividade da NADPH oxidase. Com isso, acreditamos que o treinamento físico aeróbico previne o aumento da ativação da NADPH oxidase induzida pela disfunção cardíaca, como

observamos no plantar, não apresentando, no entanto, alterações em sua atividade quando este complexo enzimático se encontra em condições funcionais normais, como observamos no sóleo.

Um fato interessante é que a expressão de RNAm de Nox4 não foi alterada no músculo sóleo em resposta ao treinamento físico aeróbico, sendo aumentada apenas no músculo plantar de ambos os grupos treinados. Um dos possíveis mecanismos que talvez possa contribuir para essa maior expressão de Nox4 deve-se ao fato de o treinamento físico aumentar o número de mitocôndrias musculares (BORI et al., 2012), local este em que a Nox4 também é expressa (GRAHAM et al., 2010; KURODA et al., 2010). Como o músculo plantar apresenta uma quantidade muito menor de mitocôndrias quando comparado ao sóleo, sugerimos que um pequeno aumento no número de mitocôndrias nesse músculo, e consequentemente Nox4, já seria suficiente para apresentar diferenças detectáveis nos valores relativos (%) da expressão de RNAm de Nox4, ao passo que o mesmo aumento no número destas organelas representaria um percentual muito pequeno devido à grande quantidade de mitocôndrias já presentes. No entanto, esta justificativa é apenas uma especulação, e como já relatado no tópico anterior, esta resposta observada no músculo plantar precisa ser mais bem investigada.

Independente de promover alteração na atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo, o treinamento físico aeróbico, assim como no plantar, foi capaz de diminuir os níveis de produtos da oxidação da DHE, prevenir o aumento da atividade do proteassoma e prevenir parcialmente a atrofia desse músculo nos ratos infartados. Essa prevenção do estresse oxidativo com o treinamento físico também foi acompanhada por um aumento da atividade da SOD, como observado no plantar, porém a menor atividade do proteassoma no sóleo dos ratos Infartados Treinados, diferente do plantar, não parece ter sido mediada por uma menor ubiquitinação de proteínas, mas sim apenas pela restauração do balanço redox e menor oxidação do proteassoma.

Uma outra resposta diferenciada entre os músculos sóleo e plantar ao treinamento físico aeróbico foi o aumento da atividade do proteassoma observado no músculo sóleo dos animais Sham, o qual porém não foi associado com alteração na massa desse músculo. Cunha et al (CUNHA et al., 2012) também observaram essa resposta de aumento da atividade do proteassoma em camundongos

submetidos a oito semanas de treinamento físico aeróbico, a qual foi considerada uma resposta fisiológica atribuída ao aumento no turnover proteico após a atividade contrátil muscular. Assim, uma maior atividade do proteassoma contribuiria para a ressíntese de proteínas, mantendo a função contrátil normal, e mantendo o controle de qualidade de proteínas (KIM, LOWE e HOPPE, 2008).

Com estes resultados relacionados à segunda hipótese do estudo, comprovou-se que o treinamento físico aeróbico previne parcialmente a atrofia do músculo plantar de ratos infartados, prevenindo a hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio. Além disso, o treinamento físico aeróbico, assim como no músculo plantar, previne a atrofia do músculo sóleo dos ratos infartados, prevenindo o maior nível de espécies reativas de oxigênio e a hiperativação do SUP induzida pelo infarto do miocárdio, porém sem alterar a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a NADPH oxidase contribui de maneira músculo-específica com a atrofia muscular desencadeada pelo infarto do miocárdio, e o treinamento físico aeróbico é capaz de prevenir a hiperativação desse complexo enzimático e a atrofia muscular esquelética em ratos infartados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOPOULOS, S., COATS, A. J., BRUNOTTE, F., ARNOLDA, L., MEYER, T., THOMPSON, C. H., DUNN, J. F., STRATTON, J., KEMP, G. J., RADDA, G. K. e ET AL. **Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure.** J Am Coll Cardiol 21(5): 1101-1106. 1993
- ADAMS, V., DORING, C. e SCHULER, G. **Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure.** Front Biosci 13: 302-311. 2008
- AGARWAL, D., WELSCH, M. A., KELLER, J. N. e FRANCIS, J. **Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR.** Basic Res Cardiol 106(6): 1069-1085. 2011
- AL GHOULEH, I., KHOO, N. K., KNAUS, U. G., GRIENDLING, K. K., TOUYZ, R. M., THANNICKAL, V. J., BARCHOWSKY, A., NAUSEEF, W. M., KELLEY, E. E., BAUER, P. M., DARLEY-USMAR, V., SHIVA, S., CIFUENTES-PAGANO, E., FREEMAN, B. A., GLADWIN, M. T. e PAGANO, P. J. **Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling.** Free Radic Biol Med 51(7): 1271-1288. 2011
- ALP, P. R., NEWSHOLME, E. A. e ZAMMIT, V. A. **Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates.** Biochem J 154(3): 689-700. 1976
- ANKER, S. D., PONIKOWSKI, P., VARNEY, S., CHUA, T. P., CLARK, A. L., WEBB-PEPLOE, K. M., HARRINGTON, D., KOX, W. J., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure.** Lancet 349(9058): 1050-1053. 1997
- ANTUNES-CORREA, L. M., KANAMURA, B. Y., MELO, R. C., NOBRE, T. S., UENO, L. M., FRANCO, F. G., ROVEDA, F., BRAGA, A. M., RONDON, M. U., BRUM, P. C., BARRETTO, A. C., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training improves neurovascular control and functional capacity in heart failure patients regardless of age.** Eur J Prev Cardiol 19(4): 822-829. 2012
- APPELL, H. J., DUARTE, J. A. e SOARES, J. M. **Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy.** Int J Sports Med 18(3): 157-160. 1997
- ARAUJO, D. V., TAVARES, L. R., VERÍSSIMO, R., FERRAZ, M. B. e MESQUITA, E. T. **Custo da Insuficiência Cardíaca no Sistema Único de Saúde.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia 84(5): 422-427. 2005
- 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. e BRUM, P. C. **Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training.** J Appl Physiol 106(5): 1631-1640. 2009
- BAI, Y., SIGALA, W., ADAMS, G. R. e VAZIRI, N. D. **Effect of exercise on cardiac tissue oxidative and inflammatory mediators in chronic kidney disease.** Am J Nephrol 129(3): 213-221. 2009
- BAR-SHAI, M., CARMELI, E., LJUBUNCIC, P. e REZNICK, A. Z. **Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation.** Free Radic Biol Med 44(2): 202-214. 2008
- BARBIERI, S. S., CAVALCA, V., ELIGINI, S., BRAMBILLA, M., CAIANI, A., TREMOLI, E. e COLLI, S. **Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in**

- human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med* 37(2): 156-165. 2004
- BAUMER, A. T., KRUGER, C. A., FALKENBERG, J., FREYHAUS, H. T., ROSEN, R., FINK, K. e ROSENKRANZ, S. **The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade.** *Clin Exp Hypertens* 29(5): 287-299. 2007
- BECH, O. M., KAHR, O., DIAMANT, B. e STEINESS, E. **Time course of functional deterioration after coronary artery ligation in rats.** *Cardiovasc Res* 23(8): 649-654. 1989
- BEDARD, K. e KRAUSE, K. H. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiol Rev* 87(1): 245-313. 2007
- BETTERS, J. L., CRISWELL, D. S., SHANELY, R. A., VAN GAMMEREN, D., FALK, D., DERUISSEAU, K. C., DEERING, M., YIMLAMAI, T. e POWERS, S. K. **Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis.** *Am J Respir Crit Care Med* 170(11): 1179-1184. 2004
- BOCCHI, E. A., BRAGA, F. G., FERREIRA, S. M., ROHDE, L. E., OLIVEIRA, W. A., ALMEIDA, D. R., MOREIRA MDA, 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 VDOS, S., ALBUQUERQUE, D. C., BACAL, F., SOUZA, G. E., ROSSI NETO, J. M., CLAUSELL, N. O., MARTINS, S. M., SICILIANO, A., 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., CASTRO, R. B., SALEMI, V. M., VILLACORTA JUNIOR, H., VILA, J. H., SIMOES, R., ALBANESI, F. e MONTERA, M. W. **[III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure].** *Arq Bras Cardiol* 93(1 Suppl 1): 3-70. 2009
- BOCCHI, E. A., BRAGA, F. G. M., FERREIRA, S. M. A., ROHDE, L. E. P., OLIVEIRA, W. A. D., ALMEIDA, D. R. D., MOREIRA, M. D. C. V., BESTETTI, R. B., BORDIGNON, S., AZEVEDO, C., TINOCO, E. M., ROCHA, R. M., ISSA, V. S., FERRAZ, A., CRUZ, F. D. D., GUIMARÃES, G. V., MONTERA, V. D. S. P., ALBUQUERQUE, D. C., BACAL, F., SOUZA, G. E. C., NETO, J. M. R., CLAUSELL, N. O., MARTINS, S. M., SICILIANO, A., NETO, J. D. D. S., MOREIRA, L. F., TEIXEIRA, R. A., MOURA, L. Z., BECK-DA-SILVA, L., RASSI, S., AZEKA, E., HOROWITZ, E., RAMIRES, F., SIMÕES, M. V., CASTRO, R. B. P. D., SALEMI, V. M. C., JUNIOR, H. V., VILA, J. H., SIMÕES, R., ALBANESI, F. e MONTERA, M. W. **III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93(1): 1-71. 2009
- BODINE, S. C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V. K., NUNEZ, L., CLARKE, B. A., POUYMIROU, W. T., PANARO, F. J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z. Q., VALENZUELA, D. M., DECHIARA, T. M., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. e GLASS, D. J. **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** *Science* 294(5547): 1704-1708. 2001
- BONEN, A., BLEWETT, C., MCDERMOTT, J. C. e ELDER, G. C. **A model for nonexercising hindlimb muscles in exercising animals.** *Can J Physiol Pharmacol* 68(7): 914-921. 1990
- BORI, Z., ZHAO, Z., KOLTAI, E., FATOUROS, I. G., JAMURTAS, A. Z., DOUROUDOS, II, TERZIS, G., CHATZINIKOLAOU, A., SOVATZIDIS, A., DRAGANIDIS, D., BOLDOGH, I. e RADAK, Z. **The effects of aging, physical training, and a single**

- bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle.** *Exp Gerontol* 47(6): 417-424. 2012
- BRASSARD, P., MALTAIS, F., NOEL, M., DOYON, J. F., LEBLANC, P., ALLAIRE, J., SIMARD, C., LEBLANC, M. H., POIRIER, P. e JOBIN, J. **Skeletal muscle endurance and muscle metabolism in patients with chronic heart failure.** *Can J Cardiol* 22(5): 387-392. 2006
- BROOKE, M. H. e KAISER, K. K. **Muscle fiber types: how many and what kind?** *Arch Neurol* 23(4): 369-379. 1970
- BROWN, D. I. e GRIENGLING, K. K. **Nox proteins in signal transduction.** *Free Radic Biol Med* 47(9): 1239-1253. 2009
- BRUM, P. C., BACURAU, A. V., MEDEIROS, A., FERREIRA, J. C., VANZELLI, A. S. e NEGRAO, C. E. **Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function.** *Braz J Med Biol Res* 44(9): 827-835. 2011
- BRUM, P. C., ROLIM, N. P., BACURAU, A. V. e MEDEIROS, A. **Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors.** *An Acad Bras Cienc* 78(3): 485-503. 2006
- BUENO, C. R., JR., FERREIRA, J. C., PEREIRA, M. G., BACURAU, A. V. e BRUM, P. C. **Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure.** *J Appl Physiol* 109(3): 702-709. 2010
- CARVALHO, R. F., CASTAN, E. P., COELHO, C. A., LOPES, F. S., ALMEIDA, F. L., MICHELIN, A., DE SOUZA, R. W., ARAUJO, J. P., JR., CICOONA, A. C. e DAL PAI-SILVA, M. **Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy.** *J Mol Histol* 41(1): 81-87. 2010
- CHEN, G. Q., MOU, C. Y., YANG, Y. Q., WANG, S. e ZHAO, Z. W. **Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes.** *Life Sci* 89(1-2): 44-49. 2011
- CHENG, G., CAO, Z., XU, X., VAN MEIR, E. G. e LAMBETH, J. D. **Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5.** *Gene* 269(1-2): 131-140. 2001
- CLARK, A. L., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Exercise limitation in chronic heart failure: central role of the periphery.** *J Am Coll Cardiol* 28(5): 1092-1102. 1996
- COIRAULT, C., GUELICH, A., BARBRY, T., SAMUEL, J. L., RIOU, B. e LECARPENTIER, Y. **Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H1009-1017. 2007
- CRIMI, E., IGNARRO, L. J., CACCIATORE, F. e NAPOLI, C. **Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure.** *Nat Rev Cardiol* 6(4): 292-300. 2009
- CUNHA, T. F., BACURAU, A. V., MOREIRA, J. B., PAIXAO, N. A., CAMPOS, J. C., FERREIRA, J. C., LEAL, M. L., NEGRAO, C. E., MORISCOT, A. S., WISLOFF, U. e BRUM, P. C. **Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure.** *PLoS One* 7(8): e41701. 2012
- CUNHA, T. F., MOREIRA, J. B., PAIXAO, N. A., CAMPOS, J. C., MONTEIRO, A. W., BACURAU, A. V., BUENO, C. R., JR., FERREIRA, J. C. e BRUM, P. C. **Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice.** *J Appl Physiol* 112(11): 1839-1846. 2012

- DREXLER, H., RIEDE, U., MUNZEL, T., KONIG, H., FUNKE, E. e JUST, H. **Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure.** *Circulation* 85(5): 1751-1759. 1992
- ENNEZAT, P. V., MALENDOWICZ, S. L., TESTA, M., COLOMBO, P. C., COHEN-SOLAL, A., EVANS, T. e LEJEMTEL, T. H. **Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes.** *J Am Coll Cardiol* 38(1): 194-198. 2001
- ERBS, S., LINKE, A., GIELEN, S., FIEHN, E., WALTHER, C., YU, J., ADAMS, V., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Exercise training in patients with severe chronic heart failure: impact on left ventricular performance and cardiac size. A retrospective analysis of the Leipzig Heart Failure Training Trial.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 10(5): 336-344. 2003
- FERREIRA, J. C., BACURAU, A. V., BUENO, C. R., JR., CUNHA, T. C., TANAKA, L. Y., JARDIM, M. A., RAMIRES, P. R. e BRUM, P. C. **Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice.** *Exp Biol Med (Maywood)* 235(4): 497-505. 2010
- FERREIRA, J. C., ROLIM, N. P., BARTHOLOMEU, J. B., GOBATTO, C. A., KOKUBUN, E. e BRUM, P. C. **Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(8): 760-765. 2007
- FISHBEIN, M. C., MACLEAN, D. e MAROKO, P. R. **Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution.** *Am J Pathol* 90(1): 57-70. 1978
- FRANCIOSA, J. A., PARK, M. e LEVINE, T. B. **Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure.** *Am J Cardiol* 47(1): 33-39. 1981
- FULLER, P. M., BALDWIN, K. M. e FULLER, C. A. **Parallel and divergent adaptations of rat soleus and plantaris to chronic exercise and hypergravity.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(2): R442-448. 2006
- GAO, L., WANG, W., LIU, D. e ZUCKER, I. H. **Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure.** *Circulation* 115(24): 3095-3102. 2007
- GARCIARENA, C. D., PINILLA, O. A., NOLLY, M. B., LAGUENS, R. P., ESCUDERO, E. M., CINGOLANI, H. E. e ENNIS, I. L. **Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy.** *Hypertension* 53(4): 708-714. 2009
- GENG, T., LI, P., YIN, X. e YAN, Z. **PGC-1 α promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice.** *Am J Pathol* 178(4): 1738-1748. 2011
- GIELEN, S., ADAMS, V., MOBIUS-WINKLER, S., LINKE, A., ERBS, S., YU, J., KEMPF, W., SCHUBERT, A., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 42(5): 861-868. 2003
- GIELEN, S., SANDRI, M., KOZAREZ, I., KRATZSCH, J., TEUPSER, D., THIERY, J., ERBS, S., MANGNER, N., LENK, K., HAMBRECHT, R., SCHULER, G. e ADAMS, V. **Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study.** *Circulation* 125(22): 2716-2727. 2012
- GLICKMAN, M. H. e CIECHANOVER, A. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.** *Physiol Rev* 82(2): 373-428. 2002

- GOMES-MARCONDES, M. C. e TISDALE, M. J. **Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress.** *Cancer Lett* 180(1): 69-74. 2002
- GOMES, M. D., LECKER, S. H., JAGOE, R. T., NAVON, A. e GOLDBERG, A. L. **Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-14445. 2001
- GORDON, A. e VOIPIO-PULKKI, L. M. **Crosstalk of the heart and periphery: skeletal and cardiac muscle as therapeutic targets in heart failure.** *Ann Med* 29(4): 327-331. 1997
- GRAHAM, K. A., KULAWIEC, M., OWENS, K. M., LI, X., DESOUKI, M. M., CHANDRA, D. e SINGH, K. K. **NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria.** *Cancer Biol Ther* 10(3): 223-231. 2010
- GRIENDLING, K. K., SORESCU, D. e USHIO-FUKAI, M. **NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.** *Circ Res* 86(5): 494-501. 2000
- GUARNIER, F. A., CECCHINI, A. L., SUZUKAWA, A. A., MARAGNO, A. L., SIMAO, A. N., GOMES, M. D. e CECCHINI, R. **Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor.** *Muscle Nerve* 42(6): 950-958. 2010
- HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, UK, Oxford Univ. Press.
- HAMBRECHT, R., FIEHN, E., YU, J., NIEBAUER, J., WEIGL, C., HILBRICH, L., ADAMS, V., RIEDE, U. e SCHULER, G. **Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 29(5): 1067-1073. 1997
- 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. e WISLOFF, U. **Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity.** *Cardiovasc Res* 81(4): 723-732. 2009
- HASSELGREN, P. O., WRAY, C. e MAMMEN, J. **Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome.** *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 1-10. 2002
- HAYASHI, T., JULIET, P. A., KANO-HAYASHI, H., TSUNEKAWA, T., DINGQUNFANG, D., SUMI, D., MATSUI-HIRAI, H., FUKATSU, A. e IGUCHI, A. **NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction.** *Diabetes Obes Metab* 7(4): 334-343. 2005
- HEART FAILURE SOCIETY OF, A. **Conceptualization and working definition of heart failure.** *J Card Fail* 12(1): e10-11. 2006
- HEUMULLER, S., WIND, S., BARBOSA-SICARD, E., SCHMIDT, H. H., BUSSE, R., SCHRODER, K. e BRANDES, R. P. **Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant.** *Hypertension* 51(2): 211-217. 2008
- HIDALGO, C., SANCHEZ, G., BARRIENTOS, G. e ARACENA-PARKS, P. **A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation.** *J Biol Chem* 281(36): 26473-26482. 2006
- HOLLOSZY, J. O. **Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4.** *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7: 5-18. 2008

- HORNIG, B., MAIER, V. e DREXLER, H. **Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure.** *Circulation* 93(2): 210-214. 1996
- JAVESGHANI, D., MAGDER, S. A., BARREIRO, E., QUINN, M. T. e HUSSAIN, S. N. **Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles.** *Am J Respir Crit Care Med* 165(3): 412-418. 2002
- JN, M. (1997). Congestive heart failure. American College of Sports Medicine. ACSM's exercise management for person with chronic diseases and disabilities. . Champaign, IL, Human Kinetics: 48-51.
- JOHNS, T. N. e OLSON, B. J. **Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals.** *Ann Surg* 140(5): 675-682. 1954
- JONDEAU, G., KATZ, S. D., ZOHMAN, L., GOLDBERGER, M., MCCARTHY, M., BOURDARIAS, J. P. e LEJEMTEL, T. H. **Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure.** *Circulation* 86(5): 1351-1356. 1992
- JONES, D. P. **Redefining oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1865-1879. 2006
- KACZOR, J. J., HALL, J. E., PAYNE, E. e TARNOPOLSKY, M. A. **Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice.** *Free Radic Biol Med* 43(1): 145-154. 2007
- KIM, J., LOWE, T. e HOPPE, T. **Protein quality control gets muscle into shape.** *Trends Cell Biol* 18(6): 264-272. 2008
- KOLWICZ, S. C., MACDONNELL, S. M., RENNA, B. F., REGER, P. O., SEQQAT, R., RAFIQ, K., KENDRICK, Z. V., HOUSER, S. R., SABRI, A. e LIBONATI, J. R. **Left ventricular remodeling with exercise in hypertension.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(4): H1361-1368. 2009
- KONDO, H., MIURA, M. e ITOKAWA, Y. **Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization.** *Acta Physiol Scand* 142(4): 527-528. 1991
- KRIEGENBURG, F., POULSEN, E. G., KOCH, A., KRUGER, E. e HARTMANN-PETERSEN, R. **Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance.** *Antioxid Redox Signal* 15(8): 2265-2299. 2011
- KURODA, J., AGO, T., MATSUSHIMA, S., ZHAI, P., SCHNEIDER, M. D. e SADOSHIMA, J. **NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35): 15565-15570. 2010
- LAURINDO, F. R., DE SOUZA, H. P., PEDRO MDE, A. e JANISZEWSKI, M. **Redox aspects of vascular response to injury.** *Methods Enzymol* 352: 432-454. 2002
- LAWLER, J. M., SONG, W. e DEMAREE, S. R. **Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle.** *Free Radic Biol Med* 35(1): 9-16. 2003
- LECKER, S. H., JAGOE, R. T., GILBERT, A., GOMES, M., BARACOS, V., BAILEY, J., PRICE, S. R., MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression.** *FASEB J* 18(1): 39-51. 2004
- LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states.** *J Nutr* 129(1S Suppl): 227S-237S. 1999
- LI, J., ZHU, H., SHEN, E., WAN, L., ARNOLD, J. M. e PENG, T. **Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes.** *Diabetes* 59(8): 2033-2042. 2010

- LI, P., WATERS, R. E., REDFERN, S. I., ZHANG, M., MAO, L., ANNEX, B. H. e YAN, Z. **Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice.** *Am J Pathol* 170(2): 599-608. 2007
- LI, Y. P., CHEN, Y., LI, A. S. e REID, M. B. **Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes.** *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4): C806-812. 2003
- LI, Y. P., SCHWARTZ, R. J., WADDELL, I. D., HOLLOWAY, B. R. e REID, M. B. **Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha.** *FASEB J* 12(10): 871-880. 1998
- LINDENFELD, J., ALBERT, N. M., BOEHMER, J. P., COLLINS, S. P., EZEKOWITZ, J. A., GIVERTZ, M. M., KATZ, S. D., KLAPHOLZ, M., MOSER, D. K., ROGERS, J. G., STARLING, R. C., STEVENSON, W. G., TANG, W. H., TEERLINK, J. R. e WALSH, M. N. **HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline.** *J Card Fail* 16(6): e1-194. 2010
- LINKE, A., ADAMS, V., SCHULZE, P. C., ERBS, S., GIELEN, S., FIEHN, E., MOBIUS-WINKLER, S., SCHUBERT, A., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle.** *Circulation* 111(14): 1763-1770. 2005
- LIU, Y., HUANG, H., XIA, W., TANG, Y., LI, H. e HUANG, C. **NADPH oxidase inhibition ameliorates cardiac dysfunction in rabbits with heart failure.** *Mol Cell Biochem* 343(1-2): 143-153. 2010
- LU, H., ZONG, C., WANG, Y., YOUNG, G. W., DENG, N., SOUDA, P., LI, X., WHITELEGGE, J., DREWS, O., YANG, P. Y. e PING, P. **Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach.** *Mol Cell Proteomics* 7(11): 2073-2089. 2008
- LUNDE, P. K., SJAASTAD, I., SCHIOTZ THORUD, H. M. e SEJERSTED, O. M. **Skeletal muscle disorders in heart failure.** *Acta Physiol Scand* 171(3): 277-294. 2001
- MANCINI, D. M., SCHWARTZ, M., FERRARO, N., SEESTEDT, R., CHANCE, B. e WILSON, J. R. **Effect of dobutamine on skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure.** *Am J Cardiol* 65(16): 1121-1126. 1990
- MARANTZ, P. R., TOBIN, J. N., WASSERTHEIL-SMOLLER, S., STEINGART, R. M., WEXLER, J. P., BUDNER, N., LENSE, L. e WACHSPRESS, J. **The relationship between left ventricular systolic function and congestive heart failure diagnosed by clinical criteria.** *Circulation* 77(3): 607-612. 1988
- MARIN-GARCIA, J., GOLDENTHAL, M. J. e MOE, G. W. **Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure.** *Cardiovasc Res* 52(1): 103-110. 2001
- MARZO, K. P., HERRMANN, H. C. e MANCINI, D. M. **Effect of balloon mitral valvuloplasty on exercise capacity, ventilation and skeletal muscle oxygenation.** *J Am Coll Cardiol* 21(4): 856-865. 1993
- MASKIN, C. S., FORMAN, R., SONNENBLICK, E. H., FRISHMAN, W. H. e LEJEMTEL, T. H. **Failure of dobutamine to increase exercise capacity despite hemodynamic improvement in severe chronic heart failure.** *Am J Cardiol* 51(1): 177-182. 1983
- MATSUSHIMA, S., KINUGAWA, S., YOKOTA, T., INOUE, N., OHTA, Y., HAMAGUCHI, S. e TSUTSUI, H. **Increased myocardial NAD(P)H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of postinfarct heart failure in type 2 diabetes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1): H409-416. 2009

- MCCLUNG, J. M., KAVAZIS, A. N., WHIDDEN, M. A., DERUISSEAU, K. C., FALK, D. J., CRISWELL, D. S. e POWERS, S. K. **Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling.** J Physiol 585(Pt 1): 203-215. 2007
- MCCORD, J. M. e FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).** J Biol Chem 244(22): 6049-6055. 1969
- MEDEIROS, A., BACURAU, A. V. N., FERREIRA, J. C. B., BECHARA, L. R. G. e BRUM, P. C. (2010). Adaptações moleculares ao treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca: músculos cardíaco e esquelético. Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata. C. E. Negrão and A. C. P. Barreto. Barueri, Manole. **3ª Ed.**
- 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. e BRUM, P. C. **Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice.** J Appl Physiol 104(1): 103-109. 2008
- MESSINA, S., ALTAVILLA, D., AGUENNOUZ, M., SEMINARA, P., MINUTOLI, L., MONICI, M. C., BITTO, A., MAZZEO, A., MARINI, H., SQUADRITO, F. e VITA, G. **Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice.** Am J Pathol 168(3): 918-926. 2006
- METTAUER, B., ZOLL, J., SANCHEZ, H., LAMPERT, E., RIBERA, F., VEKSLER, V., BIGARD, X., MATEO, P., EPAILLY, E., LONSDORFER, J. e VENTURA-CLAPIER, R. **Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects.** J Am Coll Cardiol 38(4): 947-954. 2001
- MIDDLEKAUFF, H. R. **Making the case for skeletal myopathy as the major limitation of exercise capacity in heart failure.** Circ Heart Fail 3(4): 537-546. 2010
- MINNAARD, R., DROST, M. R., WAGENMAKERS, A. J., VAN KRANENBURG, G. P., KUIPERS, H. e HESSELINK, M. K. **Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats.** Muscle Nerve 31(3): 339-348. 2005
- MURDOCH, C. E., GRIEVE, D. J., CAVE, A. C., LOOI, Y. H. e SHAH, A. M. **NADPH oxidase and heart failure.** Curr Opin Pharmacol 6(2): 148-153. 2006
- NEGRAO, C. E., IRIGOYEN, M. C., MOREIRA, E. D., BRUM, P. C., FREIRE, P. M. e KRIEGER, E. M. **Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness.** Am J Physiol 265(2 Pt 2): R365-370. 1993
- NEGRAO, C. E. e MIDDLEKAUFF, H. R. **Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control.** J Appl Physiol 104(3): 577-578. 2008
- NUNES, R. B., TONETTO, M., MACHADO, N., CHAZAN, M., HECK, T. G., VEIGA, A. B. e DALL'AGO, P. **Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats.** J Appl Physiol 104(6): 1641-1647. 2008
- OELZE, M., KNORR, M., SCHUHMACHER, S., HEEREN, T., OTTO, C., SCHULZ, E., REIFENBERG, K., WENZEL, P., MUNZEL, T. e DAIBER, A. **Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency.** J Vasc Res 48(4): 275-284. 2011
- OHTA, Y., KINUGAWA, S., MATSUSHIMA, S., ONO, T., SOBIRIN, M. A., INOUE, N., YOKOTA, T., HIRABAYASHI, K. e TSUTSUI, H. **Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 300(5): H1637-1644. 2011

- OLIVEIRA, R. S., FERREIRA, J. C., GOMES, E. R., PAIXAO, N. A., ROLIM, N. P., MEDEIROS, A., GUATIMOSIM, S. e BRUM, P. C. **Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice.** *J Physiol* 587(Pt 15): 3899-3910. 2009
- PECHANOVA, O., JENDEKOVA, L. e VRANKOVA, S. **Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension.** *Pharmacol Rep* 61(1): 116-122. 2009
- PEPATO, M. T., MIGLIORINI, R. H., GOLDBERG, A. L. e KETTELHUT, I. C. **Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats.** *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): E340-347. 1996
- PIEPOLI, M. F., CONRAADS, V., CORRA, U., DICKSTEIN, K., FRANCIS, D. P., JAARSMA, T., MCMURRAY, J., PIESKE, B., PIOTROWICZ, E., SCHMID, J. P., ANKER, S. D., SOLAL, A. C., FILIPPATOS, G. S., HOES, A. W., GIELEN, S., GIANNUZZI, P. e PONIKOWSKI, P. P. **Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.** *Eur J Heart Fail* 13(4): 347-357. 2011
- POWERS, S. K., KAVAZIS, A. N. e DERUISSEAU, K. C. **Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(2): R337-344. 2005
- POWERS, S. K., KAVAZIS, A. N. e MCCLUNG, J. M. **Oxidative stress and disuse muscle atrophy.** *J Appl Physiol* 102(6): 2389-2397. 2007
- PRICE, S. R. **Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy.** *Int J Biochem Cell Biol* 35(5): 617-628. 2003
- REHN, T. A., MUNKVIK, M., LUNDE, P. K., SJAASTAD, I. e SEJERSTED, O. M. **Intrinsic skeletal muscle alterations in chronic heart failure patients: a disease-specific myopathy or a result of deconditioning?** *Heart Fail Rev* 17(3): 421-436. 2012
- REID, M. B. **Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't.** *J Appl Physiol* 90(2): 724-731. 2001
- ROLIM, N. P., MEDEIROS, A., ROSA, K. T., MATTOS, K. C., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E. e BRUM, P. C. **Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure.** *Physiol Genomics* 29(3): 246-252. 2007
- RONDON, E., BRASILEIRO-SANTOS, M. S., MOREIRA, E. D., RONDON, M. U., MATTOS, K. C., COELHO, M. A., SILVA, G. J., BRUM, P. C., FIORINO, P., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training improves aortic depressor nerve sensitivity in rats with ischemia-induced heart failure.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(6): H2801-2806. 2006
- ROVEDA, F., MIDDLEKAUFF, H. R., RONDON, M. U., REIS, S. F., SOUZA, M., NASTARI, L., BARRETTO, A. C., KRIEGER, E. M. e NEGRAO, C. E. **The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial.** *J Am Coll Cardiol* 42(5): 854-860. 2003
- RUSH, J. W., GREEN, H. J., MACLEAN, D. A. e CODE, L. M. **Oxidative stress and nitric oxide synthase in skeletal muscles of rats with post-infarction, compensated chronic heart failure.** *Acta Physiol Scand* 185(3): 211-218. 2005

- RUSSELL, S. T., ELEY, H. e TISDALE, M. J. **Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II.** *Cell Signal* 19(8): 1797-1806. 2007
- SAKURAI, T., IZAWA, T., KIZAKI, T., OGASAWARA, J. E., SHIRATO, K., IMAIZUMI, K., TAKAHASHI, K., ISHIDA, H. e OHNO, H. **Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* 379(2): 605-609. 2009
- SCARPELLI, M., BELARDINELLI, R., TULLI, D. e PROVINCIALI, L. **Quantitative analysis of changes occurring in muscle vastus lateralis in patients with heart failure after low-intensity training.** *Anal Quant Cytol Histol* 21(5): 374-380. 1999
- SCHRODER, K., BENKHOFF, S., MICHAELIS-POPP, U. R. e BRANDES, R. P. **Nox4 is essentially involved in murine angiogenesis.** *Acta Physiologica* 204(Supplement 689): P200. 2012
- SCHRODER, K., ZHANG, M., BENKHOFF, S., MIETH, A., PLIQUETT, R., KOSOWSKI, J., KRUSE, C., LUEDIKE, P., MICHAELIS, U. R., WEISSMANN, N., DIMMELER, S., SHAH, A. M. e BRANDES, R. P. **Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase.** *Circ Res* 110(9): 1217-1225. 2012
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., ADAMS, V., LINKE, A., MOBIUS-WINKLER, S., ERBS, S., KRATZSCH, J., HAMBRECHT, R. e SCHULER, G. **Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure.** *Basic Res Cardiol* 98(4): 267-274. 2003
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training.** *Int J Cardiol* 85(1): 141-149. 2002
- SEMPRUN-PRIETO, L. C., SUKHANOV, S., YOSHIDA, T., REZK, B. M., GONZALEZ-VILLALOBOS, R. A., VAUGHN, C., MICHAEL TABONY, A. e DELAFONTAINE, P. **Angiotensin II induced catabolic effect and muscle atrophy are redox dependent.** *Biochem Biophys Res Commun* 409(2): 217-221. 2011
- SHAH, A. J., SAHGAL, V., QUINTANILLA, A. P., SUBRAMANI, V., SINGH, H. e HUGHES, R. **Muscle in chronic uremia--a histochemical and morphometric study of human quadriceps muscle biopsies.** *Clin Neuropathol* 2(2): 83-89. 1983
- SHANG, F., GONG, X. e TAYLOR, A. **Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated.** *J Biol Chem* 272(37): 23086-23093. 1997
- SHANG, F. e TAYLOR, A. **Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress.** *Free Radic Biol Med* 51(1): 5-16. 2011
- SHEFER, G. e BENAYAHU, D. **The effect of exercise on IGF-I on muscle fibers and satellite cells.** *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 230-239. 2012
- SILVA, L. A., PINHO, C. A., SCARABELOT, K. S., FRAGA, D. B., VOLPATO, A. M., BOECK, C. R., DE SOUZA, C. T., STRECK, E. L. e PINHO, R. A. **Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle.** *Eur J Appl Physiol* 105(6): 861-867. 2009
- SIMKO, F. e SIMKO, J. **Heart failure--the reason for or a consequence of failure of the periphery?** *Physiol Res* 45(6): 483-484. 1996
- SIMONYI, A., SERFOZO, P., LEHMIDI, T. M., CUI, J., GU, Z., LUBAHN, D. B., SUN, A. Y. e SUN, G. Y. **The neuroprotective effects of apocynin.** *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2183-2193. 2012
- SJ, K. (2009). Chronic heart failure. Ehrman JK, Gordon PM, Visish PS, Keteyian SJ. Clinical Exercise Physiology. Champaign, IL, Human Kinetics: 315-332.

- SOLOMON, V. e GOLDBERG, A. L. **Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts.** J Biol Chem 271(43): 26690-26697. 1996
- SPURNEY, C. F., KNOBLACH, S., PISTILLI, E. E., NAGARAJU, K., MARTIN, G. R. e HOFFMAN, E. P. **Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart.** Neuromuscul Disord 18(5): 371-381. 2008
- STEFANSKA, J. e PAWLICZAK, R. **Apocynin: molecular aptitudes.** Mediators Inflamm 2008: 106507. 2008
- STEVENSON, E. J., GIRESI, P. G., KONCAREVIC, A. e KANDARIAN, S. C. **Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle.** J Physiol 551(Pt 1): 33-48. 2003
- STONE, J. R. e YANG, S. **Hydrogen peroxide: a signaling messenger.** Antioxid Redox Signal 8(3-4): 243-270. 2006
- SUKHANOV, S., SEMPRUN-PIETO, L., YOSHIDA, T., MICHAEL TABONY, A., HIGASHI, Y., GALVEZ, S. e DELAFONTAINE, P. **Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting.** Am J Med Sci 342(2): 143-147. 2011
- SULLIVAN-GUNN, M. J., CAMPBELL-O'SULLIVAN, S. P., TISDALE, M. J. e LEWANDOWSKI, P. A. **Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle.** J Cachexia Sarcopenia Muscle 2(3): 181-188. 2011
- TISDALE, M. J. **The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting.** J Support Oncol 3(3): 209-217. 2005
- TRUEBLOOD, N. A., INSCORE, P. R., BRENNER, D., LUGASSY, D., APSTEIN, C. S., SAWYER, D. B. e COLUCCI, W. S. **Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 288(1): H244-249. 2005
- VAN HEES, H. W., LI, Y. P., OTTENHEIJM, C. A., JIN, B., PIGMANS, C. J., LINKELS, M., DEKHUIJZEN, P. N. e HEUNKS, L. M. **Proteasome inhibition improves diaphragm function in congestive heart failure rats.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294(6): L1260-1268. 2008
- VENTADOUR, S. e ATTAIX, D. **Mechanisms of skeletal muscle atrophy.** Curr Opin Rheumatol 18(6): 631-635. 2006
- WHITEHEAD, N. P., YEUNG, E. W., FROEHNER, S. C. e ALLEN, D. G. **Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse.** PLoS One 5(12): e15354. 2010
- WILLIAMS, H. C. e GRIENDLING, K. K. **NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents?** J Cardiovasc Pharmacol 50(1): 9-16. 2007
- WILSON, J. R., HANAMANTHU, S., CHOMSKY, D. B. e DAVIS, S. F. **Relationship between exertional symptoms and functional capacity in patients with heart failure.** J Am Coll Cardiol 33(7): 1943-1947. 1999
- WING, S. S. e GOLDBERG, A. L. **Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting.** Am J Physiol 264(4 Pt 1): E668-676. 1993
- WING, S. S., HAAS, A. L. e GOLDBERG, A. L. **Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation.** Biochem J 307 (Pt 3): 639-645. 1995
- WYKE, S. M., RUSSELL, S. T. e TISDALE, M. J. **Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation.** Br J Cancer 91(9): 1742-1750. 2004

- XIA, R., WEBB, J. A., GNALL, L. L., CUTLER, K. e ABRAMSON, J. J. **Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide.** *Am J Physiol Cell Physiol* 285(1): C215-221. 2003
- YOKOTA, T., KINUGAWA, S., HIRABAYASHI, K., MATSUSHIMA, S., INOUE, N., OHTA, Y., HAMAGUCHI, S., SOBIRIN, M. A., ONO, T., SUGA, T., KURODA, S., TANAKA, S., TERASAKI, F., OKITA, K. e TSUTSUI, H. **Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(3): H1069-1077. 2009
- YU, Z., LI, P., ZHANG, M., HANNINK, M., STAMLER, J. S. e YAN, Z. **Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli.** *PLoS One* 3(5): e2086. 2008
- ZANCHI, N. E., BECHARA, L. R., TANAKA, L. Y., DEBBAS, V., BARTHOLOMEU, T. e RAMIRES, P. R. **Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats.** *Eur J Appl Physiol* 104(6): 1045-1052. 2008
- ZANNAD, F., STOUGH, W. G., PITT, B., CLELAND, J. G., ADAMS, K. F., GELLER, N. L., TORP-PEDERSEN, C., KIRWAN, B. A. e FOLLATH, F. **Heart failure as an endpoint in heart failure and non-heart failure cardiovascular clinical trials: the need for a consensus definition.** *Eur Heart J* 29(3): 413-421. 2008
- ZHANG, P., HOU, M., LI, Y., XU, X., BARSOUM, M., CHEN, Y. e BACHE, R. J. **NADPH oxidase contributes to coronary endothelial dysfunction in the failing heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(3): H840-846. 2009
- ZORNOFF, L. A., PAIVA, S. A., MINICUCCI, M. F. e SPADARO, J. **Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model.** *Arq Bras Cardiol* 93(4): 434-440, 426-432. 2009