

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

**JOSÉ BIANCO NASCIMENTO MOREIRA**

**Efeitos do treinamento físico aeróbio em alta intensidade na musculatura esquelética de  
ratos infartados**

**SÃO PAULO**

**2012**

**JOSÉ BIANCO NASCIMENTO MOREIRA**

**Efeitos do treinamento físico aeróbio em alta intensidade na musculatura esquelética de ratos infartados**

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

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento Humano.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Chakur Brum

**SÃO PAULO**

**2012**

Nome: MOREIRA, José Bianco Nascimento

Título: Efeitos do treinamento físico aeróbio em alta intensidade na musculatura esquelética de ratos infartados

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a três pessoas fundamentais em todos os meus passos:

À Camila, minha esposa e companheira de todas as horas, por todo amor e carinho. Agradeço pela compreensão nos finais de semana que passei trabalhando e pelas madrugadas com a luz acesa. Tenha a certeza de que tudo isso valerá a pena e que todos os nossos planos se concretizarão num futuro muito breve. Eu te amo!

Aos meus pais, José Maria e Maria Célia, pelo amor, carinho e incentivo desde o primeiro dia de minha vida.



## AGRADECIMENTOS

À Patricia Brum, por seu papel essencial no meu crescimento profissional, por seu profissionalismo e pelas conversas que tivemos, científicas ou não. Agradeço também pelo suco com uvas dentro, oferecido durante as reuniões.

Aos meus irmãos Marcelo e Matheus.

Aos meus grandes amigos José Braga, Fabiola, Arthur e Bernardo.

À minha avó Juracy e aos meus padrinhos Ilza e Sirley pelo amor e suporte incondicionais.

A todos os meus tios, tias e primos pela torcida por meu sucesso e pelo apoio de todas as horas.

À minha segunda família, Elza, Dimas e Carol pelo carinho e consideração.

Aos meus colegas de laboratório, Luiz Bozi, Luiz Bechara, Vanessa, Aline, Paulo, Dani, Telma, Nathalie, Chris, Julio, Juliane, Katia, Max e Fabi, pela colaboração, pelas piadas, pelos finais de semana e madrugadas trabalhando.

Aos professores Paulo Ramires, Edilamar e seus alunos.

Aos técnicos Alex, Ney, Marcele, Katt, Luciano e Glória, pelo trabalho essencial no desenvolvimento de todos os projetos do laboratório.

À secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, especialmente à Ilza, ao Marcio e ao Paulo, pela eficiência e prontidão nos esclarecimentos relacionados ao Programa de Mestrado.

Aos meus mais novos amigos e colegas de trabalho, Natale e Gustavo, por todo suporte e conselhos.

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

*“You can be wrong on your hypothesis, but you cannot be wrong on your data. And I was not wrong on data”*

**Eduardo Moacyr Krieger,**

em palestra proferida na reunião anual da  
Federação das Sociedades Brasileiras de  
Biologia Experimental (FeSBE, Águas de  
Lindóia - 2010)

## RESUMO

MOREIRA, J.B.N. **Efeitos do treinamento físico aeróbio em alta intensidade na musculatura esquelética de ratos infartados**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A miopatia esquelética em doenças sistêmicas é um importante preditor de mortalidade e prognóstico em diversas síndromes, incluindo a insuficiência cardíaca. Os danos músculo-esqueléticos em situações de comprometimento cardíaco são descritos pela literatura há décadas, entretanto, nenhum recurso farmacológico proposto até o momento mostrou-se eficiente em reverter esses prejuízos, ressaltando o papel do treinamento físico aeróbio. Apesar dos inegáveis benefícios desta terapia adjuvante no tratamento da insuficiência cardíaca, muito pouco se sabe sobre a intensidade de exercício capaz de otimizar os ganhos promovidos por esta intervenção. Dado isso, nesse estudo avaliamos a eficácia do treinamento físico aeróbio em alta intensidade na musculatura esquelética em ratos submetidos ao infarto do miocárdio, comparando-a com protocolo isocalórico realizado em intensidade moderada. Observamos que os animais infartados apresentaram alterações patológicas na musculatura esquelética, similarmente ao observado em pacientes com IC, como prejuízos em enzimas metabólicas fundamentais, atrofia muscular, perturbação da homeostase redox e ativação do complexo proteassomal 26S. Ambos os protocolos de treinamento físico aeróbio foram capazes de aprimorar substancialmente a capacidade funcional e potência aeróbia máxima nos animais infartados, prevenindo a queda da atividade máxima das enzimas hexoquinase e citrato sintase, restaurando a morfologia da musculatura esquelética e aumentando a distribuição de fibras musculares do tipo I, o que foi acompanhado por melhora do balanço redox e redução da atividade do complexo proteassomal 26S. Apesar do treinamento físico aeróbio em alta intensidade ter proporcionado resultados superiores ao protocolo de intensidade moderada em relação a capacidade funcional dos animais, as adaptações músculo-esqueléticas às diferentes intensidades de TFA apresentaram-se muito semelhantes.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, músculo esquelético, treinamento físico, atrofia muscular

## ABSTRACT

MOREIRA, J.B.N. **Effects of high-intensity aerobic interval training on skeletal muscle of infarcted rats.** 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Impaired skeletal muscle performance in systemic diseases is shown to strongly predict mortality and long-term prognosis in a wide variety of syndromes, including heart failure. The clinical picture of skeletal muscle damage in cardiac situations has been described for decades. However, no pharmacological strategy proposed so far was shown to effectively prevent the onset of skeletal myopathy, reinforcing the role of aerobic exercise training in counteracting such phenomenon. Despite the well-known benefits of exercise training in sets of cardiac dysfunction, very little is known about the optimal exercise intensity to elicit maximal outcomes. Therefore, in the present study we compared the effects of high-intensity aerobic exercise training with those of an isocaloric moderate-intensity protocol on skeletal muscle adaptations in infarcted rats. Our data suggest that infarcted rats presented signs of skeletal myopathy resembling those observed in HF patients, such as metabolic enzymes impairment, skeletal muscle atrophy, disrupted redox balance and proteasomal overactivation. Here we show that both high- and moderate-intensity aerobic exercise training were able to substantially increase aerobic capacity in infarcted rats, preventing the decay of citrate synthase and hexokinase maximal activities, reestablishing normal skeletal muscle morphology to a healthy profile and increasing the number of type I muscle fibers. Such outcomes were accompanied by an improved redox balance and reduced proteasomal activity in skeletal muscle. Even though high-intensity aerobic interval training was superior to moderate-intensity in improving functional capacity, the observed adaptations in skeletal muscle were remarkably similar between the protocols. Therefore, our data allow us to conclude that high-intensity and moderate-intensity aerobic exercise training equally prevent skeletal myopathy induced by myocardial infarction in rats.

Keywords: myocardial infarction, skeletal muscle, exercise training, skeletal muscle atrophy

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação esquemática do sistema ubiquitina proteassoma.....	26
Figura 2 - Representação gráfica dos protocolos de TFA realizados no presente estudo.....	34
Figura 3 - Linearidade do método de mensuração da atividade máxima da enzima citrato sintase em homogenato citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	36
Figura 4 - Linearidade do método de mensuração da atividade máxima da enzima hexoquinase em homogenato citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	37
Figura 5 - Linearidade do método de mensuração de glicogênio intramuscular. Curva padrão de glicose (A), e conteúdo de glicogênio em diferentes quantidades dos músculos sóleo (B) e plantar (C).....	38
Figura 6 - Inibição da redução de citocromo C pela enzima SOD presente em lisado citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	40
Figura 7 - Linearidade do método de mensuração da atividade da enzima catalase em lisado citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	41
Figura 8 - Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental.....	49
Figura 9 - Massa cardíaca (A) e massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B).....	50
Figura 10 - Distância total percorrida em teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental.....	52
Figura 11 - Potência aeróbia máxima (A) ( $VO_2$ máx) e intensidade de corrida na qual o $VO_2$ máx foi atingido (B) ( $IVO_2$ máx), avaliados por teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental.....	54
Figura 12 - Atividade máxima da enzima citrato sintase nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	55

Figura 13	-	Atividade máxima da enzima hexoquinase nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	56
Figura 14	-	Conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo (A) e plantar (B)..	57
Figura 15	-	Massa dos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	58
Figura 16	-	Massa dos músculos sóleo (A) e plantar (B) relativa à massa corporal.....	59
Figura 17	-	Área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos músculos sóleo (A e C) e plantar (B e D).....	60
Figura 18	-	Distribuição dos tipos de fibras musculares nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	61
Figura 19	-	Atividade máxima da enzima SOD nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	62
Figura 20	-	Atividade máxima da enzima catalase nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	63
Figura 21	-	Estado redox da glutathiona nos músculos sóleo e plantar.....	65
Figura 22	-	Atividade máxima do complexo proteassomal 26S nos músculos sóleo (A) e plantar (B).....	66
Figura 23	-	Proteínas ubiquitinadas e oxidadas em lisado citosólico dos músculos sóleo (A e C) e plantar (B e D).....	68

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Parâmetros ecocardiográficos.....	47
Tabela 2 - Massa tecidual (pulmões e fígado).....	51

## LISTA DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A - Distância total percorrida em teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante em animais saudáveis SHAM ou infartados que apresentaram edema pulmonar 12 semanas após os procedimentos cirúrgicos.....	89
APÊNDICE B - Correlação entre a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e distância total percorrida em teste de corrida em esteira com carga incremental até a exaustão, quatro (A) e 12 (B) semanas após os procedimentos cirúrgicos.....	90
APÊNDICE C - Correlação entre atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo plantar e distância total percorrida em teste de corrida em esteira com carga incremental.....	91
APÊNDICE D - Correlação entre atividade do complexo proteassomal 26S e massa do músculo sóleo.....	92



## LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO A - Dados numéricos referentes à fração de encurtamento ventricular.....	93
ANEXO B - Dados numéricos referentes à tolerância ao esforço físico.....	94
ANEXO C - Dados numéricos referentes à massa do músculo sóleo.....	95
ANEXO D - Dados numéricos referentes à massa do músculo plantar.....	96
ANEXO E - Dados numéricos referentes à massa cardíaca corrigida pela massa corporal.....	97
ANEXO F - Dados numéricos referentes à razão massa úmida : massa seca dos pulmões.....	98
ANEXO G - Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo.....	99
ANEXO H - Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo plantar.....	100
ANEXO I - Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo sóleo.....	101
ANEXO J - Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo plantar.....	102
ANEXO L - Dados numéricos referentes ao conteúdo de glicogênio no músculo sóleo.....	103
ANEXO M - Dados numéricos referentes ao conteúdo de glicogênio no músculo plantar.....	104
ANEXO N - Dados numéricos referentes à porcentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo.....	105
ANEXO O - Dados numéricos referentes à porcentagem de fibras do tipo II no músculo sóleo.....	106
ANEXO P - Dados numéricos referentes à porcentagem de fibras do tipo I no músculo plantar.....	107
ANEXO Q - Dados numéricos referentes à porcentagem de fibras do tipo II no músculo plantar.....	108
ANEXO R - Dados numéricos referentes à área de secção transversa das fibras do tipo I no músculo sóleo.....	109

ANEXO S	-	Dados numéricos referentes à área de secção transversa das fibras do tipo II no músculo sóleo.....	110
ANEXO T	-	Dados numéricos referentes à área de secção transversa das fibras do tipo I no músculo plantar.....	111
ANEXO U	-	Dados numéricos referentes à área de secção transversa das fibras do tipo II no músculo plantar.....	112
ANEXO V	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima superóxido dismutase no músculo sóleo.....	113
ANEXO X	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima superóxido dismutase no músculo plantar.....	114
ANEXO Z	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima catalase no músculo sóleo.....	115
ANEXO AA	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima da enzima catalase no músculo plantar.....	116
ANEXO AB	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de glutathiona reduzida no músculo sóleo.....	117
ANEXO AC	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de glutathiona oxidada no músculo sóleo.....	118
ANEXO AD	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de glutathiona reduzida no músculo plantar.....	119
ANEXO AE	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de glutathiona oxidada no músculo plantar.....	120
ANEXO AF	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima do complexo proteassomal 26S no músculo sóleo.....	121
ANEXO AG	-	Dados numéricos referentes à atividade máxima do complexo proteassomal 26S no músculo plantar.....	122
ANEXO AH	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de proteínas ubiquitinadas no músculo sóleo.....	123
ANEXO AI	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de proteínas ubiquitinadas no músculo plantar.....	124
ANEXO AJ	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de proteínas oxidadas no músculo sóleo.....	125
ANEXO AL	-	Dados numéricos referentes ao conteúdo de proteínas oxidadas no músculo plantar.....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
CoA	Coenzima A
DC	Débito cardíaco
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
DTNB	5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
G6PDH	Glicose-6 fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa
GSSG	Dissulfeto de glutaciona (ou glutaciona oxidada)
HCl	Ácido clorídrico
HRP	Horseradish peroxidase
IC	Insuficiência cardíaca
IM	Infarto do miocárdio
INF-SED	Grupo de animais infartados sedentários
INF-TC	Grupo de animais infartados submetidos ao treinamento físico aeróbio contínuo em intensidade moderada
INF-TI	Grupo de animais infartados submetidos ao treinamento físico aeróbio intervalado em alta intensidade
LLVY	Leucina-Leucina-Valina-Tirosina
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
PBS	Phosphate buffered saline
PCr	Fosfato de creatina
PPVED	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPVES	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
SHAM	Grupo de animais com cirurgia fictícia
SIVD	Septo inter-ventricular em diástole
SIVS	Septo inter-ventricular em sístole
SOD	Superóxido dismutase
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
TFA	Treinamento físico aeróbio
VO <sub>2</sub> máx	Consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE APÊNDICES</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Prejuízos da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Papel do estresse oxidativo na regulação da estrutura e função musculares</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Sistema ubiquitina-proteassoma e atrofia muscular</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4 Treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Treinamento físico aeróbio em alta intensidade na insuficiência cardíaca</b> .....	<b>29</b>
<b>5 MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1 Desenho experimental</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2 Modelo animal</b> .....	<b>31</b>
<b>5.3 Função cardíaca</b> .....	<b>32</b>
<b>5.4 Tolerância ao esforço físico</b> .....	<b>32</b>
<b>5.5 Potência aeróbia máxima (VO<sub>2</sub>máx)</b> .....	<b>33</b>
<b>5.6 Protocolos de treinamento físico aeróbio</b> .....	<b>33</b>
<b>5.7 Coleta dos tecidos</b> .....	<b>34</b>
<b>5.8 Estrutura da musculatura esquelética</b> .....	<b>34</b>
<b>5.9 Avaliação metabólica da musculatura esquelética</b> .....	<b>35</b>
<b>5.9.1 Citrato sintase (EC 2.3.3.1)</b> .....	<b>35</b>
<b>5.9.2 Hexoquinase (EC 2.7.1.1)</b> .....	<b>36</b>
<b>5.9.3 Glicôgênio intramuscular</b> .....	<b>38</b>

<b>5.10</b>	<b>Balanço redox na musculatura esquelética .....</b>	<b>39</b>
5.10.1	Superóxido dismutase ( <i>EC 1.15.1.1</i> ) .....	39
5.10.2	Catalase ( <i>EC 1.11.1.6</i> ) .....	40
5.10.3	Estado redox da glutatona .....	41
<b>5.11</b>	<b>Sistema ubiquitina-proteassoma .....</b>	<b>42</b>
5.11.1	Conteúdo de proteínas oxidadas .....	42
5.11.2	Conteúdo de proteínas ubiquitinadas .....	42
5.11.3	Atividade do complexo proteassomal 26S .....	43
<b>5.12</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>6.1</b>	<b>Medidas ecocardiográficas.....</b>	<b>45</b>
<b>6.2</b>	<b>Parâmetros fisiológicos.....</b>	<b>49</b>
6.2.1	Massa corporal.....	49
6.2.2	Massa cardíaca.....	49
6.2.3	Pulmões e fígado .....	50
<b>6.3</b>	<b>Tolerância ao esforço físico.....</b>	<b>51</b>
<b>6.4</b>	<b>Potência aeróbia máxima .....</b>	<b>53</b>
<b>6.5</b>	<b>Avaliação metabólica da musculatura esquelética .....</b>	<b>54</b>
6.5.1	Citrato sintase .....	54
6.5.2	Hexoquinase .....	55
6.5.3	Conteúdo de glicogênio intramuscular .....	56
<b>6.6</b>	<b>Morfologia da musculatura esquelética.....</b>	<b>57</b>
6.6.1	Massa muscular .....	57
6.6.2	Área de secção transversa e distribuição de fibras musculares .....	59
<b>6.7</b>	<b>Estado redox da musculatura esquelética .....</b>	<b>62</b>
6.7.1	Superóxido dismutase.....	62
6.7.2	Catalase.....	63
6.7.3	Estado redox da glutatona .....	63
<b>6.8</b>	<b>Sistema ubiquitina-proteassoma .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7.1</b>	<b>Variáveis fisiológicas, parâmetros cardiovasculares e capacidade funcional.....</b>	<b>69</b>
<b>7.2</b>	<b>Musculatura esquelética.....</b>	<b>72</b>

<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente incidência de doenças cardiovasculares nas últimas décadas atraiu grande atenção da comunidade científica, dado o grande impacto gerado aos sistemas de saúde pública por estas que são a principal causa de morte na espécie humana (LOPEZ-JARAMILLO, 2008; YAZDANYAR e NEWMAN, 2009). Dentre as principais causas de doenças cardiovasculares 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 tecidual e severa disfunção cardíaca, o que pode culminar na instalação do quadro de insuficiência cardíaca (IC) (AMERICA, 2006; ZANNAD et al., 2008).

A repercussão sistêmica da disfunção cardíaca induzida pelo IM pode incidir sobre vários tecidos do organismo, incluindo pulmões, fígado, rins e a musculatura esquelética (SIMKO e SIMKO, 1996; GORDON e VOIPIO-PULKKI, 1997), sendo este último objeto de estudo do presente estudo. A redução crônica do débito cardíaco (DC) observada em situação de isquemia miocárdica compromete a perfusão sanguínea da musculatura apendicular, podendo assim promover importantes alterações morfofuncionais capazes de agravar o prognóstico da doença, uma vez a capacidade funcional dos pacientes depende em grande parte do bom funcionamento do sistema muscular esquelético (CLARK, POOLE-WILSON e COATS, 1996). De fato, foi demonstrado que apesar da respeitável disfunção cardíaca observada em pacientes com IC, os prejuízos sofridos pela musculatura esquelética nesses pacientes apresentam correlação ainda mais forte com a capacidade de realização dos mesmos (LANG et al., 1997).

Considerando tal contexto, ressaltamos o importante papel do treinamento físico aeróbio (TFA) na prevenção e terapêutica dos prejuízos provocados pela IC na musculatura esquelética, uma vez que recursos farmacológicos atualmente disponíveis se mostram incapazes de aprimorar a capacidade de realização de esforço e a potência aeróbia máxima ( $VO_{2máx}$ ) de pacientes, apesar de melhorarem significativamente a função cardíaca dos mesmos. Já o TFA, embora promova efeitos cardiovasculares em menor magnitude em comparação ao tratamento farmacológico, é altamente eficaz em aprimorar a capacidade funcional e a potência aeróbia máxima em pacientes com IC (FRAGA et al., 2007), sendo



estes os principais indicadores do prognóstico da IC, segundo a *New York Heart Association* (NYHA).

Apesar de os benefícios cardiovasculares e músculo-esqueléticos do TFA em intensidade moderada estarem bem descritos na literatura, inclusive em trabalhos de nosso grupo (BACURAU et al., 2009; BUENO et al., 2010), relatos recentes sugerem que o TFA em alta intensidade seja capaz de promover efeitos cardiovasculares superiores aos protocolos em intensidade moderada (WISLOFF et al., 2007). Dadas estas considerações, testamos no presente estudo a hipótese de que o TFA em alta intensidade promoveria benefícios superiores na musculatura esquelética em ratos infartados, quando comparado com um protocolo isocalórico realizado em intensidade moderada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Geral*

Avaliar os efeitos do TFA em alta intensidade na musculatura de ratos infartados, comparando-os com aqueles promovidos por protocolo isocalórico em intensidade moderada.

### 2.2 *Específicos*

Avaliar em ratos saudáveis submetidos a cirurgia fictícia (SHAM) ou infartados (INF), sedentários ou treinados em protocolo de TFA em alta intensidade ou intensidade moderada:

- A função e a estrutura cardíacas;
- A tolerância ao esforço físico;
- A potência aeróbia máxima ( $VO_{2máx}$ );
- A massa dos músculos sóleo e plantar;
- A área de secção transversa das fibras musculares dos músculos sóleo e plantar;
- A distribuição dos tipos de fibras musculares nos músculos sóleo e plantar;
- A atividade máxima de enzimas relacionadas aos metabolismos aeróbio e anaeróbio, nos músculos sóleo e plantar;
- O conteúdo de glicogênio intramuscular nos músculos sóleo e plantar;
- A atividade máxima de enzimas antioxidantes nos músculos sóleo e plantar;
- O estado redox da glutathiona nos músculos sóleo e plantar

- A marcação de proteínas para degradação (ubiquitinação) em lisado citosólico dos músculos sóleo e plantar;
- A atividade máxima do complexo proteassomal 26S em lisado citosólico dos músculos sóleo e plantar;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Prejuízos da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca*

Apesar de sua origem cardiovascular, a IC pode desencadear um quadro de falência energética em diversos tecidos do organismo, incluindo a musculatura esquelética. Diversos estudos demonstraram que os prejuízos apresentados por este tecido na IC apresentam grande relevância clínica, uma vez que a capacidade funcional de pacientes com IC encontra-se significativamente correlacionada com parâmetros funcionais e morfológicos da musculatura esquelética, sendo esta correlação mais alta do que aquela apresentada entre a função cardíaca e a tolerância ao esforço físico dos mesmos pacientes (HARRINGTON et al., 1997).

Considerando, portanto, a importante contribuição da musculatura apendicular para a capacidade funcional de pacientes com IC, diversos grupos de pesquisa se propuseram a investigar mais a fundo os prejuízos promovidos pela IC ao tecido muscular esquelético. Com isso, alterações morfológicas, metabólicas e funcionais foram identificadas em pacientes e/ou modelos experimentais de IC, de forma que nem sempre se manifestam em conjunto.

Do ponto de vista estrutural, foi observada rarefação capilar, redução da porcentagem de fibras do tipo I (lentas e mais resistentes à fadiga) e atrofia muscular, alterações que ocorrem em boa parte de pacientes com IC (CLARK, POOLE-WILSON e COATS, 1996). Considerando esses achados, parte importante do presente estudo consistiu na avaliação morfológica da musculatura esquelética dos animais incluídos no estudo.

Quando nos voltamos ao metabolismo da célula muscular esquelética, encontramos que a IC pode promover prejuízos na capacidade de geração de energia tanto pelo metabolismo aeróbio quanto anaeróbio (METTAUER et al., 2006). Nesse sentido, foi demonstrado que a reserva de fosfato de creatina (PCr) é mais rapidamente utilizada em pacientes com IC do que em indivíduos saudáveis (MASSIE et al., 1987), indicando diminuição da capacidade oxidativa da musculatura esquelética na síndrome, o que é corroborado por outros estudos (MIDDLEKAUFF, 2010). Dado isso, avaliamos também no

presente estudo, indicadores da capacidade metabólica da musculatura esquelética, sendo eles: a atividade máxima da enzima citrato sintase, que é uma das principais enzimas do metabolismo aeróbio; o conteúdo de glicogênio intramuscular, por ser um importante substrato energético durante o exercício aeróbio; a atividade máxima da enzima hexoquinase, enzima-chave do metabolismo anaeróbio.

Em princípio acreditava-se que tais anormalidades fenotípicas apresentadas pela musculatura esquelética na IC deviam-se a baixa perfusão periférica, resultante do baixo DC gerado pelo coração insuficiente. Estudos então demonstraram que aumento do DC durante o esforço por agentes farmacológicos não é suficiente para melhorar a capacidade de realização de exercício físico em pacientes com IC (MASKIN et al., 1983; DREXLER et al., 1989), ao passo que Wiener e colaboradores (WIENER et al., 1986) verificaram baixa atividade de enzimas oxidativas na musculatura esquelética de pacientes com IC com perfusão muscular preservada. Com isso, foi sugerido que a musculatura esquelética de pacientes com IC sofria alterações em mecanismos intrínsecos ao tecido, e não relacionados diretamente ao baixo fluxo sanguíneo (METTAUER et al., 2006). Além disso, a perda de massa magra foi identificada como um importante preditor de mortalidade em pacientes com IC (ANKER et al., 1997). Tais particularidades dos efeitos deletérios da IC na musculatura esquelética reforçam a importância de melhor entender o fenômeno aqui apresentado e desenvolver estratégias terapêuticas que contribuam para prevenção de sua ocorrência.

### ***3.2 Papel do estresse oxidativo na regulação da estrutura e função musculares***

Além da estrutura e metabolismo energético, mecanismos intracelulares mostram-se de grande importância para o bom funcionamento contrátil da musculatura esquelética, destacando-se o estresse oxidativo. A alteração do balanço redox na musculatura esquelética no sentido pró-oxidante induz disfunção dos miofilamentos contráteis (ANDRADE et al., 1998) e antecipação da fadiga (KUWAHARA et al., 2010), além de acelerar o processo de atrofia muscular observado no envelhecimento e outras patologias (MULLER et al., 2006). Confirmando esta relação, outros estudos demonstraram que o tratamento com antioxidantes pode atenuar a atrofia e/ou disfunção musculares em diferentes modelos (HAIDARA et al., 2003; MCCLUNG et al., 2007; GUARNIER et al., 2010). Sabe-se também que a disfunção

cardíaca pode induzir alteração do balanço redox na musculatura esquelética em humanos (LINKE et al., 2005) e modelos animais (COIRAULT et al., 2007; KOBA, GAO e SINOWAY, 2009; OHTA et al., 2011), o que pode contribuir para a atrofia e disfunção musculares.

Nesse sentido, grande atenção é voltada à carbonilação/oxidação protéica, dada sua natureza irreversível (NYSTROM, 2005). Acúmulo de proteínas oxidadas foi constatado em diferentes tecidos, incluindo a musculatura esquelética, de modelos animais e humanos com doenças crônico-degenerativas (LEVINE, 2002; COIRAULT et al., 2007; DALLA LIBERA et al., 2010). Sistemas intracelulares de degradação protéica identificam e eliminam proteínas carboniladas (BREUSING et al., 2009), entretanto, caso o acúmulo desses compostos supere a capacidade da célula em degradá-los, agregados citotóxicos são formados induzindo uma série de efeitos deletérios à célula, incluindo a disfunção contrátil em miócitos esqueléticos (COIRAULT et al., 2007).

Uma vez que o balanço redox é determinado pelo equilíbrio entre vias pró- e anti-oxidantes, atenção deve ser dada também aos mecanismos responsáveis pela defesa antioxidante intracelular, que conta com importante ação das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase.

A classe de enzimas superóxido dismutase atua na catalisação da reação de dismutação de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio, competindo com reações entre  $O_2^-$  e outros alvos intracelulares, promovendo, portanto, importante defesa antioxidante (HASSAN e FRIDOVICH, 1978). Dado isso, sua ausência promove elevação substancial do estresse oxidativo, responsável por efeitos deletérios severos em diversos tecidos (GRZELAK et al., 2009; MAKINO et al., 2011; TREIBER et al., 2011). Na musculatura esquelética, a inativação gênica global de uma das isoformas da enzima SOD acelera a perda de massa muscular ocorrida com o envelhecimento e diminui a atividade locomotora espontânea de camundongos (MULLER et al., 2006). Além disso, a ablação gênica da enzima apenas no músculo esquelético é capaz de reduzir dramaticamente a capacidade de esforço físico dos animais, mesmo sem causar atrofia muscular (KUWAHARA et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados em camundongos com inativação condicional de SOD apenas nas fibras musculares do tipo IIB (LUSTGARTEN et al., 2009), confirmando o importante papel da enzima no tecido e sua relação com a capacidade de realização de esforço físico.

Presente em todas as células eucarióticas, a enzima catalase atua na conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, apresentando, portanto, importante papel antioxidante (LOEW, 1900). A importância sistêmica da enzima é evidenciada pelo aumento da sobrevivência de diferentes espécies em que a atividade da catalase foi artificialmente aumentada (MELOV et al., 2000). Foi demonstrado também que a hiper-expressão de catalase mitocondrial atenua os efeitos deletérios do envelhecimento na função e estrutura cardíacas (DAI et al., 2009). A ação protetora da catalase também foi demonstrada no músculo esquelético, uma vez que a injeção de catalase recombinante melhora significativamente a função muscular em modelo animal de distrofia de Duchenne (SELSBY, 2011). Além disso, a administração de catalase exógena promove atenuação dos efeitos deletérios causados pela isquemia seguida de reperfusão da musculatura esquelética (LEE et al., 1987).

Assim, uma vez que o balanço redox da célula muscular esquelética parece possuir papel importante também na miopatia esquelética desencadeada pela IC (OHTA et al., 2011), avaliamos no presente estudo também o perfil do estresse oxidativo na musculatura esquelética de nosso modelo animal.

### ***3.3 Sistema ubiquitina-proteassoma e atrofia muscular***

A degradação de proteínas intracelulares possui papel importante para a manutenção da homeostase do organismo, participando em uma série de processos essenciais para o bom funcionamento celular, como, por exemplo, o controle da diferenciação celular, regulação das concentrações enzimáticas e fornecimento de aminoácidos para a gliconeogênese (LECKER et al., 1999). O controle fino desses processos só é possível devido a existência de sistemas proteolíticos altamente conservados nos organismos eucarióticos, sendo eles o sistema lisossomal, o sistema proteolítico dependente de cálcio e o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP). Apesar da inegável importância dos dois primeiros sistemas, grande atenção é dada ao último, uma vez que o SUP é responsável por mais de 80% da degradação de proteínas intracelulares (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002).

O SUP atua na degradação seletiva de proteínas oxidadas ou mal-enoveladas, evitando acúmulo destas no ambiente intracelular, sendo este processo de remoção conhecido como controle de qualidade de proteínas (CQP). O sistema de reconhecimento dessas proteínas pelo SUP depende essencialmente dos seguintes componentes: as enzimas conhecidas como “ligases”, a proteína ubiquitina, o complexo proteassomal 26S e ATP (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). Inicialmente, a enzima denominada E1 é responsável pela ativação da proteína ubiquitina, num processo dependente de ATP (CIECHANOVER et al., 1981). A ubiquitina então ativada é transferida para a enzima E2 (proteína carreadora), que conjuga diversas moléculas de ubiquitina umas as outras (CIECHANOVER et al., 1980). Na sequência, a enzima E3 (proteína ligase) conjuga a sequência de ubiquitinas à proteína alvo, que é reconhecida pelo complexo proteassomal proteassomal 26S e degradada em pequenos peptídeos de 8-12 aminoácidos (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). Tal processo é ilustrado na figura a seguir:

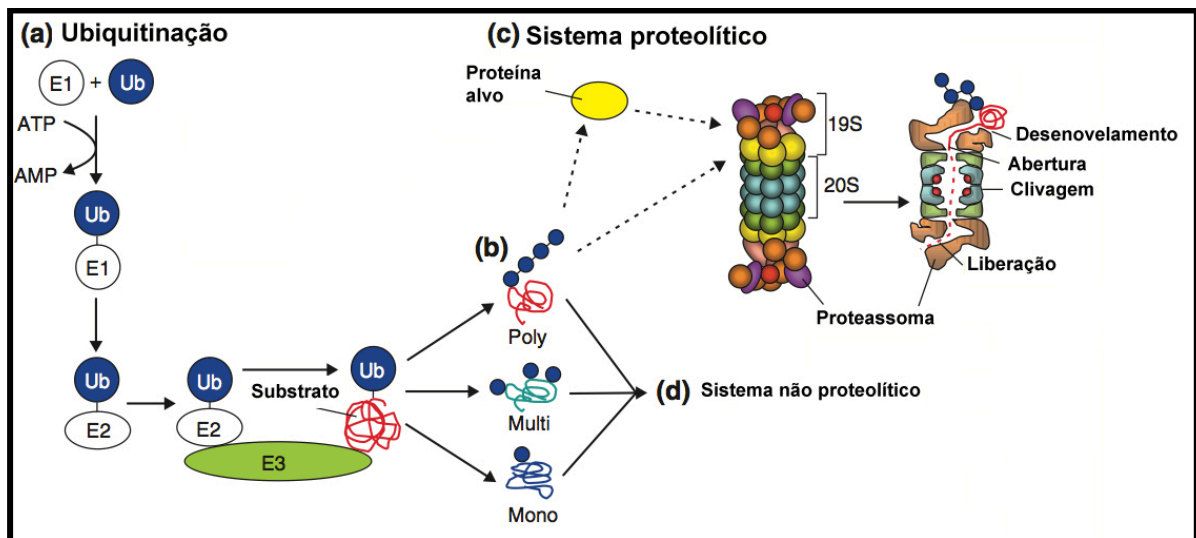


Figura 1 - Representação esquemática do sistema ubiquitina proteassoma. E1 (proteína ativadora) ativa a ubiquitina (Ub) com gasto de energia. E2 (proteína carreadora) conjuga as ubiquitinas, formando uma cauda de poliubiquitinas. E3 (proteína ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína alvo (substrato), que é posteriormente, reconhecida pelo proteassoma 26S e degradada em pequenos peptídeos (liberação). Mono: apenas uma ubiquitina. Multi: cauda com poucas ubiquitinas. Poly: cauda com várias ubiquitinas (Adaptado de (KAISER e HUANG, 2005).

O complexo proteassomal 26S é composto por duas subunidades, sendo elas denominadas 19S e 20S, devido aos seus distintos coeficientes de sedimentação. A porção



19S é responsável pelo reconhecimento da cauda de ubiquitina ligada à proteína alvo, num processo que também demanda energia (ATP). Após reconhecimento e desenovelamento, a proteína passa à subunidade 20S, que conta com três sítios catalíticos que distinguem-se entre si pela especificidade de clivagem após determinados aminoácidos (BAUMEISTER et al., 1998). As características das três subunidades são descritas a seguir:

- Sítio  $\beta 1$  (ou peptidilglutamina): cliva ligações peptídicas após ácido glutâmico;
- Sítio  $\beta 2$  (ou tripsina): degrada aminoácidos lisina e arginina próximos ao grupo C-terminal;
- Sítio  $\beta 5$  (ou quimiotripsina): degrada tirosina, triptofano e fenilalanina próximos ao grupo C-terminal; pode clivar outros aminoácidos, como a leucina, caso permaneça ativo por um longo período;

Estudos das duas últimas décadas demonstram que o SUP é ativado na musculatura esquelética em estados catabólicos, como jejum, denervação e câncer (MITCH e GOLDBERG, 1996). Sabe-se também que a ativação do sistema é necessária para que haja atrofia muscular (BODINE et al., 2001). Acredita-se que este processo atrófico ocorre devido ao desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação protéicas, favorecendo o último, com importante participação do SUP (LECKER et al., 2004), ao ponto da inibição deste sistema ser sugerida como terapia contra a miopatia esquelética (BEEHLER et al., 2006; JAMART et al., 2011).

Apesar de bastante estudado em diferentes estados patológicos, muito pouco se sabe sobre a ativação deste sistema na musculatura esquelética em pacientes e/ou modelos experimentais de IC, bem como os efeitos do TFA em diferentes intensidades.

### **3.4 *Treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca***

Até a década de 1980, diversas diretrizes indicavam que o esforço físico deveria ser evitado por pacientes com problemas cardiovasculares (COATS, 2011). A partir de 1985, relatos científicos tratando da intervenção com exercício físico em pacientes com problemas cardíacos começaram a ser publicados, e apesar da precariedade no controle sintomático e

etiológico, bem como nos protocolos de treinamento físico, os primeiros benefícios do TFA em pacientes com IC foram identificados (KELLERMANN, 1987). Resultados como melhora da capacidade de realização de exercício físico, aumento da fração de ejeção ventricular e do fluxo sanguíneo periférico foram relatados (SULLIVAN, HIGGINBOTHAM e COBB, 1988; SULLIVAN, HIGGINBOTHAM e COBB, 1989), entretanto, estudos mais bem controlados, com respectivos grupos controle e controle de intensidade eram necessários a fim de melhor entender as adaptações promovidas pela intervenção.

Dada esta necessidade, iniciaram-se os primeiros estudos clínicos controlados e randomizados, que já consideravam diferentes etiologias de IC, classe funcional, medicamentos utilizados e a intensidade de exercício realizada pelos pacientes (COATS et al., 1990; DAVEY et al., 1992). Esses estudos confirmaram que o TFA de fato era capaz de melhorar as funções, cardíaca e pulmonar, o balanço autonômico e neuro-humoral, bem como importantes parâmetros vasculares periféricos em pacientes com IC, o que culminava na melhora de indicadores de qualidade de vida (ADAMOPOULOS et al., 1993; PIEPOLI et al., 1996; STOLEN et al., 2003). Tais estudos, apesar de apresentarem fortes evidências tratando dos benefícios dos TFA na IC, ainda eram restritos a determinados centros de pesquisa e eram realizados em pequenos grupos populacionais, carecendo, portanto, de suporte científico em relação a eventos mais raros e adversos, como morte súbita, complicações agudas ou do quadro clínico dos pacientes.

No intuito de investigar efeitos mais duradouros e em larga escala populacional, grandes estudos clínicos com recrutamento de centenas de pacientes proveram dados com forte poder epidemiológico. Além de confirmar os achados apresentados pelos estudos supracitados, como aumento do  $VO_{2\text{máx}}$ , da capacidade de realização de esforço e melhora da função cardíaca, os estudos com grandes populações demonstraram que o TFA é capaz de diminuir o número e a duração de internações por complicações do quadro clínico, bem como reduzir a necessidade de transplantes cardíacos, além de melhorar a classe funcional e aumentar significativamente a sobrevida dos pacientes com IC (AUSTIN et al., 2005; DRACUP et al., 2007; GEROVASILI et al., 2009). Dada a consistência e a relevância clínica desses achados, o treinamento físico passou de não recomendado a componente importante no tratamento da IC.

Assim, diversos centros de pesquisa passaram a investigar os mecanismos que

contribuem para a melhora da capacidade funcional dos indivíduos submetidos ao TFA. Uma vez que o  $VO_{2m\acute{a}x}$  é determinado tanto pela oferta sanguínea pelo DC, quanto pela capacidade da musculatura esquelética em extrair oxigênio e nutrientes do sangue ofertado (equação de Fick<sup>1</sup>), verificou-se que, além dos benefícios cardiovasculares, as adaptações da musculatura esquelética contribuem em grande parte para o aprimoramento da tolerância ao esforço em pacientes e modelos experimentais de IC submetidos ao TFA. Dentre essas adaptações destacam-se aumento da atividade de enzimas oxidativas (STRATTON et al., 1994), melhora do transiente de cálcio intracelular (BUENO et al., 2010), prevenção da atrofia muscular e aumento da porcentagem de fibras do tipo I (BACURAU et al., 2009), o que culmina em melhora do perfil metabólico e funcional do tecido muscular esquelético, contribuindo assim para aumento do  $VO_{2m\acute{a}x}$  e da tolerância ao esforço físico (KEMI et al., 2007).

### ***3.5 Treinamento físico aeróbio em alta intensidade na insuficiência cardíaca***

Apesar dos benefícios cardiovasculares e músculo-esqueléticos promovidos pelo TFA estarem bem descritos na literatura, muita discussão ainda existe em relação a intensidade de exercício capaz de desencadear os melhores resultados sem expor o paciente a grandes riscos cardiovasculares. De fato, a vasta maioria dos estudos observaram resultados muito interessantes após protocolos de TFA em intensidade moderada (50-70% do  $VO_{2m\acute{a}x}$  ou  $FC_{m\acute{a}x}$ ), em conjunto com baixa incidência de eventos cardiovasculares agudos desencadeados pelo exercício físico, fazendo com que a diretriz atual do Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM, (1998)) proponha que tal modalidade seja a mais indicada para pacientes com IC. Apesar disso, estudos recentes demonstram resultados promissores do treinamento físico realizado em alta intensidade, em modelos animais e humanos, saudáveis ou com acometimentos cardiovasculares.

Sabe-se que a partir de certa intensidade de esforço o metabolismo anaeróbio passa a ser mais requisitado, e devido a baixa capacidade desse sistema em manter a produção

---

<sup>1</sup>  $VO_{2m\acute{a}x} = DC \times \text{dif. a-v}O_2$ . A equação de Fick representa os fatores cardiovasculares centrais e periféricos que determinam a potência aeróbia máxima ( $VO_{2m\acute{a}x}$ ), sendo eles: o débito cardíaco (DC) e a diferença artério-venosa de oxigênio (dif. a-v $O_2$ ).

energética por longos períodos, atividades em altas intensidades não podem ser mantidas por muito tempo. Assim, os protocolos de TFA em alta intensidade aqui apresentados foram realizados de maneira intermitente (ou intervalada), ou seja, períodos de exercício em alta intensidade, muitas vezes em intensidade superior ao limiar de lactato, seguido de períodos de recuperação em menores intensidades, garantindo a continuidade da execução.

Gibala e colaboradores. (GIBALA et al., 2006) demonstraram que apenas seis sessões de treinamento intervalado em alta intensidade (com intervalos acima de 90% do  $VO_{2\text{pico}}$ ) foram capazes de aumentar o tempo até a exaustão de indivíduos jovens e saudáveis, em mesma intensidade absoluta, o que não foi observado após seis sessões de treinamento contínuo em intensidade moderada (65% do  $VO_{2\text{pico}}$ ), com carga total de trabalho equalizada. Não se limitando a indivíduos saudáveis, foi demonstrada a superioridade do treinamento em alta intensidade em pacientes com doença da artéria coronária, que apresentaram maior potência aeróbia quando comparados com o grupo que realizou treinamento em intensidade moderada. Além do  $VO_{2\text{pico}}$ , parâmetros cardiovasculares também melhoraram em maior magnitude no grupo de pacientes submetidos ao protocolo de TFA em alta intensidade (ROGNMO et al., 2004). De forma semelhante, pacientes com IC foram submetidos a protocolos de TFA moderado (60-65% do  $VO_{2\text{pico}}$ ) ou em alta intensidade (picos a 85-90% do  $VO_{2\text{pico}}$ ), e os resultados foram comparados. O grupo treinado em alta intensidade apresentou maior potência aeróbia e melhor função ventricular e endotelial quando comparado com o grupo treinado em intensidade moderada (WISLOFF et al., 2007). Os achados não foram relatados apenas em pacientes com acometimentos cardiovasculares. Indivíduos com síndrome metabólica também foram submetidos a diferentes protocolos de treinamento com carga total equalizada e aqueles que realizaram TFA intervalado em alta intensidade também apresentaram resultados superiores (TJONNA et al., 2008).

Considerando esses achados, a hipótese do presente trabalho foi de que o TFA intervalado em alta intensidade promoveria efeitos superiores ao protocolo contínuo em intensidade moderada, na musculatura esquelética em ratos infartados.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 *Desenho experimental*

Ratos Wistar machos com oito semanas de idade (250-300g) foram aleatoriamente divididos entre os grupos: infartado (INF) ou saudável (SHAM). Nesse momento, os animais foram submetidos à cirurgia de indução de IM ou cirurgia fictícia (SHAM). Quatro semanas após os procedimentos cirúrgicos, os ratos infartados foram alocados dentre os grupos: infartado sedentário (INF-SED), infartado submetido ao TFA contínuo em intensidade moderada (INF-TC) ou infartado submetido ao TFA intervalado em alta intensidade (INF-TI). Neste ponto temporal (4 semanas pós-cirurgia), os três grupos infartados foram divididos de forma que a função cardíaca e demais parâmetros fisiológicos fossem similares entre os mesmos. Oito semanas após o início dos protocolos de TFA, todos os animais foram sacrificados e estudados (doze semanas após os procedimentos cirúrgicos). Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum*, e foram mantidos em biotério com temperatura controlada (22-25°C) e ciclo claro-escuro invertido (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.

### 5.2 *Modelo animal*

Utilizamos no presente estudo modelo animal de IM induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior (JOHNS e OLSON, 1954). Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, *ip*) e quetamina (50mg/kg, *ip*), entubados e artificialmente ventilados (70 pulsos/minuto; 2,5 mL/pulso). Na sequência foi realizada incisão torácica e ligadura da artéria coronária. Ao final do procedimento o tórax foi fechado e os gases remanescentes em seu interior retirados para reestabelecimento do diferencial pressórico de gases, permitindo a respiração natural dos animais. Os animais do grupo SHAM foram submetidos a procedimento cirúrgico de mesma duração, mimetizando o

estresse cirúrgico. As avaliações *in vivo* foram iniciadas quatro semanas após os procedimentos cirúrgicos. O sacrifício dos animais foi realizado 12 semanas após as cirurgias, os tecidos foram dissecados e estudados de acordo com os objetivos específicos do presente projeto.

### **5.3 Função cardíaca**

A avaliação da função cardíaca foi avaliada por ecocardiograma em modo M, quatro e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos. Os exames foram realizados em colaboração com o Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, *ip*) e quetamina (50mg/kg, *ip*), colocados em posição supina e submetidos a tricotomia do tórax. As dimensões cardíacas foram mensuradas por ecocardiógrafo equipado com transdutor linear de 14 Mhz. A função do ventrículo esquerdo foi determinada por meio da fração de encurtamento (FE) do ventrículo esquerdo dos animais, calculada pela fórmula:  $FE (\%) = [(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100$ , sendo LVEDD a dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo (i.e. *Left Ventricular End-Diastolic Dimension*) e LVESD a dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo (i.e. *Left Ventricular End-Systolic Dimension*). As medidas ecocardiográficas seguiram recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

### **5.4 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 20 graus, sendo iniciado na velocidade de 6m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos (FERREIRA et al., 2007), até a exaustão do animal. 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).

### **5.5 Potência aeróbia máxima ( $VO_{2máx}$ )**

O  $VO_{2máx}$  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 avaliação e o  $VO_{2máx}$  foi calculado pela fórmula  $(pO_{2amb}-pO_{2máx}) \times 3500/m$ , onde  $pO_{2amb}$  representa a fração de oxigênio no ar ambiente,  $pO_{2máx}$  a fração expirada de oxigênio, 3500 o fluxo de ar em mL/min e "m" a massa corporal em quilogramas.

### **5.6 Protocolos de treinamento físico aeróbio**

Os animais foram submetidos a corrida em esteira com inclinação de 20 graus, cinco dias por semana, durante oito semanas. Ambos os grupos realizaram aquecimento de 10 minutos a 40% do  $VO_{2máx}$  antes de cada sessão de treinamento. O TFA intervalado em alta intensidade consistiu em três minutos de corrida a 60% do  $VO_{2máx}$  seguidos de quatro minutos a 85% do  $VO_{2máx}$ , repetidos setes vezes durante cada sessão (tempo total de 49 minutos). Já o TFA contínuo em intensidade moderada foi realizado a 60% do  $VO_{2máx}$  durante toda a sessão, e teve duração ajustada para equalizar o trabalho total realizado (protocolos isocalóricos), mensurado pela distância percorrida. A Figura 2 representa graficamente os dois protocolos. A velocidade de corrida foi ajustada ao final da quarta semana de treinamento físico, por meio dos testes acima descritos.

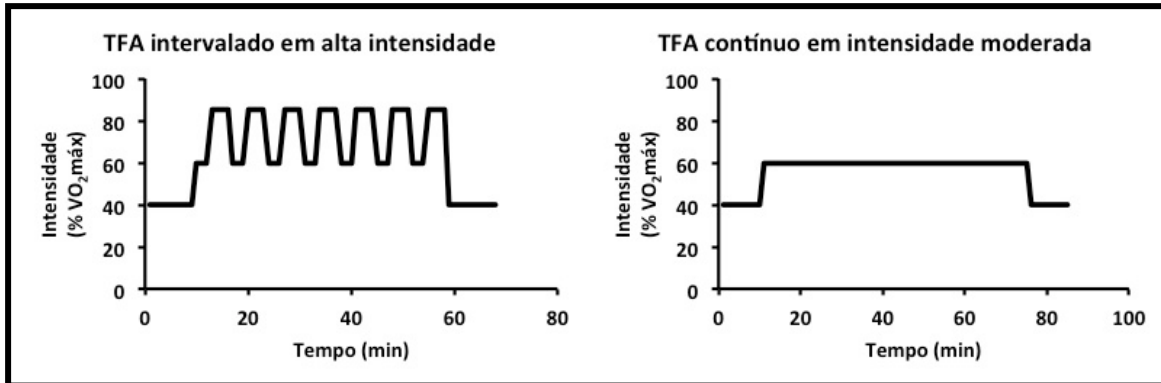


Figura 2 – Representação gráfica dos protocolos de TFA realizados no presente estudo.

### 5.7 Coleta dos tecidos

Quarenta e oito horas após as reavaliações pós-treinamento físico (12 semanas após procedimentos cirúrgicos), os animais foram sacrificados por decapitação e os músculos sóleo e plantar, 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 seriam destinados. Pulmões e fígado foram submetidos a 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, indicando presença ou não de sinais de IC.

### 5.8 Estrutura da musculatura esquelética

Parte dos músculos sóleo e plantar foi congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, para avaliação histológica da estrutura da musculatura esquelética. Tais músculos foram usados devido a distinção na distribuição dos tipos de fibras musculares, uma vez que o músculo sóleo apresenta características predominantemente oxidativas, ao passo que o músculo plantar demonstra predomínio de fibras do tipo II, cujo metabolismo predominante é o glicolítico. Os músculos foram posteriormente cortados em criostato em secções transversais de 10  $\mu$ m para processamento posterior. A avaliação da área de secção transversa e dos tipos de fibras musculares foi realizada por meio da reação para miosina



ATPase (BROOKE e KAISER, 1970). 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. A proporção dos diferentes tipos de fibras foi calculada. As imagens foram registradas em computador acoplado ao microscópio óptico e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 100x) (Leica Qwin)

### **5.9 Avaliação metabólica da musculatura esquelética**

Os ensaios foram realizados nos músculos sóleo e plantar dos animais incluídos no presente estudo. A metodologia utilizada, bem como padronizações e adaptações dos protocolos estão descritas abaixo.

#### **5.9.1 Citrato sintase (EC 2.3.3.1)**

O bom funcionamento de enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, como as enzimas mitocondriais envolvidas no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), é um importante indicativo da capacidade de geração de energia pelo metabolismo aeróbio. A enzima citrato sintase catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, quando acetil-coenzima A (acetil-CoA) é condensada com oxaloacetato, formando citrato e coenzima A (CoA). Tal reação é um passo determinante da velocidade de todo o ciclo de Krebs e, conseqüentemente, da formação de energia pelo metabolismo aeróbio.

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'-ditio-bis 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 constituída por Tris-Base (100mM), EDTA (1mM), DTNB (0,2mM), acetil-CoA (0,1mM), Triton X-100 (1%, v:v) e

amostra. A reação foi 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 é dada em nmol de substrato consumido por minuto e os resultados foram corrigidos pela quantidade de proteína citosólica utilizada no ensaio.

O método aqui descrito foi testado em amostras de músculo esquelético de ratos Wistar, apresentando excelente correlação ( $R^2$ ) e confiabilidade (valor de p) dos dados, como ilustrado na Figura 3, que representa média  $\pm$  erro padrão de três mensurações distintas.

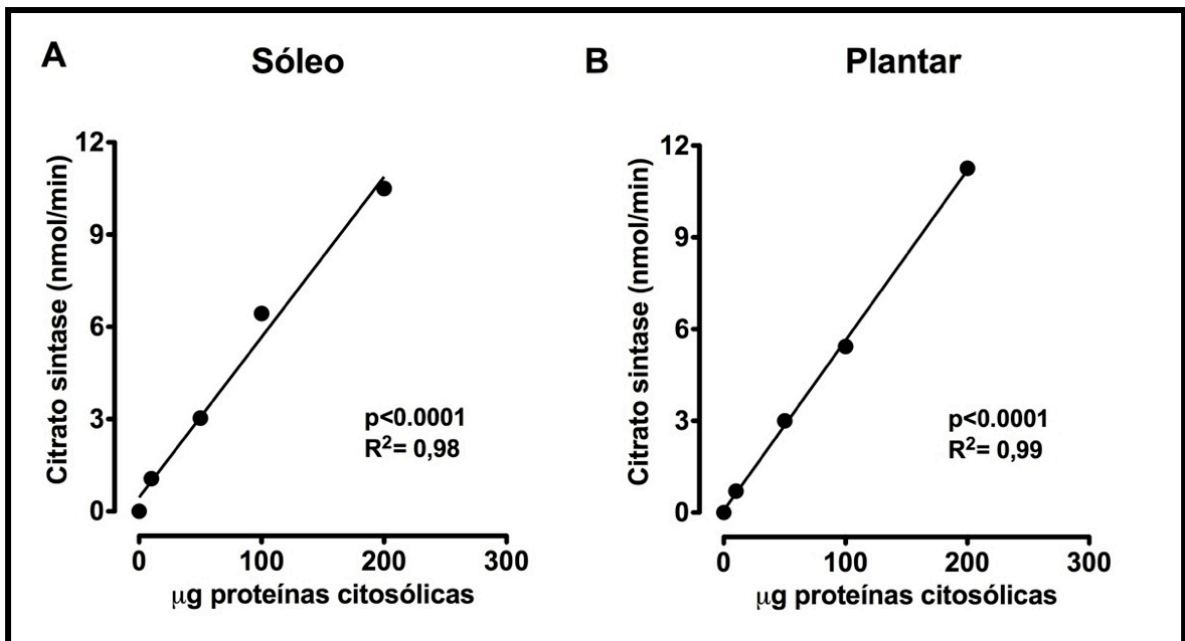


Figura 3 – Linearidade do método de mensuração da atividade máxima da enzima citrato sintase em homogenato citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).

### 5.9.2 Hexoquinase (EC 2.7.1.1)

A enzima hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose na primeira reação da via glicolítica. Sua atividade máxima foi mensurada por método baseado na formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose e sua conversão em 6-fosfogliconato, em reação catalisada pela enzima glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH), adicionada ao meio de ensaio. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) reduzida é formada pela

reação em quantidade proporcional à atividade da enzima hexoquinase e foi avaliada por absorbância em 340nm, durante 10 minutos (25°C) (ZAMMIT e NEWSHOLME, 1976). O meio de ensaio foi composto por Tris-HCl (75mM), cloreto de magnésio (7,5mM), EDTA (0,8mM), cloreto de potássio (1,5mM), mercaptoetanol (4mM), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADP<sup>+</sup>) (0,4mM), ATP (2,5mM), glicose (1mM), creatina-fosfato (1,4 U/mL), Triton X-100 (0,05%; v:v) e a amostra. A reação foi iniciada pela adição de D-glicose ao meio em concentração final de 1mM. A atividade é dada em unidades de absorbância (UA) por minuto e os resultados foram corrigidos pela quantidade de proteína citosólica utilizada no ensaio.

Testamos também a confiabilidade deste método, avaliando a atividade da enzima hexoquinase em diferentes quantidades de lisado citosólico dos músculos sóleo e plantar (Figura 4). As amostras foram analisadas em triplicatas. Observamos ótima sensibilidade do ensaio para o músculo plantar com a utilização de 25 a 400 µg de proteínas citosólicas (Figura 4B). Entretanto, para o músculo sóleo, observamos linearidade a partir de 150 µg de proteínas citosólicas (Figura 4A). Devido a isso, utilizamos 250 µg de proteínas para esse músculo a fim de garantir boa comparação dos dados entre os diferentes grupos experimentais.

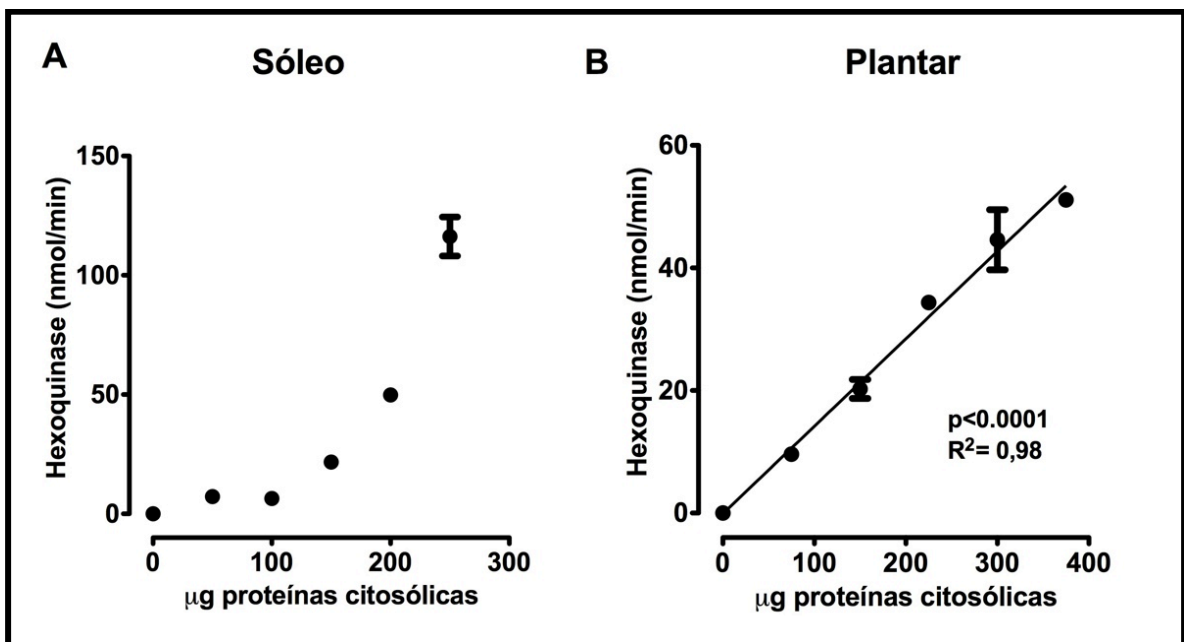


Figura 4 – Linearidade do método de mensuração da atividade máxima da enzima hexoquinase em homogenato citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).

### 5.9.3 Glicogênio intramuscular

Para dosagem do conteúdo de glicogênio intramuscular, parte da peça muscular foi digerida em solução contendo hidróxido de potássio (5,5 M) durante 30 minutos em banho fervente (100°C), seguido de precipitação com etanol (centrifugação a 1000g por 20 minutos). Na sequência a fração peletizada foi ressuspendida em ácido sulfúrico para hidrólise do glicogênio em glicose. Feito isso, a reação de antrona (1 M) com a amostra forma uma solução esverdeada que pode ser detectada por leitura de absorbância em 650 nm. O valor de absorbância foi ajustado dentro de uma curva construída com concentrações conhecidas de glicose e os resultados estão apresentados em  $\mu\text{g}$  de glicogênio por 1g de tecido.

O método em questão foi avaliado e os dados são apresentados na Figura 5. As amostras foram avaliadas em triplicatas. Detectamos excelente correlação e confiabilidade dos dados para a curva padrão de glicose e diferentes quantidades dos músculos sóleo e plantar. Utilizamos 50mg de tecido para as mensurações, dado que tal valor é intermediário quando consideramos a sensibilidade do método, ilustrada na Figura 5.

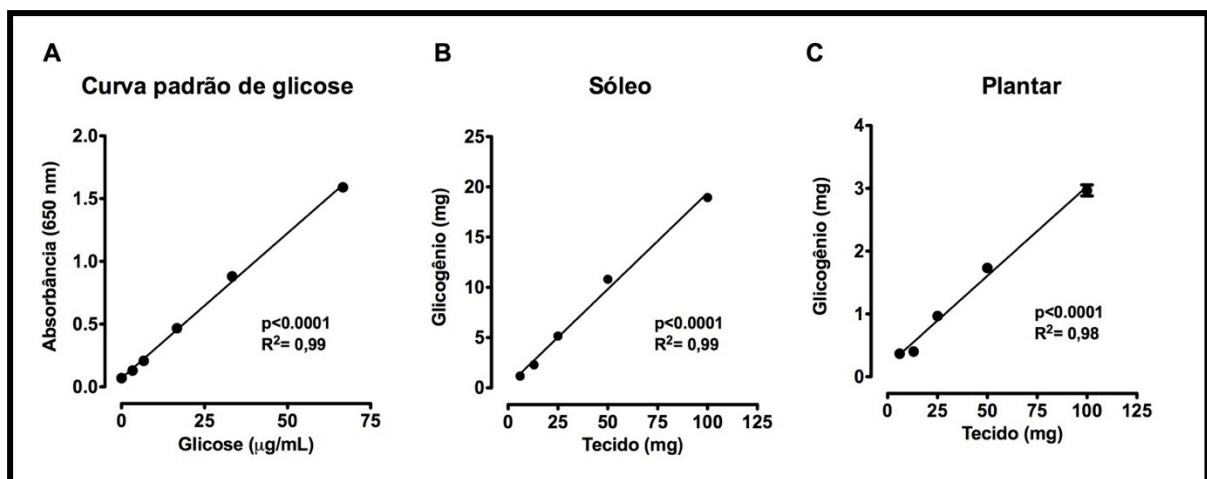


Figura 5 – Linearidade do método de mensuração de glicogênio intramuscular. Curva padrão de glicose (A), e conteúdo de glicogênio em diferentes quantidades dos músculos sóleo (B) e plantar (C).

## **5.10 Balanço redox na musculatura esquelética**

### **5.10.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)**

A atividade da enzima em questão 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 + inibidor de protease [1:100, v:v]) 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 absorvância 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 velocidade de redução de citocromo C de 0,025 unidades de absorvância 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.

O presente método foi testado em nosso laboratório e os dados estão apresentados na Figura 6. Diferentes quantidades de proteínas citosólicas dos músculos sóleo e plantar foram testadas e verificamos que para o músculo sóleo, a sensibilidade do método encontra-se entre 0 e 80 µg de proteínas citosólicas da amostra testada (Figura 6A). No músculo plantar, mesmo 160 µg não foram capazes de inibir completamente a redução de citocromo C (Figura 6B). Utilizamos, portanto, 40 µg de proteínas citosólicas para ambos os músculos, por se tratar de uma concentração que se enquadra dentro da sensibilidade apresentada pelo método nas condições de nosso laboratório.

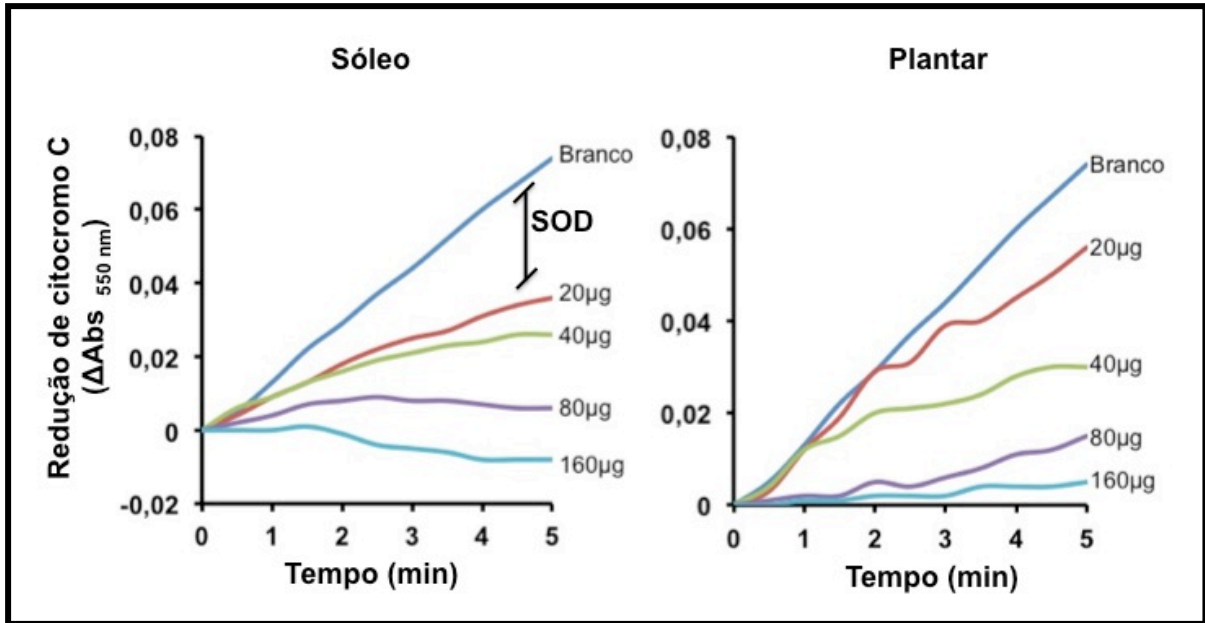


Figura 6. Inibição da redução de citocromo C pela enzima SOD presente em lisado citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).

#### 5.10.2 Catalase (*EC 1.11.1.6*)

A atividade da catalase foi avaliada pelo acompanhamento da decomposição de peróxido de hidrogênio adicionado às amostras dos músculos sóleo e plantar, por meio de leitura de absorbância em 240nm. Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA + inibidor de protease [1:100, v:v]) e centrifugados a 12000g durante 15 minutos (4°C). A fração sobrenadante corresponde ao lisado citosólico das amostras e 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.

A Figura 7 ilustra a linearidade apresentada pelo método, testado em nosso laboratório. Utilizamos 75 µg de proteínas citosólicas, valor intermediário dentro da sensibilidade do método, possibilitando a detecção de variações positivas ou negativas na atividade da enzima catalase.

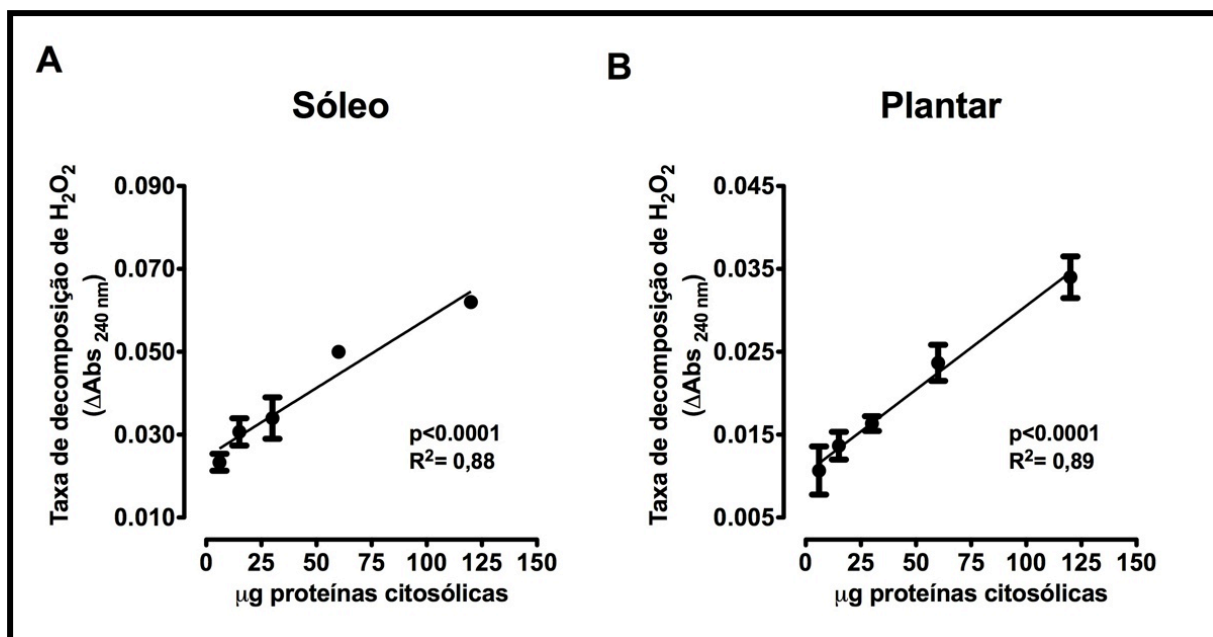


Figura 7 – Linearidade do método de mensuração da atividade da enzima catalase em lisado citosólico dos músculos sóleo (A) e plantar (B).

### 5.10.3 Estado redox da glutathiona

Aproximadamente 15mg dos músculos sóleo e plantar foram homogeneizados em tampão fosfato (100mM, pH 7,0) e centrifugados a 14000rpm por 10min a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com ácido sulfosalicílico (concentração final de 2,5%). Utilizamos o *Glutathione Fluorescent Detection Kit* (Arbor Assays) para dosagem do estado redox da glutathiona. O ensaio é baseado no reconhecimento do grupo tiol presente em moléculas de glutathiona da amostra pelo composto ThioStar®. A ligação deste composto à molécula de glutathiona forma uma substância altamente fluorescente ( $\lambda_{exc}$  390 nm,  $\lambda_{em}$  510 nm), que é detectada em placas de 96 poços por um fluorímetro. Inicialmente, o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi mensurado. Na sequência a mesma amostra foi incubada com composto que converte todo o conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) em GSH, promovendo nova reação com o composto ThioStar®, gerando o sinal fluorescente que representa o conteúdo total de glutathiona. Uma curva com concentrações conhecidas de GSH foi utilizada como padrão. Estes resultados nos permitem calcular também o conteúdo de GSSG, utilizando a seguinte fórmula:  $GSSG = (GSH \text{ Total} - GSH \text{ Reduzida}) / 2$ .

## 5.11 Sistema ubiquitina-proteassoma

### 5.11.1 Conteúdo de proteínas oxidadas

Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA + inibidor de protease [1:100, v:v]), na proporção 1:5 (massa:volume) e centrifugados (12000g, 4° C, 15 minutos) para obtenção da fração citosólica. Na sequência o lisado (50 µg) foi incubado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) durante 15 minutos, promovendo a reação de DNPH com grupos carbonila presentes nas proteínas, formando uma ligação covalente. As amostras foram então submetidas a eletroferese em gel (10% acrilamida) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo por incubação com albumina (BSA, 5%, m:v), as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra dinitrofenil (DNP) (1 hora, temperatura ambiente, em solução contendo 5% BSA, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6), que foi posteriormente reconhecido por anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (*horseradish peroxidase*), permitindo sua detecção (ChemiDoc, BioRad) e quantificação após reação quimioluminescente com luminol e peróxido de hidrogênio. Os resultados foram corrigidos pelos valores de uma amostra controle presente em todos os géis, bem como pela coloração da membrana com 0,5% Ponceau S, garantindo comparação fidedigna entre amostras corridas em diferentes géis e minimizando possíveis erros de pipetagem, respectivamente. Os dados estão apresentados como porcentagem do grupo SHAM.

### 5.11.2 Conteúdo de proteínas ubiquitinadas

Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA + inibidor de protease [1:100, v:v]), na proporção 1:5 (massa:volume) e centrifugados (12000g, 4° C, 15 minutos) para obtenção da fração citosólica. Na sequência o lisado foi preparado com SDS (0,8%, m:v), β- mercaptoetanol (200mM), azul de bromofenol (0,02%, m:v) e glicerol (40%, m:v). As amostras foram então submetidas a eletroferese em gel (10%



acrilamida) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo por incubação com albumina (BSA, 5%, m:v), as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra ubiquitina (1 hora, temperatura ambiente, em solução contendo 5% BSA, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6), que foi posteriormente reconhecido por anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (*horseradish peroxidase*), permitindo sua detecção quimioluminescente (ChemiDoc, BioRad) após reação quimioluminescente com luminol e peróxido de hidrogênio. Os resultados foram corrigidos pelos valores de uma amostra controle presente em todos os géis, bem como pela coloração da membrana com 0,5% Ponceau S, garantindo comparação fidedigna entre amostras corridas em diferentes géis e minimizando possíveis erros de pipetagem, respectivamente. Os dados estão apresentados como porcentagem do grupo SHAM.

### 5.11.3 Atividade do complexo proteassomal 26S

O ensaio de atividade do complexo proteassomal 26S é baseado na clivagem de um peptídeo (sequência: Leu-Leu-Val-Tyr [LLVY]), substrato do sítio catalítico quimiotripsina. O peptídeo é comercializado conjugado à sonda fluorescente 7-Amino-4-Methylcoumarina (AMC), e quando clivado pelo complexo proteassomal emite fluorescência. Portanto, o ensaio foi realizado na presença de Tris (25mM), MgCl<sub>2</sub> (5mM), ATP (25μM) e o substrato (25μM) (pH 7,4, 200μL volume final). Utilizamos 25μg de proteínas citosólicas no ensaio (preparação da amostra como descrito acima, sem adição de inibidores de protease). A fluorescência da amostra foi acompanhada a 37°C, sendo 350nm e 440nm as frequências de excitação e emissão, respectivamente. O ensaio foi realizado na presença e na ausência do inibidor específico do proteassoma, epoxomicina (20μM), e a diferença entre as duas taxas de emissão de fluorescência foi atribuída ao complexo proteassomal 26S presente na amostra.

### ***5.12 Análise estatística***

Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Utilizamos o teste de Shapiro-Wilks para verificação de distribuição normal dos dados. Os dados de função cardíaca, tolerância ao esforço e  $VO_{2\text{máx}}$  foram comparados entre os grupos experimentais por ANOVA de uma via (ANOVA) para medidas repetidas. Para as outras comparações, utilizamos ANOVA de uma via. Em caso de significância foi utilizado o post hoc de Duncan. Como nível de significância foi adotado  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

Apresentaremos a seguir os dados relacionados aos efeitos do TFA em alta intensidade na musculatura esquelética de ratos infartados, sendo esses efeitos comparados com aqueles promovidos pelo TFA em intensidade moderada. Todos os experimentos foram realizados tanto no músculo sóleo quanto no músculo plantar, uma vez que tais músculos diferem entre si pela composição dos tipos de fibras musculares, bem como pelo metabolismo energético, e uma vez que estas variáveis são de grande interesse no presente projeto, julgamos importante a comparação dos resultados em músculos de características diferentes.

### 6.1 *Medidas ecocardiográficas*

No intuito de verificar o grau de disfunção ventricular esquerda nos animais submetidos ao IM, bem como os efeitos dos diferentes protocolos de treinamento nesses animais, realizamos avaliação ecocardiográfica nos animais quatro e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos.

Somente animais infartados com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo inferior a 35% no período pré-protocolo foram incluídos no estudo. Dessa forma 27% dos animais infartados sobreviventes foram descartados. Como esperado, os animais infartados apresentaram perda significativa da função contrátil quatro semanas após as cirurgias (Figura 8, PRÉ-PROTOCOLO).

Além de nos prover de um importante índice de função ventricular sistólica (fração de encurtamento ventricular), o exame ecocardiográfico também nos permite mensurar as dimensões da bomba cardíaca, sendo estes parâmetros fundamentais para a detecção de remodelamento cardíaco patológico, muito comum após o IM e comumente observado em modelos experimentais e pacientes com IC. Nesse sentido, dilatação da câmara ventricular esquerda também foi observada nos animais infartados naquele momento (quatro semanas pós-IM), pelos diâmetros ventriculares aumentados nos três grupos infartados, tanto ao final

da sístole quanto da diástole. Além disso, verificamos estreitamento do septo interventricular em sístole nos três grupos de animais infartados (Tabela 1).

Após estratificação dos dados de função cardíaca, os animais foram alocados nos grupos sedentário, submetidos ao TFA contínuo em intensidade moderada ou submetidos ao TFA intervalado em alta intensidade, de forma que os parâmetros ecocardiográficos fossem similares entre os grupos de mesma condição cardíaca (INF-SED, INF-TC e INF-TI) (Tabela 1). Esta constatação é fundamental no presente trabalho, dado que os animais seriam submetidos a diferentes intervenções (repouso vs. TFA em intensidade moderada vs. TFA em alta intensidade), sendo que o fenótipo dos ratos ao final do protocolo seria influenciado não apenas por dadas intervenções, mas também pelo grau de disfunção/remodelamento cardíaco apresentados pelos mesmos no período pré-protocolo. Assim, a certeza de que os três grupos infartados partiram de um grau semelhante de disfunção ventricular no início do estudo nos garantiu que as possíveis diferenças entre os mesmos ao final do protocolo experimental seriam devido a intervenção aplicada.

Após oito semanas do protocolo experimental, a função cardíaca dos animais foi reavaliada por mesmo observador, cego para os grupos experimentais.

Tabela 1 - Parâmetros ecocardiográficos

	SHAM		INF-SED		INF-TC		INF-TI	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
DSFVE, mm	4,82 ± 0,40	4,94 ± 0,35	7,56 ± 0,38 A	7,39 ± 0,62 A	7,04 ± 0,32 A	5,42 ± 0,48 C	7,12 ± 0,37 A	6,04 ± 0,50 C
DDFVE, mm	7,68 ± 0,39	8,05 ± 0,42	9,46 ± 0,32 A	9,4 ± 0,45 D	9,14 ± 0,31 A	8,26 ± 0,45	9,15 ± 0,34 A	8,69 ± 0,48
SIVS, mm	0,85 ± 0,10	1,15 ± 0,09	0,89 ± 0,05 A	1 ± 0,08 C	0,98 ± 0,06 A	1,08 ± 0,07 C	0,94 ± 0,07 A	0,90 ± 0,04 C
SIVD, mm	1,76 ± 0,22	1,89 ± 0,11	1,27 ± 0,07	1,63 ± 0,15	1,36 ± 0,11	1,83 ± 0,16	1,20 ± 0,08	1,38 ± 0,05
PPVES, mm	2,26 ± 0,06	2,4 ± 0,14	2,08 ± 0,09	2,49 ± 0,17 C	1,79 ± 0,14	2,45 ± 0,15 C	2,16 ± 0,16	2,23 ± 0,23
PPVED, mm	1,30 ± 0,05	1,38 ± 0,12	1,22 ± 0,10	1,34 ± 0,07	1,28 ± 0,05	1,30 ± 0,08	1,25 ± 0,06	1,14 ± 0,08
FC, bpm	230 ± 8	245 ± 16	256 ± 18	258 ± 17	251 ± 10	288 ± 22	230 ± 10	242 ± 8

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) e frequência cardíaca em anestesia (FC) no início (pré, quatro semanas após procedimentos cirúrgicos) e ao final (pós, 12 semanas após procedimentos cirúrgicos) do protocolo experimental. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via para medidas repetidas, seguida de post hoc de Dunca. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED; C  $p < 0,05$  vs. pré; D = 0,06 vs. SHAM;

A fração de encurtamento ventricular nos grupos SHAM e INF-SED não se alterou entre os períodos pré- e pós- protocolo, ou seja, demonstrando persistência da disfunção ventricular nos animais infartados que não realizaram treinamento físico (Figura 8). Em relação aos animais submetidos ao TFA, verificamos que os protocolos de treinamento apresentaram eficácia semelhante em aprimorar a função cardíaca dos animais infartados, uma vez que os grupos INF-TC e INF-TI apresentaram melhora significativa da função ventricular esquerda, tanto quando comparada com o período pré-treinamento físico quanto frente aos animais infartados sedentários (Figura 8). Além de reversão da disfunção cardíaca, ambos os protocolos de treinamento físico reduziram eficientemente o diâmetro da cavidade ventricular para valores semelhantes ao grupo SHAM, ao passo que o grupo INF-SED apresentou maior diâmetro ventricular em sístole e forte tendência de aumento desta variável em diástole ( $p=0,06$ ), quando comparados com o grupo SHAM (Tabela 1). Neste mesmo período (12 semanas pós-IM) observamos aumento da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo nos grupos INF-SED e INF-TC, o que não foi observado no grupo INF-TI. Os três grupos de animais infartados apresentaram aumento significativo da espessura do septo interventricular em sístole em relação ao período pré-protocolo, sem qualquer diferença significativa entre os três grupos (INF-SED, INF-TC e INF-TI).

Não observamos nenhum efeito temporal (4 vs. 12 semanas) nos parâmetros ecocardiográficos dos animais SHAM (Tabela 1).

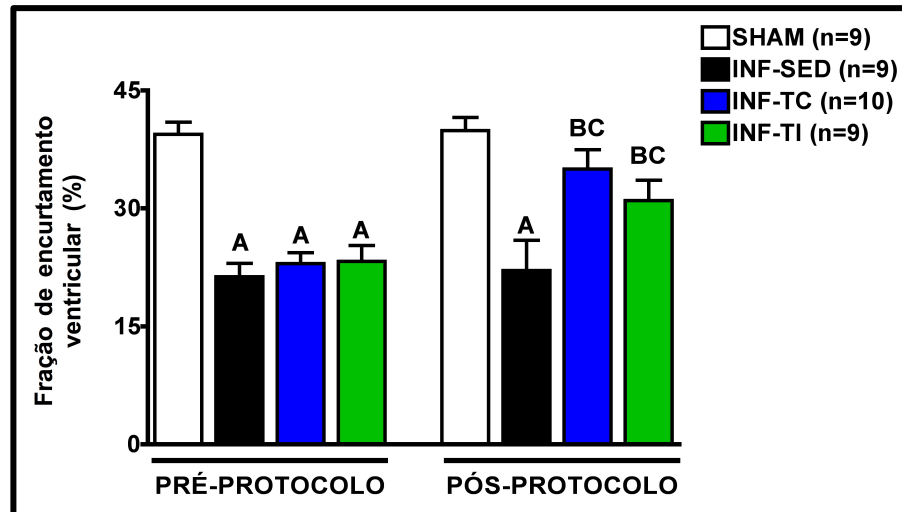


Figura 8 – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED; C  $p < 0,05$  vs. pré-protocolo.

## 6.2 Parâmetros fisiológicos

### 6.2.1 Massa corporal

A massa corporal não diferiu entre os grupos experimentais ( $441 \pm 41$ ,  $423 \pm 36$ ,  $431 \pm 18$ ,  $407 \pm 39$  g são as médias  $\pm$  erro padrão da média dos grupos SHAM, INF-SED, INF-TC e INF-TI, respectivamente,  $p > 0,05$ ).

### 6.2.2 Massa cardíaca

Como esperado e corroborando os dados ecocardiográficos, os animais infartados sedentários apresentaram aumento da massa cardíaca corrigida pela massa corporal, quando

comparados com o grupo SHAM. Somente o treinamento físico contínuo em intensidade moderada foi capaz de prevenir tal fenômeno (Figura 9B).

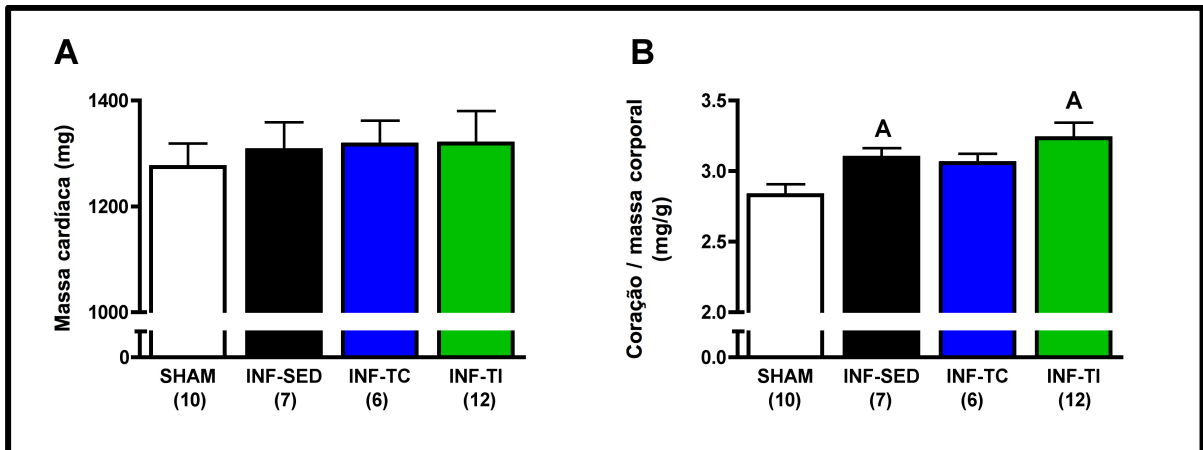


Figura 9 – Massa cardíaca (A) e massa cardíaca corrigida pela massa corporal (B). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM.

Apesar da ocorrência de aumento da massa cardíaca relativa à massa corporal do grupo INF-TI, apresentamos acima que tal grupo apresentou melhora significativa da função ventricular, dificultando a caracterização de um quadro hipertrófico patológico nesses animais.

### 6.2.3 Pulmões e fígado

O aumento da razão entre massa úmida e massa seca de pulmões e fígado tem sido utilizado como sinal clínico de IC congestiva, ou seja, acúmulo excessivo de fluidos nesses órgãos. A congestão pulmonar, além de um sinal clínico de IC, é também causa frequente de hospitalizações de pacientes com IC (PICANO, GARGANI e GHEORGHIADÉ, 2010), sendo assim, julgamos importante a avaliação deste parâmetro nos animais estudados. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2.



Tabela 2 - Massa tecidual

	SHAM	INF-SED	INF-TC	INF-TI
Pulmões, g	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Fígado, g	13,9 ± 0,5	12,9 ± 0,6	13,6 ± 0,3	12,5 ± 0,4
Pulmões úmidos:secos	4,4 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,5 ± 0,1
Fígado úmido:seco	2,9 ± 0,02	2,9 ± 0,01	2,9 ± 0,04	2,8 ± 0,03
Incidência de edema pulmonar	1/10	5/8	2/6	3/9
Incidência de edema hepático	0/10	1/8	1/6	1/9

Massa dos pulmões e fígado, razão massa úmida : massa seca dos tecidos e incidência de edema pulmonar e hepático. Consideramos a ocorrência de edema quando o valor de massa úmida:seca do tecido apresentou-se superior a média + desvio padrão do grupo SHAM. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan.

Apesar de não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais, verificamos que 63% dos animais infartados sedentários apresentaram edema pulmonar, ao passo que em ambos os grupos submetidos ao TFA, esse valor foi de apenas 33%.

### 6.3 Tolerância ao esforço físico

Não observamos alteração do desempenho físico dos animais infartados quatro semanas após os procedimentos cirúrgicos (Figura 10, PRÉ-PROTOCOLO). Para garantia da homogeneidade dos grupos experimentais de mesma condição cardíaca, verificamos que os três grupos infartados apresentavam mesmo desempenho físico quatro semanas após as cirurgias (Figura 10).

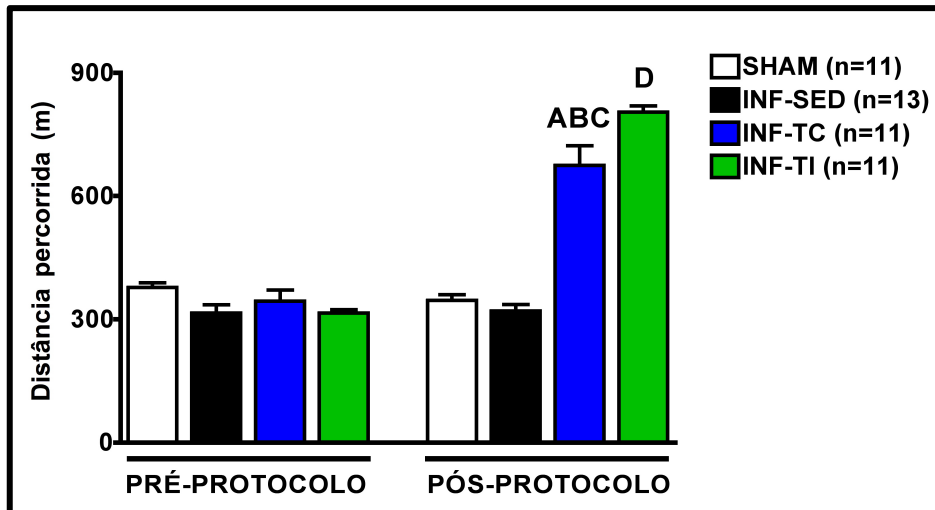


Figura 10 – Distância total percorrida em teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental. O número de animais por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED; C  $p < 0,05$  vs. pré-protocolo; D  $p < 0,05$  vs. todos os demais grupos e pré-protocolo.

Ao final do protocolo experimental (12 semanas após procedimentos cirúrgicos), todos os animais foram novamente submetidos ao mesmo teste realizado no período pré-protocolo. Ambos os grupos treinados apresentaram melhora substancial da tolerância ao esforço físico, quando comparados com período pré-treinamento ou frente aos animais sedentários (tanto SHAM quanto infartados) (Figura 10). Verificamos maior eficácia do TFA em alta intensidade na melhora da capacidade de corrida dos animais infartados, o que é demonstrado pela diferença significativa na distância total percorrida pelos grupos INF-TC e INF-TI (Figura 10). Não observamos alterações significativas da capacidade de corrida dos grupos SHAM a INF-SED em relação ao período pré-protocolo.

#### 6.4 *Potência aeróbia máxima*

Não observamos diferenças significativas entre os grupos quatro semanas após os procedimentos cirúrgicos (Figura 11A). Ao final do protocolo experimental, verificamos que ambos os grupos submetidos ao TFA apresentaram aumento expressivo da potência aeróbia máxima quando comparados com o período pré-treinamento ou com o grupo infartado não submetido ao TFA (INF-SED) (Figura 11A).

Verificamos que o protocolo de TFA intervalado em alta intensidade aumentou a potência aeróbia máxima dos ratos infartados para valores superiores aos do grupo controle saudável (SHAM), o que não foi observado no grupo treinado de forma contínua em intensidade moderada (INF-TC) (Figura 11A).

Além do  $VO_2$ máx, avaliamos também a intensidade na qual os animais atingiram o valor máximo de consumo de oxigênio, ponto denominado  $IVO_2$ máx, ou intensidade do  $VO_2$ máx, neste caso representado em metros corridos por minuto.

Assim como observado na potência aeróbia máxima, não houve diferença no  $IVO_2$ máx entre os grupos ao início do protocolo experimental. Como esperado, ambos os protocolos de TFA aumentaram o  $IVO_2$ máx dos animais submetidos aos protocolos, quando comparados com o teste inicial (Figura 11B). Além disso, ambos os grupos apresentaram valores superiores tanto aos do grupo INF-SED quanto SHAM. Observamos resultados superiores do treinamento físico intervalado em alta intensidade para essa variável, uma vez que os ratos treinados neste protocolo apresentaram  $IVO_2$ máx 10% superior ao grupo treinado em intensidade moderada, tendo esta diferença atingido significância estatística ( $p < 0,05$ ) (Figura 11B).

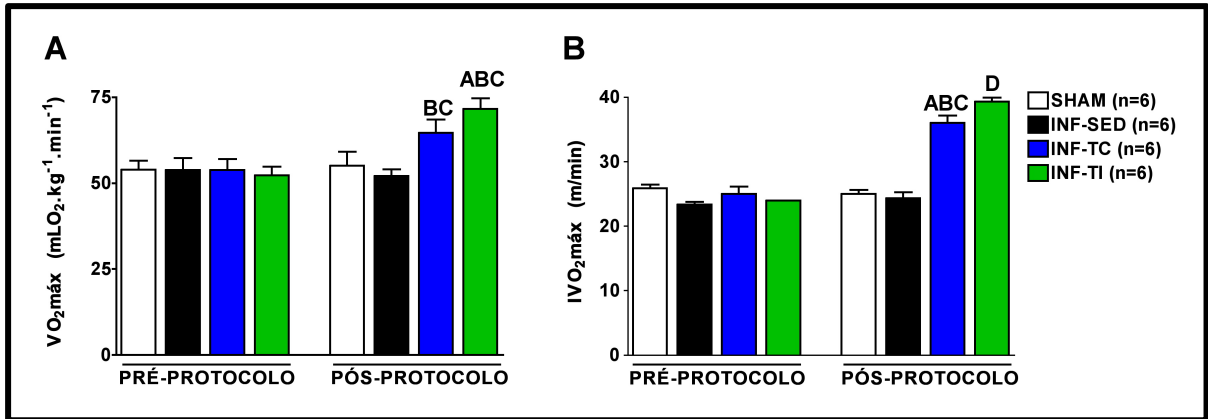


Figura 11 – Potência aeróbia máxima (A) ( $VO_2$ máx) e intensidade de corrida na qual o  $VO_2$ máx foi atingido (B) ( $IVO_2$ máx), avaliados por teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante antes (pré-protocolo) e após (pós-protocolo) oito semanas de protocolo experimental. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED; C  $p < 0,05$  vs. pré-protocolo; D  $p < 0,05$  vs. todos os demais grupos e pré-protocolo.

## 6.5 Avaliação metabólica da musculatura esquelética

### 6.5.1 Citrato sintase

Avaliamos a atividade máxima da enzima citrato sintase nos músculos sóleo e plantar, como representante do metabolismo aeróbio na musculatura esquelética dos animais estudados.

No músculo sóleo observamos uma tendência a queda da atividade desta enzima nos animais infartados sedentários (Figura 12A). Quando nos voltamos aos efeitos do TFA, verificamos que ambos os protocolos promoveram aumento significativo da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo, sem diferenças significativas entre os protocolos (Figura 12A).

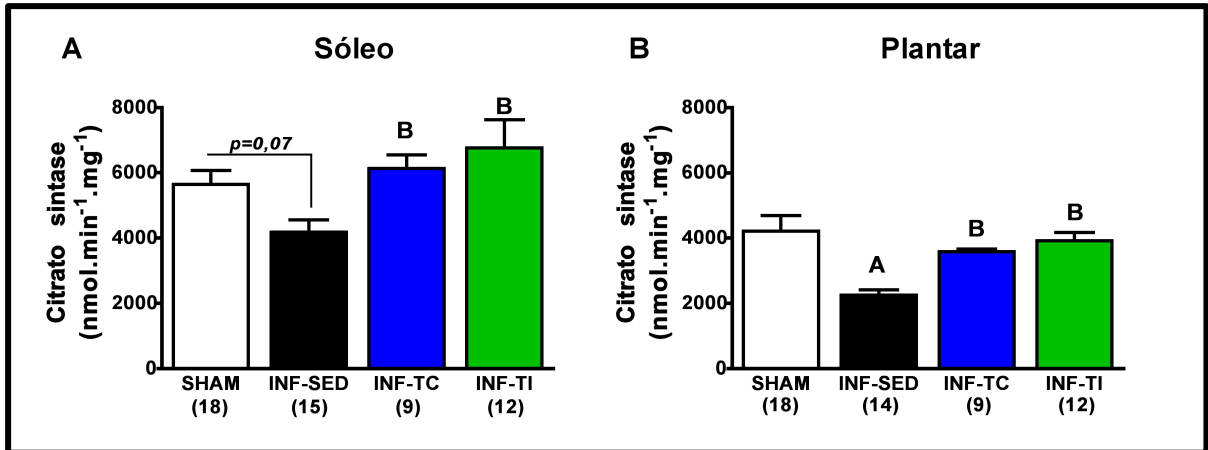


Figura 12 – Atividade máxima da enzima citrato sintase nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED.

Resultados semelhantes foram observados para o músculo plantar. O grupo de animais infartados sedentários apresentou queda significativa da atividade máxima da enzima citrato sintase (Figura 12B), ao passo que os protocolos de TFA foram igualmente capazes de prevenir esta queda, proporcionando aumento significativo da atividade da enzima em questão também no músculo plantar (Figura 12B).

### 6.5.2 Hexoquinase

Como representante do metabolismo anaeróbio, avaliamos a atividade máxima da enzima hexoquinase nos músculos sóleo e plantar dos animais estudados, sendo os dados apresentados na figura a seguir:

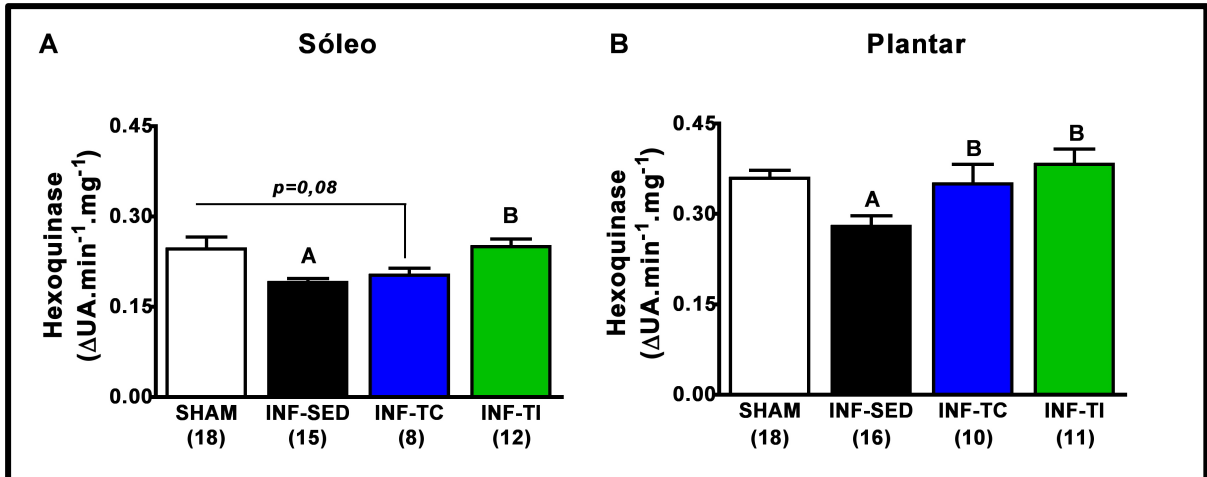


Figura 13 - Atividade máxima da enzima hexoquinase nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses.  $\Delta$ UA= aumento no valor de unidades de absorvância da amostra em 340nm. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED.

Verificamos que os animais infartados sedentários apresentaram queda significativa da atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo sóleo (Figura 13A). Apenas o TFA intervalado em alta intensidade foi capaz de aumentar a atividade da enzima em questão no músculo sóleo, ao passo que o músculo sóleo dos animais treinados de forma contínua em intensidade moderada ainda apresentava uma leve tendência a queda ( $p=0,08$  vs. SHAM, Figura 13A).

Por outro lado, quando nos voltamos aos dados obtidos com lisado citosólico do músculo plantar, observamos que os protocolos de TFA foram igualmente capazes de prevenir completamente a queda da atividade máxima da enzima hexoquinase (Figura 13B).

### 6.5.3 Conteúdo de glicogênio intramuscular

Como apresentado na Figura 14A, não observamos diferenças entre os grupos SHAM e INF-SED, indicando que o IM não promoveu alteração dessa variável no músculo sóleo. Por outro lado, os protocolos de TFA promoveram aumento substancial do conteúdo de glicogênio do músculo sóleo dos animais infartados (Figura 14A). Não observamos diferenças significativas entre os diferentes protocolos de TFA.

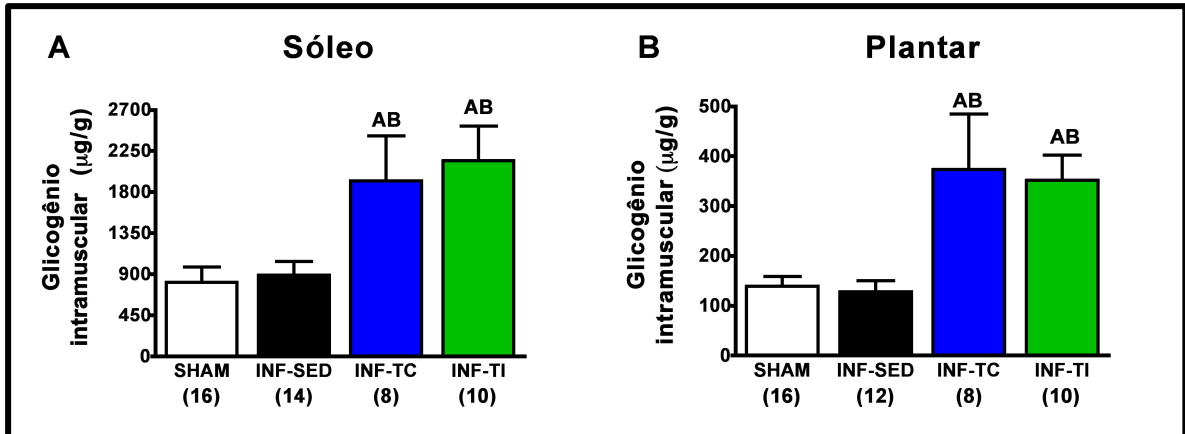


Figura 14 – Conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM; B  $p < 0,05$  vs. INF-SED.

De forma semelhante, não houve diferença significativa do conteúdo de glicogênio do músculo plantar dos animais infartados sedentários em comparação com o grupo SHAM. Os protocolos de TFA também aumentaram o conteúdo de glicogênio nesse músculo, sendo o aumento de 191% no grupo INF-TC e 174% no grupo INF-TI, em comparação ao grupo infartado sedentário. Diferenças entre os protocolos de TFA não foram observadas.

## 6.6 Morfologia da musculatura esquelética

### 6.6.1 Massa muscular

A Figura 15 apresenta os dados da massa absoluta dos músculos esqueléticos, ao passo que a Figura 16 representa a massa dos músculos corrigida pela massa corporal dos animais.

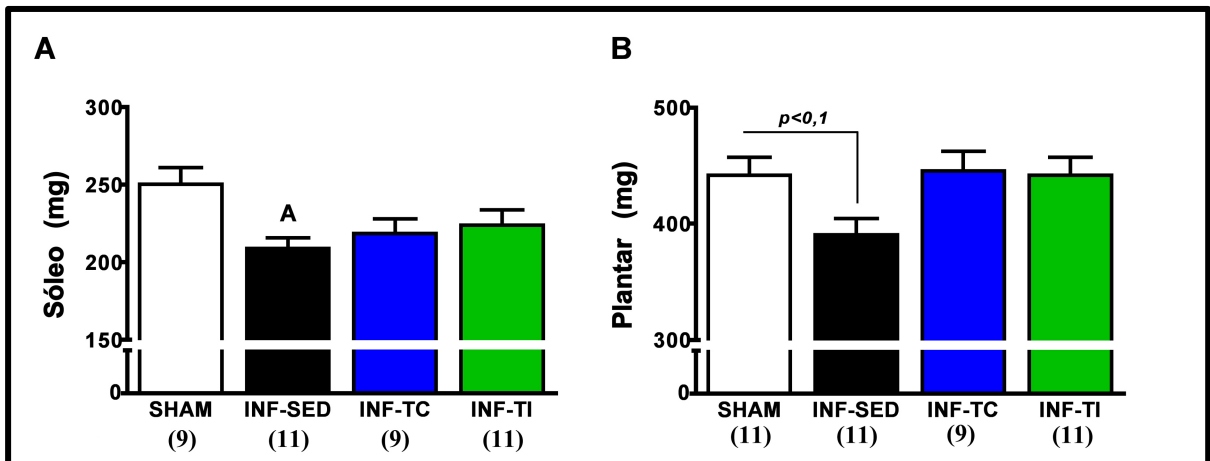


Figura 15 – Massa dos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan.  $p < 0,05$  vs. SHAM.

Observamos que o IM provocou perda significativa de massa do músculo sóleo 12 semanas após o procedimento cirúrgico, representada por menores valores de massa absoluta (19% de perda em relação ao grupo SHAM) (Figura 15A) e forte tendência de queda ( $p < 0,07$ ) da massa relativa a massa corporal (13% de perda em relação ao grupo SHAM) (Figura 16A), apresentadas pelo grupo INF-SED. Essa diferença não foi observada quando comparamos INF-TC ou INF-TI com o grupo SHAM, demonstrando que ambos os protocolos de treinamento físico preveniram a perda de massa do músculo sóleo induzida pelo IM. Não verificamos diferença estatística entre os dois protocolos de treinamento para esta variável (Figura 16A).



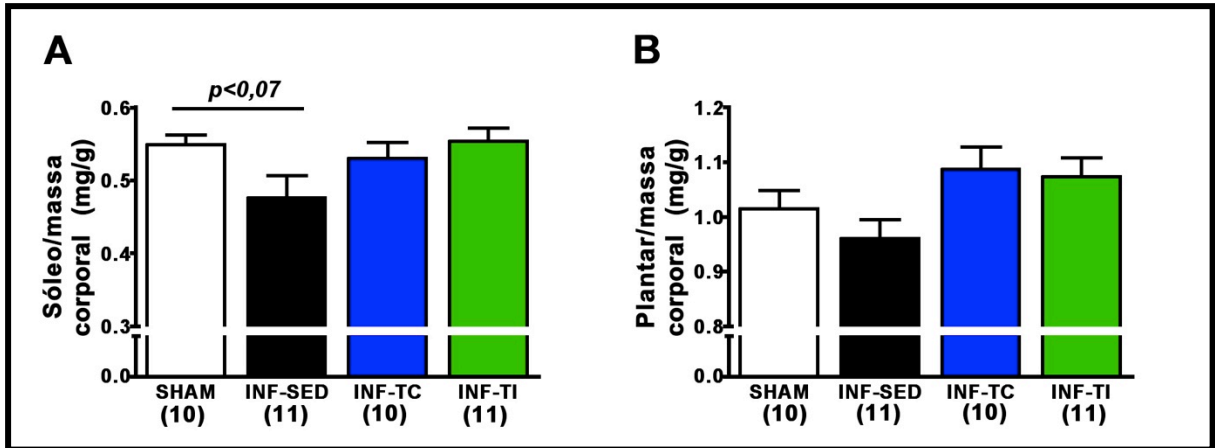


Figura 16 – Massa dos músculos sóleo (A) e plantar (B) relativa à massa corporal dos animais. O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan.

Apesar da queda de 17% da massa do músculo plantar nos animais infartados sedentários frente ao grupo SHAM (Figura 15B), apenas uma fraca tendência estatística foi observada ( $p < 0,1$ ). Não observamos qualquer efeito significativo dos protocolos de TFA nessa variável.

#### 6.6.2 Área de secção transversa e distribuição de fibras musculares

Apesar da massa do tecido muscular nos dar bons indícios da ocorrência de atrofia muscular, a análise microscópica da musculatura esquelética nos permite uma avaliação mais detalhada, permitindo discriminar diferentes tipos de fibras musculares, bem como a área de secção transversa (AST) dessas fibras, eliminando a influência que o tecido conjuntivo e outros componentes extracelulares exercem quando mensuramos a massa da peça muscular por inteiro.

Na Figura 17 (painéis A e C) observamos que tanto as fibras do tipo I, quanto as fibras do tipo II do músculo sóleo dos ratos infartados sedentários apresentaram atrofia em relação ao grupo SHAM. Ambos os protocolos de TFA preveniram a ocorrência da atrofia dessas fibras musculares, desencadeada pelo IM. Não observamos diferenças significativas entre os protocolos de TFA.

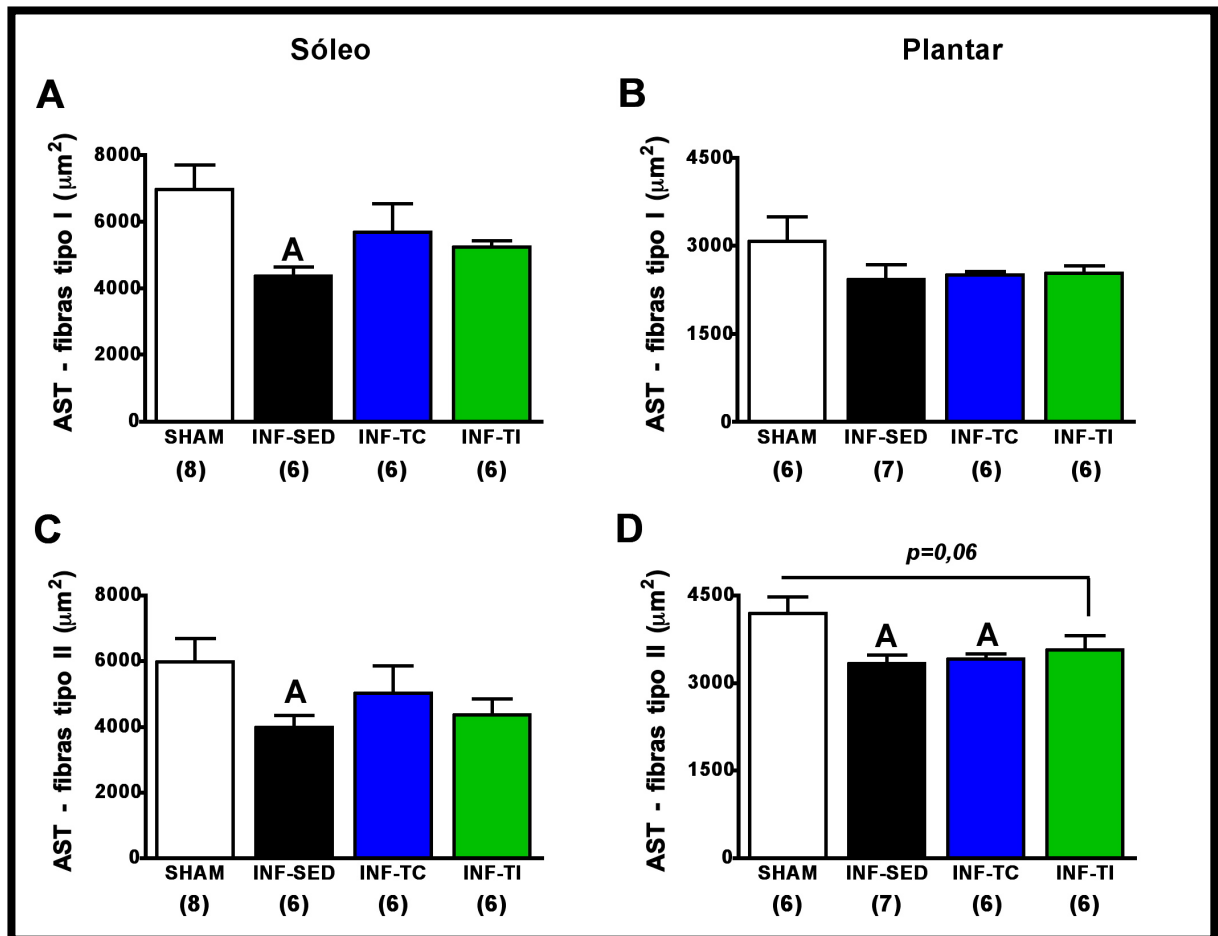


Figura 17 – Área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos músculos sóleo (A e C) e plantar (B e D). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM.

Os painéis B e D da Figura 17 representam os dados obtidos no músculo plantar. Diferentemente do músculo sóleo, somente as fibras do tipo II apresentaram atrofia no grupo INF-SED (Figura 17D). Apenas o TFA intervalado em alta intensidade foi capaz de atenuar, ainda que discretamente ( $p = 0,06$  vs. SHAM), a atrofia das fibras do tipo II, desencadeada pelo IM.

Quando nos atemos à distribuição dos tipos de fibras musculares, não observamos diferenças entre os grupos SHAM e INF-SED em ambos os músculos estudados (Figura 18). Como esperado, tanto o TFA em alta intensidade quanto o realizado em intensidade moderada promoveram aumento das fibras do tipo I no músculo sóleo (Figura 18A), sem diferenças significantes entre os protocolos.

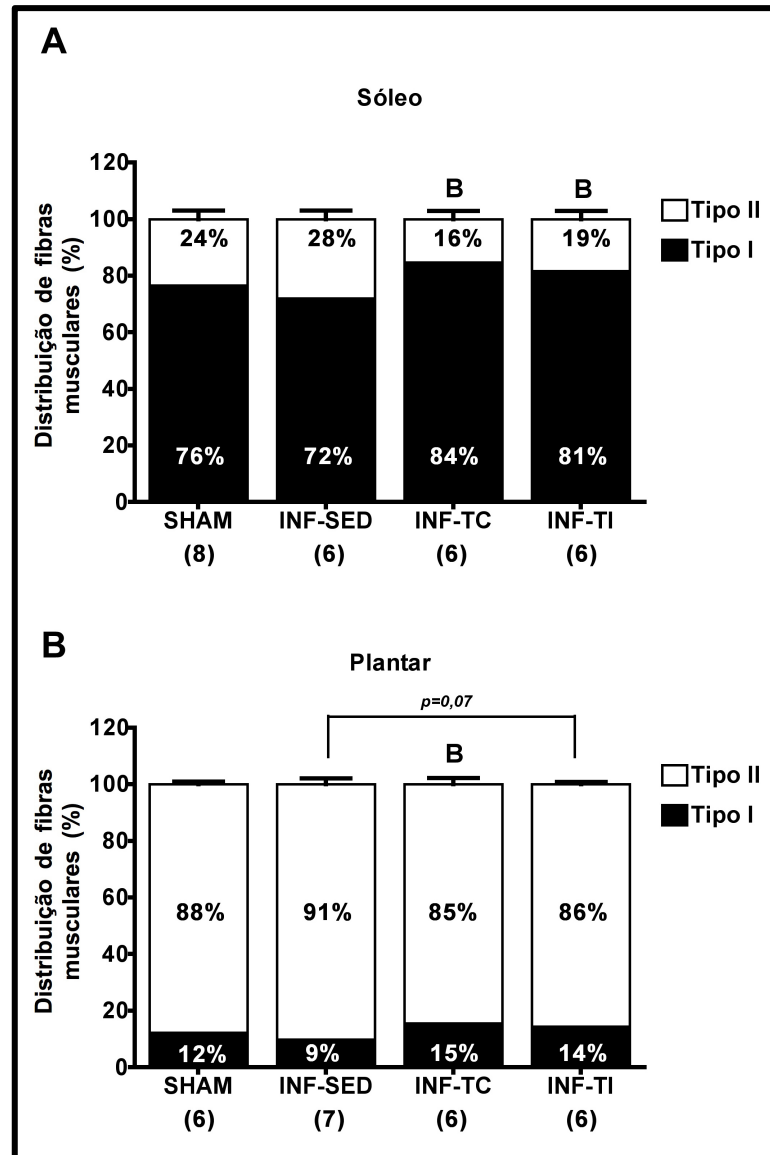


Figura 18 – Distribuição dos tipos de fibras musculares nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. B  $p<0,05$  vs. INF-SED.

Observamos que o TFA em intensidade moderada aumentou a porcentagem de fibras do tipo I no músculo plantar, já o grupo INF-TI uma forte tendência foi observada (Figura 18B)

## 6.7 Estado redox da musculatura esquelética

### 6.7.1 Superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD é um importante indicativo da defesa antioxidante intracelular (MULLER et al., 2006) e, por isso, foi avaliada nos músculos sóleo e plantar.

Como observado na Figura 19A, os animais infartados sedentários apresentaram queda significativa da atividade máxima da SOD no músculo sóleo. Interessante, ambos os protocolos de TFA foram capazes de evitar esse fenômeno, de forma que apenas o TFA contínuo em intensidade moderada apresentou elevação significativa em relação ao grupo INF-SED, ao passo que o grupo INF-TI não apresentou diferenças em relação ao grupo SHAM, sugerindo que o prejuízo observado nos animais do INF-SED foi completamente prevenido em ambos os grupos treinados.

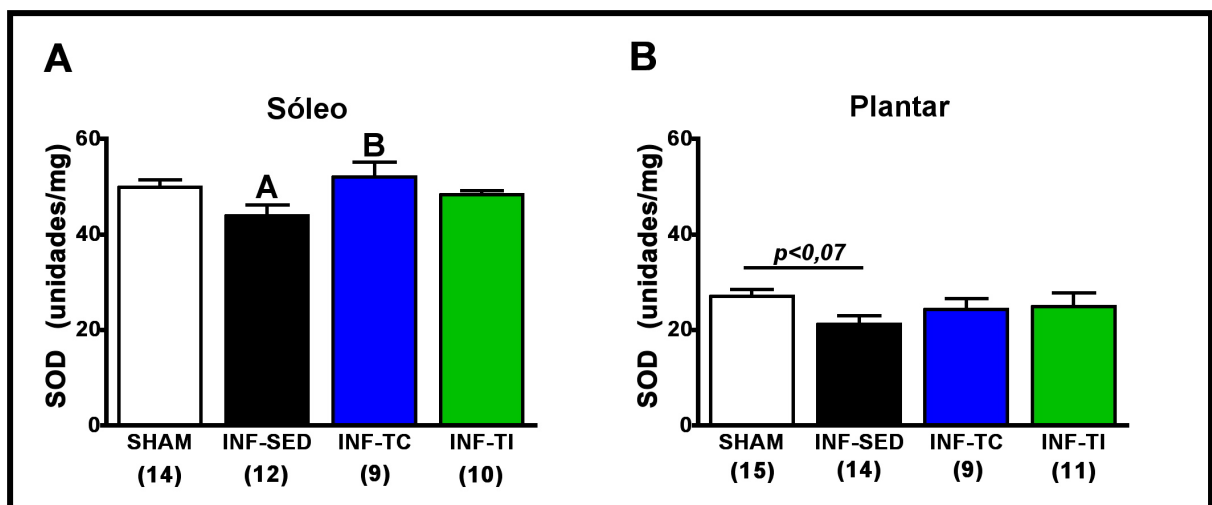


Figura 19 – Atividade máxima da enzima SOD nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p<0,05$  vs. SHAM; B  $p<0,05$  vs. INF-SED.

No músculo plantar a queda da atividade máxima desta enzima no grupo INF-SED foi menos pronunciada (Figura 19B), uma vez que observamos apenas uma tendência em relação ao grupo SHAM. Esta tendência não foi observada em nenhum dos grupos submetidos ao TFA, sem diferenças significativas entre INF-TC e INF-TI.

### 6.7.2 Catalase

Outro importante agente na defesa antioxidante das células eucarióticas é a enzima catalase, que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio. Os dados obtidos nos músculos sóleo e plantar dos animais utilizados no presente estudo são apresentados e descritos abaixo.

Diferente do observado na enzima SOD, não detectamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais quando nos atentamos para a enzima catalase (Figura 20A e B), tanto para o músculo sóleo, quanto para o músculo plantar.

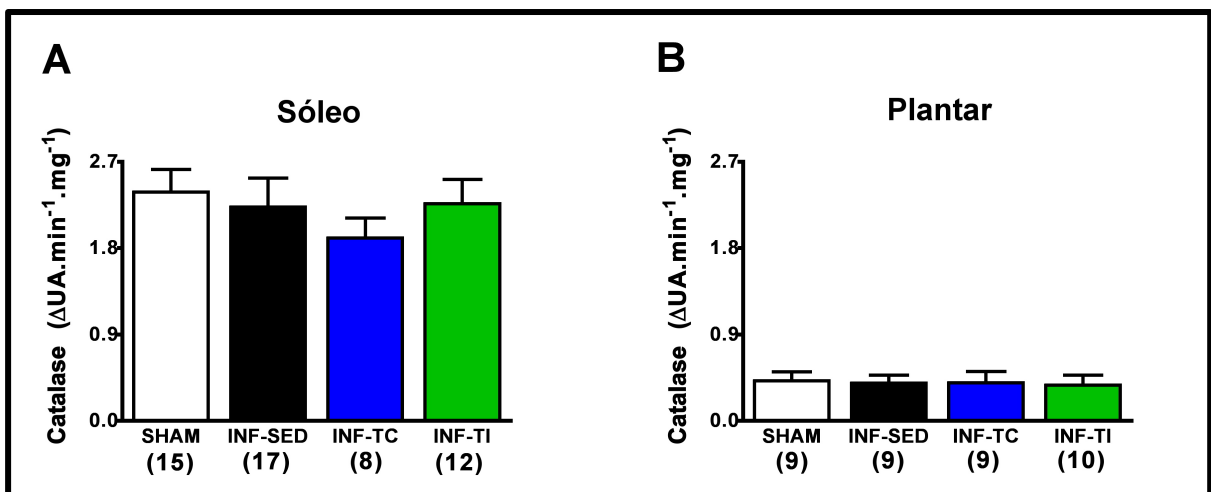


Figura 20 – Atividade máxima da enzima catalase nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses.  $\Delta$ UA= decaimentos no valor de unidades de absorvância da amostra em 240nm. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan.

### 6.7.3 Estado redox da glutathiona

Na Figura 21, ilustramos os dados obtidos na mensuração do estado redox da glutathiona.

Observamos que o músculo sóleo do grupo INF-SED apresentou maior conteúdo de GSSG em comparação ao grupo SHAM (Figura 21E). Os protocolos de TFA foram capazes

de prevenir esse fenômeno, com efeito mais discreto promovido pelo TFA contínuo em intensidade moderada ( $p=0,06$  vs. grupo SHAM) (Figura 21E).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi observada nos dados do músculo plantar (Figura 21 B, D, F e H).

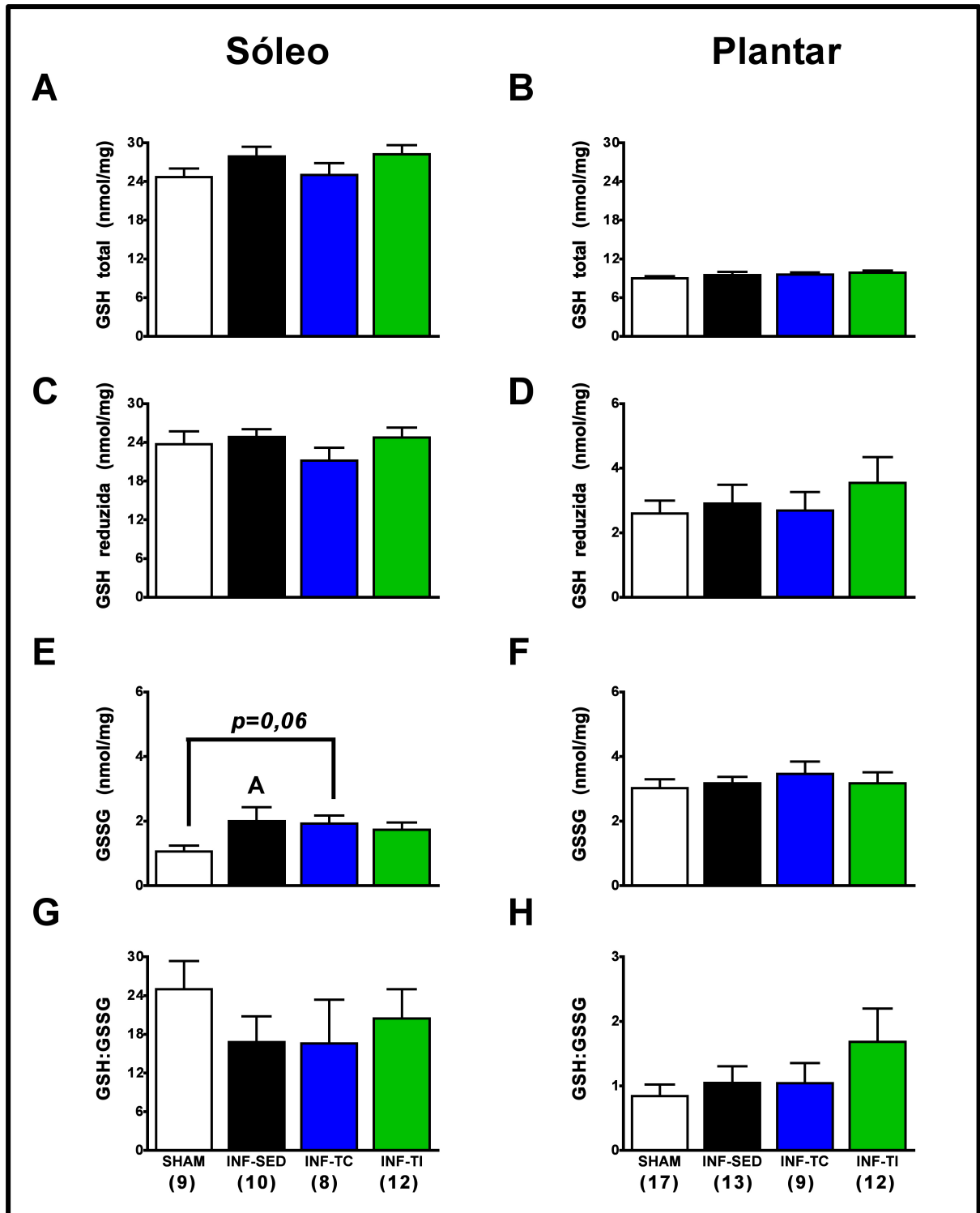


Figura 21 – Conteúdo de GSH total (A), reduzida (C), oxidada (GSSG) (E) e razão GSH reduzida:GSSG (G) no músculo sóleo. Conteúdo de GSH total (B), reduzida (D), oxidada (GSSG) (F) e razão GSH reduzida:GSSG (H) no músculo plantar. O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM;

## 6.8 Sistema ubiquitina-proteassoma

Como descrito na revisão de literatura deste documento, o SUP é o principal sistema responsável pela degradação de proteínas intracelulares, inclusive nas células musculares esqueléticas. Assim, os dados que obtivemos quando avaliamos a ativação deste sistema estão descritos a seguir:

A atividade do complexo proteolítico proteassomal 26S apresentou-se elevada no músculo sóleo dos animais infartados que permaneceram sedentários (Figura 22A). Os valores dos grupos INF-TC e INF-TI não se apresentaram significativamente diferentes dos valores observados no grupo SHAM, sugerindo que os protocolos de TFA foram igualmente eficazes na prevenção do aumento da atividade proteolítica proteassomal causada pelo IM (Figura 22A).

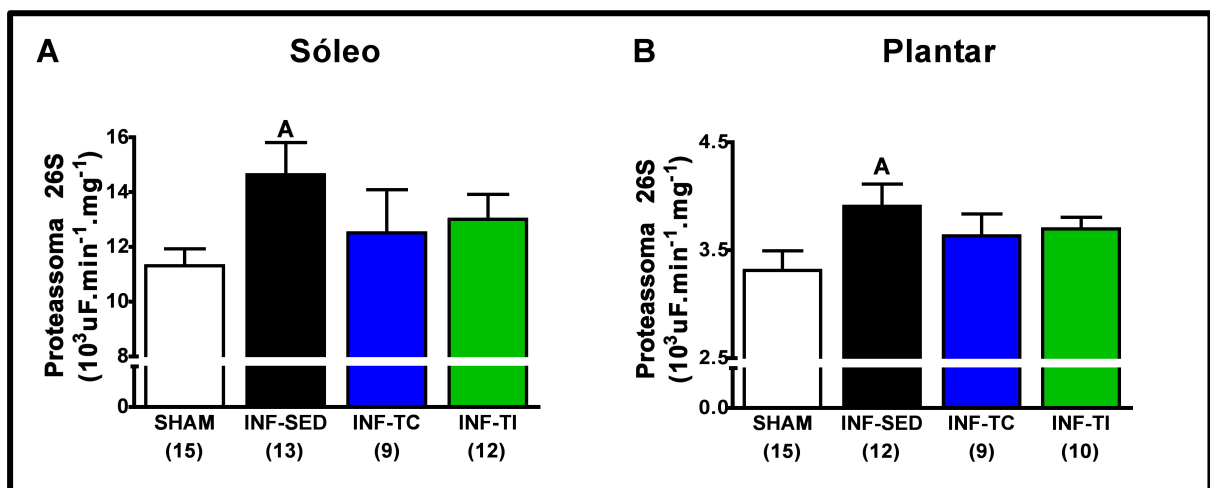


Figura 22 – Atividade máxima do complexo proteassomal nos músculos sóleo (A) e plantar (B). O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. uF= unidades de fluorescência. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM;

Encontramos dados muito semelhantes no músculo plantar para esta variável, dado que novamente apenas o grupo INF-SED apresentou maior atividade proteassomal em relação ao grupo SHAM (Figura 22B), confirmando que o TFA, independentemente da intensidade realizada, preveniu a ativação do complexo proteassomal 26S no músculo plantar, promovida pelo IM.



Além da atividade máxima do complexo proteassomal, avaliamos também o conteúdo de proteínas ubiquitinadas e proteínas oxidadas no lisado muscular dos mesmos músculos, uma vez que o SUP é responsável pela remoção dessas proteínas.

Observamos que no músculo sóleo ocorreu acúmulo excessivo de proteínas ubiquitinadas no grupo de animais infartados sedentários (Figura 23A). Este acúmulo foi completamente prevenido por ambos os protocolos de TFA, sem distinção dentre os mesmos (Figura 23A).

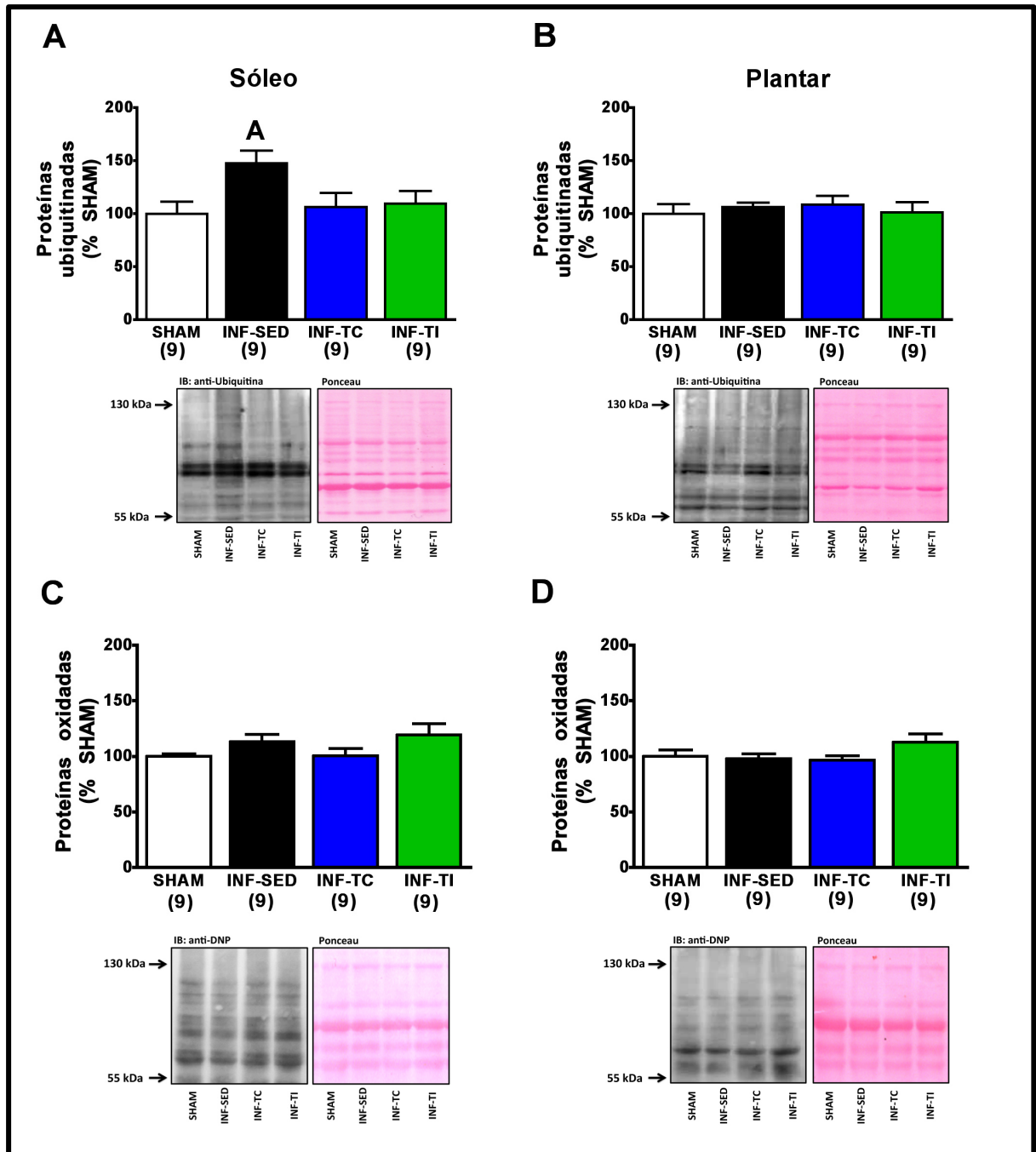


Figura 23 – Proteínas ubiquitinadas e oxidadas em lisado citosólico dos músculos sóleo (A e C) e plantar (B e D). Imagens representativas das membranas são apresentadas abaixo dos gráficos. O número de amostras por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A  $p < 0,05$  vs. SHAM;

Este acúmulo de proteínas ubiquitinadas não foi observado no músculo plantar, uma vez que nenhuma diferença estatística foi observada entre os quatro grupos (Figura 23B). De forma semelhante, não observamos qualquer diferença entre os grupos experimentais quando nos voltamos aos dados relacionados à oxidação de proteínas (Figura 23C e D).

## 7 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a comparar de maneira sistemática os efeitos do TFA em alta intensidade com os do TFA em intensidade moderada na musculatura esquelética em ratos infartados. A hipótese inicial do trabalho era de que o TFA em intensidade seria superior ao TFA em intensidade moderada no que diz respeito às adaptações músculo-esqueléticas em ratos infartados. Nessa seção, discutiremos os dados obtidos no desenvolvimento do presente estudo, levantando as possíveis limitações apresentadas.

### *7.1 Variáveis fisiológicas, parâmetros cardiovasculares e capacidade funcional*

Há décadas, o modelo de IM em ratos tem sido usado 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 pelo insulto cardíaco.

O IM promoveu disfunção cardíaca severa nos animais submetidos ao procedimento, estando esse fenômeno acompanhado por sinais presentes na grande maioria de dos modelos experimentais ou humanos após IM, sendo eles: dilatação ventricular e estreitamento do septo interventricular. Sendo assim, além da disfunção sistólica, os animais apresentaram também remodelamento cardíaco patológico. Os diferentes protocolos de TFA foram igualmente eficazes em reverter a disfunção ventricular sistólica dos animais infartados.

Ainda tratando dos efeitos dos diferentes protocolos de TFA na bomba cardíaca, observamos um dado intrigante em relação à massa cardíaca. Observamos que apenas o TFA contínuo em intensidade moderada reverteu completamente o aumento de massa cardíaca promovida pelo IM, ao passo que o grupo INF-TI ainda apresentava valores superiores ao grupo SHAM. Uma possível explicação para este achado pode estar relacionada à ativação de vias intracelulares relacionadas aos diferentes padrões de hipertrofia cardíaca (i.e. patológica vs. fisiológica). Acreditamos que tenha ocorrido sobreposição dos perfis patológico e fisiológico do crescimento cardíaco promovidos pelo IM e treinamento físico, respectivamente. Tal fenômeno foi descrito previamente em animais espontaneamente hipertensos submetidos ao TFA, que apresentaram hipertrofia cardíaca ainda mais

pronunciada do que os animais hipertensos sedentários, entretanto, os autores 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). Além disso, foi demonstrado também que em animais saudáveis, o TFA em alta intensidade é capaz de promover maior hipertrofia cardíaca quando comparado com o protocolo em intensidade moderada (HOYDAL et al., 2007), auxiliando o entendimento da ocorrência do fenômeno apenas no grupo INF-TI. Apesar das similaridades estruturais, os padrões hipertróficos patológicos e fisiológicos são entidades distintas, de forma que a hipertrofia fisiológica é acompanhada por ganho de função cardíaca, o que foi, de fato, observado no grupo de animais INF-TI. Além disso, são fenômenos controlados por vias intracelulares distintas e antagônicas (MCMULLEN e JENNINGS, 2007; OLIVEIRA et al., 2009), que apesar de extremamente importantes, não estavam entre os objetivos do presente estudo.

Além do remodelamento cardíaco patológico, a disfunção cardíaca muitas vezes compromete o bom funcionamento pulmonar, podendo provocar acúmulo excessivo de fluidos nos pulmões (i.e. edema), sendo esta ocorrência um forte indicativo da instalação do quadro de IC (LUCAS et al., 2000). Dado isso, utilizamos a razão massa úmida:massa seca dos pulmões como índice de acúmulo hídrico no tecido.

Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa quando comparamos as médias dos grupos, numa análise mais detalhada observamos que mais de 60% dos animais infartados sedentários apresentavam edema pulmonar, ao passo que nos grupos treinados este valor foi reduzido em quase pela metade (33% em cada um dos grupos treinados). De maneira interessante, quando comparamos apenas os animais infartados sedentários que apresentaram edema pulmonar com aqueles do grupo SHAM, observamos que estes ratos apresentavam também perda significativa da capacidade funcional, avaliada em teste de corrida até a exaustão (APÊNDICE A). Com isso, podemos considerar que o IM foi responsável pelo desenvolvimento de IC nesse subgrupo de animais. Por outro lado, nenhum dos animais dos grupos treinados apresentou intolerância aos esforços físicos, mesmo aqueles que apresentaram edema pulmonar, ao ponto de apresentarem capacidade funcional muito superior ao grupo SHAM (Figura 10).

É interessante notar também que esta grande variabilidade de resposta após o IM não é particularidade do modelo experimental utilizado, uma vez que a literatura descreve a ocorrência de fenômeno muito semelhante em humanos que sofreram IM. Autores

demonstraram que cerca de 30% dos pacientes com disfunção cardíaca severa apresentavam capacidade funcional preservada (BENGE, LITCHFIELD e MARCUS, 1980), e apesar de não se saber ao certo os mecanismos responsáveis por essa ocorrência, foi observado que uma resposta cronotrópica preservada e reduzida resistência vascular periférica eram características desses pacientes com IC e capacidade funcional preservada (LITCHFIELD et al., 1982). O mesmo estudo verificou também que os capilares pulmonares desses pacientes eram capazes de suportar pressões elevadas durante o esforço físico intenso, chegando a valores que normalmente levariam à ocorrência de edema pulmonar agudo, limitando a capacidade funcional, o que não ocorria nesses pacientes.

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, verificamos que a capacidade funcional dos animais apresentou baixa correlação com a função cardíaca de repouso dos animais ( $r > 0,2$ ,  $p > 0,05$ , APÊNDICE B), antes ou após o protocolo experimental. Esse achado também corrobora dados de estudos obtidos em pacientes com IC (BENGE, LITCHFIELD e MARCUS, 1980), sugerindo que a capacidade funcional desses indivíduos e modelos experimentais de IC esteja mais relacionada com alterações da musculatura esquelética.

Quando nos voltamos aos efeitos dos protocolos de TFA na capacidade funcional dos animais, observamos que, assim como descrito em estudos anteriores (TJONNA et al., 2008; HARAM et al., 2009; MOHOLDT et al., 2009; MOLMEN-HANSEN et al., 2011), o TFA intervalado em alta intensidade foi superior ao protocolo contínuo em intensidade moderada, uma vez que os animais do grupo INF-TI apresentaram maior capacidade de corrida até a exaustão do que o grupo INF-TC, além de apresentarem potência aeróbia máxima (i.e.  $VO_2\text{máx}$ ) superior ao grupo de animais saudáveis (SHAM), o que não foi observado no grupo INF-TC. O fato de o grupo INF-TI apresentar maior  $IVO_2\text{máx}$  frente ao grupo INF-TC nos sugere que o treinamento físico em alta intensidade promove melhora da eficiência mecânica dos animais infartados em comparação com o protocolo realizado em intensidade moderada. Tal resultado corrobora estudos prévios que demonstraram maior eficácia do TFA em alta intensidade na melhora da economia de movimento (ROGNMO et al., 2004; WISLOFF et al., 2007).

## 7.2 *Musculatura esquelética*

À partir da década de 1970 começaram a ser publicados estudos tratando dos prejuízos da musculatura esquelética em quadros de disfunção cardíaca e IC (LONGHURST, CAPONE e ZELIS, 1975). Os primeiros estudos com humanos visavam entender as alterações decorrentes diretamente da disfunção ventricular, com grande ênfase dada ao aporte sanguíneo periférico (WILSON, MARTIN e FERRARO, 1984). Em seguida, surgiram estudos que avaliaram alterações metabólicas intrínsecas ao tecido muscular, em especial a taxa de utilização dos fosfatos de alta energia (MANCINI et al., 1989). Com a evolução do conhecimento sobre o tema, atualmente já conhecemos diversas alterações morfofuncionais da musculatura esquelética desencadeadas por um quadro de disfunção cardíaca (NICOLETTI et al., 2003), bem como alguns efeitos do TFA (ADAMS, DORING e SCHULER, 2008; BACURAU et al., 2009). Entretanto, nenhum estudo até o presente momento comparou de forma sistemática os efeitos do TFA em alta intensidade com o TFA em intensidade moderada na musculatura esquelética em situações de disfunção cardíaca.

Assim, nesta seção discutiremos os dados relacionados às alterações músculo-esqueléticas promovidas pelo IM, bem como as adaptações promovidas pelos diferentes protocolos de TFA.

O primeiro ponto a ser levantado é o perfil metabólico da musculatura esquelética. Assim como demonstrado anteriormente (BRASSARD et al., 2006), a disfunção cardíaca promoveu prejuízo na atividade máxima da enzima citrato sintase, sendo esse prejuízo mais pronunciado no músculo plantar. A enzima citrato sintase, apesar de ser codificada por DNA nuclear, situa-se na matriz mitocondrial e atua na primeira etapa do ciclo do ácido cítrico (ou Ciclo de Krebs), responsável pela geração de energia a partir da oxidação de substratos (WIEGAND e REMINGTON, 1986). Assim, a atividade máxima desta enzima tem sido utilizada como marcador do conteúdo mitocondrial em células eucarióticas (CIVITARESE et al., 2007). Considerando esta informação e os dados encontrados nesse estudo, podemos sugerir que o conteúdo mitocondrial da musculatura esquelética dos ratos infartados sedentários apresentou-se reduzido em relação ao grupo SHAM. A redução da atividade do ciclo de Krebs pode comprometer a ressíntese de ATP durante o esforço físico, principalmente quando realizado por longos períodos, ativando precocemente o metabolismo anaeróbio e comprometendo a capacidade de realização de esforços prolongados.

Como esperado, o TFA em intensidade moderada foi capaz de prevenir a queda da atividade máxima da enzima citrato sintase, o que foi observado nos dois músculos estudados. Em direção oposta à hipótese inicial do estudo, o TFA intervalado em alta intensidade não proporcionou resultados superiores, apresentando efeito de mesma magnitude em comparação com o TFA contínuo em intensidade moderada.

De forma interessante, a atividade máxima dessa enzima no músculo sóleo apresentou correlação positiva e estatisticamente significativa com a capacidade funcional dos animais ( $r=0,46$ ,  $p<0,02$ , APÊNDICE C), o que, como discutido acima, não foi observado quando correlacionamos o grau de disfunção cardíaca com a capacidade de corrida dos ratos (APÊNDICE B). Estes dados ressaltam a importância da musculatura esquelética na determinação da capacidade física nos animais estudados.

Em termos absolutos, a atividade desta enzima foi superior no músculo sóleo. Isto se deve as características metabólicas deste músculo, com predominância do metabolismo aeróbio e maior porcentagem de fibras do tipo I, conferindo maior conteúdo mitocondrial.

Em relação ao metabolismo anaeróbio, verificamos que o IM promoveu redução significativa da atividade máxima da enzima hexoquinase, em ambos os músculos estudados. Uma vez que esta enzima atua na primeira reação da via glicolítica de geração de energia (fosforilação da glicose), a queda de sua atividade na musculatura esquelética dos animais infartados sedentários indica que o metabolismo anaeróbio também apresentou-se comprometido nesse grupo de animais, o que pode preceder uma queda da capacidade funcional. De fato, um estudo recente (FUEGER et al., 2005) utilizou modelos animais de ganho ou perda de função da enzima hexoquinase e demonstrou de forma categórica que essa enzima é um determinante direto da capacidade de realização de exercício. Os dados deste estudo sugerem que a redução da capacidade de captação de glicose, pelo músculo esquelético dos animais com perda funcional da hexoquinase é responsável pelo fenótipo observado, assim, a redução da atividade da enzima em nosso grupo de animais infartados sedentários representa um agravante da miopatia esquelética desencadeada pela disfunção ventricular. Além disso, a baixa atividade da hexoquinase na musculatura esquelética pode promover resistência à insulina e intolerância à glicose (FUEGER et al., 2005), o que é observado com grande frequência em pacientes com IC (SWAN et al., 1997).

De forma interessante, apenas o TFA em alta intensidade foi capaz de aumentar a atividade desta enzima no músculo sóleo, em relação ao grupo INF-SED. Por outro lado, no músculo plantar os protocolos de TFA apresentaram resultados de mesma magnitude. Este

achado reforça a importância de se estudar músculos com características metabólicas distintas, dado que respostas a estímulos, patológicos ou fisiológicos, podem diferir entre esses músculos. De fato, Buhl e colaboradores (BUHL et al., 2001) demonstraram que músculos com predomínio do metabolismo glicolítico apresentavam respostas superiores após tratamento com um agonista da enzima AMPK (proteína cinase ativada por AMP), recurso farmacológico que mimetiza os efeitos do TFA na musculatura esquelética (NARKAR et al., 2008), indo na mesma direção dos nossos dados referentes à atividade máxima da enzima hexoquinase. Mesmo considerando essa diferença de responsividade entre os músculos estudados, ressaltamos que o TFA em alta intensidade promoveu aumento da atividade da enzima em questão em ambos os músculos estudados.

Ainda tratando do perfil metabólico da musculatura esquelética, não observamos diferenças entre os grupos SHAM e INF-SED no que diz respeito ao conteúdo de glicogênio intramuscular em ambos os músculos estudados. Este resultado reproduz achados de um estudo anterior que também observou conteúdo de glicogênio preservado em diferentes músculos de ratos infartados (MUSCH et al., 1988), entretanto, o mesmo estudo demonstrou que esse importante substrato energético é mais rapidamente consumido durante esforços físicos submáximos nos animais infartados em comparação aos animais saudáveis, o que foi também observado em outros estudos utilizando modelos experimentais ou pacientes com IC (MUSCH et al., 1990; MANCINI et al., 1999).

Por outro lado, ambos os protocolos de TFA promoveram aumento substancial do estoque de glicogênio intramuscular nos músculos sóleo e plantar dos animais infartados, sem diferença significativa entre os protocolos. O aumento do estoque de glicogênio intramuscular é comum após o TFA (GREIWE et al., 1999), além de ser um resultado desejável em situações de disfunção cardíaca, uma vez que, como citado acima, foi demonstrado que a rápida utilização deste substrato energético é uma característica de pacientes e modelos experimentais de IC, além de possuir implicações importantes na capacidade física dos mesmos (MUSCH et al., 1990; MANCINI et al., 1999).

Além de prejuízos metabólicos, a miopatia esquelética observada nos animais foi caracterizada também por alterações morfológicas. Assim como demonstrado em estudos prévios do nosso laboratório (BACURAU et al., 2009; BUENO et al., 2010), a disfunção cardíaca causou atrofia muscular das fibras musculares do tipo I e tipo II no músculo sóleo. Nosso grupo já demonstrou também que o TFA em intensidade moderada é capaz de



prevenir esse fenômeno (BACURAU et al., 2009; BUENO et al., 2010), entretanto, o presente estudo descreve também os efeitos do TFA em alta intensidade.

Diferente do que hipotetizamos inicialmente, o TFA em alta intensidade não promoveu resultados significativamente superiores ao protocolo em intensidade moderada, de forma que ambos os grupos submetidos ao TFA apresentaram reversão da atrofia das fibras dos tipos I e II do músculo sóleo.

Quando nos atemos ao músculo plantar, novamente observamos respostas diferenciadas tanto ao estímulo patológico (i.e. IM) quanto ao fisiológico (i.e. TFA). Diferente do músculo sóleo, observamos atrofia apenas das fibras do tipo II no músculo plantar. Além disso, o efeito do TFA foi modesto no trofismo deste tipo de fibra, uma vez que os animais infartados treinados em intensidade moderada ainda apresentavam atrofia dessas fibras, ao passo que uma sensível melhora foi observada nos ratos treinados em alta intensidade, uma vez que a diferença estatística entre os grupos SHAM e INF-TI apresentou  $p=0,06$ , deixando de ser significativa de acordo com os critérios adotados no presente estudo ( $p<0,05$ ), mas ainda apresentando fortíssima tendência. Possíveis mecanismos responsáveis por esta resposta diferenciada são discutidos a seguir.

Em um estudo muito bem delineado, Li e colaboradores (LI et al., 2007) demonstraram que as fibras com características glicolíticas do músculo plantar apresentaram maior rarefação capilar em camundongos com IC, em comparação com fibras oxidativas deste mesmo músculo. Per se, essa ocorrência pode promover a perda de conteúdo contrátil mais acentuada nas fibras do tipo II, uma vez que o aporte de suprimentos a essas fibras ficaria ainda mais comprometido. Além disso, os autores sugerem que a disfunção mitocondrial exacerbada nas fibras musculares do tipo II no modelo de IC utilizado, também podem contribuir para os danos mais pronunciados neste tipo de fibra muscular. Seguindo essa linha de raciocínio, um outro estudo demonstrou que a proteção de fibras musculares oxidativas contra estímulos caquéticos é parcialmente mediada pela maior produção de óxido nítrico nessas fibras, por induzir a expressão de enzimas antioxidantes, evitando o dano oxidativo (YU et al., 2008).

Com isso, considerando a importância do estresse oxidativo para a regulação da estrutura muscular, avaliamos a atividade máxima de enzimas antioxidantes da musculatura esquelética dos animais.

Apesar de não observarmos diferenças significantes na atividade máxima da enzima catalase, quando nos voltamos para a enzima SOD verificamos que ambos os protocolos de

treinamento preveniram a queda da atividade da mesma, sem diferenças entre os protocolos. A redução da atividade máxima da enzima SOD resulta em aumento da concentração intracelular de ânion superóxido, tóxico a diversos tipos celulares quando em altas concentrações (FRIDOVICH, 1997), o que pode ter contribuído para a atrofia muscular observada nos animais infartados sedentários. De fato, a perda funcional da enzima SOD promove efeitos altamente deletérios, como aceleração do processo atrofico devido ao envelhecimento (MULLER et al., 2006), agravamento de lesão por isquemia seguida de reperfusão da musculatura esquelética (PARK et al., 2005) e intolerância ao esforço físico (LUSTGARTEN et al., 2009). Assim, a ação preventiva dos protocolos de TFA em manter a atividade máxima da SOD próxima a valores normais (i.e. em relação ao grupo SHAM) pode ser um possível mecanismo intracelular responsável pela prevenção da atrofia na miopatia esquelética desencadeada pelo IM.

Além de apresentar redução da defesa antioxidante (menor atividade da enzima SOD), o músculo sóleo do grupo INF-SED apresentou também maior conteúdo de GSSG quando comparado ao grupo SHAM. A glutathione é um tripeptídeo produzido pelas células, que atua como um poderoso antioxidante endógeno (POMPELLA et al., 2003). Além de neutralizar radicais livres pela doação de elétrons do grupo tiol de seu resíduo cisteína, a glutathione é responsável pela manutenção do estado reduzido de antioxidantes exógenos, como as vitaminas C e E (HAYES e MCLELLAN, 1999). Após doação do elétron, a glutathione torna-se altamente reativa e reage com outra molécula de glutathione, formando o dissulfeto de glutathione (GSSG), sendo chamado de glutathione oxidada. A capacidade antioxidante da glutathione foi descrita anteriormente como um importante protetor contra prejuízos da musculatura esquelética, uma vez que a suplementação com N-acetilcisteína, um precursor de glutathione, atenua os prejuízos da musculatura esquelética em camundongos distróficos (WHITEHEAD et al., 2008), além de modular positivamente a função muscular em humanos (REID et al., 1994). Assim, o aumento de GSSG no músculo sóleo do grupo INF-SED sem aumento do conteúdo de glutathione total nos indica que o estado redox da célula muscular esquelética apresentou-se prejudicado nesse grupo, o que foi prevenido por ambos os protocolos de TFA.

Por fim, mas não menos importante, avaliamos a ativação do complexo proteassomal 26S nos músculos sóleo e plantar, uma vez que tal complexo é o agente do principal sistema proteolítico intracelular, quando tratamos de volume de degradação (i.e. quantidade de proteínas degradadas) (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002), o SUP. Acredita-se que a

ativação deste sistema em estados catabólicos é responsável, pelo menos em parte, pelos fenótipos atrofícos observados nessas situações, uma vez que a degradação de proteínas contráteis compromete a morfologia da célula muscular (BODINE et al., 2001). De fato, observamos que a atrofia muscular no grupo INF-SED estava relacionada a um aumento da atividade proteassomal 26S nos músculos sóleo e plantar, ao passo que os protocolos de TFA foram igualmente eficazes em prevenir o aumento da atividade do complexo proteolítico. De forma interessante, a atividade do complexo proteassomal 26S apresentou correlação inversa com a massa do músculo sóleo ( $r=0,59$ ,  $p<0,0002$ , APÊNDICE D). Entretanto, este achado não garante uma relação causal entre a atividade proteassomal e a atrofia muscular.

A literatura relacionada ao tema nos mostra 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), o que pode ter ocorrido na musculatura esquelética dos animais infartados sedentários, que apresentaram balanço redox alterado e defesa antioxidante prejudicada. Entretanto, é importante citar que nossos dados não nos permitem garantir que este realmente tenha sido o caso, uma vez que utilizamos um substrato sintético em excesso para a mensuração da atividade máxima do complexo proteassomal, sugerindo que o aumento de sua atividade no grupo INF-SED possa também ter ocorrido devido a alterações pós-traducionais específicas no centro proteolítico, uma vez que a disponibilidade de substratos não era fator limitante da reação.

O SUP tem sido extensivamente estudado em condições catabólicas da musculatura, uma vez que a ativação deste sistema é necessária para que ocorra atrofia muscular (BODINE et al., 2001). O interesse no sistema é proeminente ao ponto de se sugerir seu bloqueio como terapia contra a miopatia esquelética (BEEHLER et al., 2006; JAMART et al., 2011). Entretanto, acreditamos que esta estratégia não seja desejável em um quadro de disfunção cardíaca, uma vez que o proteassoma é o principal efetor do mecanismo conhecido como “controle de qualidade de proteínas” (WILLIS et al., 2010), possuindo papel fundamental na remoção de proteínas potencialmente tóxicas ao ambiente intracelular (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). Nesse sentido, sua inibição poderia gerar efeitos cardiovasculares deletérios, como agravamento da disfunção cardíaca, como descrito anteriormente (NOWIS et al., 2010). Por outro lado, ambos os protocolos de TFA, além de ter restaurado a ativação proteassomal para níveis próximos ao grupo SHAM (sem diferença significativa entre INF-TC e INF-TI), promoveram benefícios cardiovasculares substanciais nos animais infartados.

Dado o importante papel do SUP na degradação de proteínas potencialmente tóxicas ao ambiente celular, avaliamos a marcação de proteínas citosólicas por ubiquitina (sinal de degradação pelo proteassoma) e verificamos que apenas o músculo sóleo dos animais pertencentes ao grupo INF-SED apresentou maior conteúdo de proteínas ubiquitinadas, indicando que mesmo com o aumento da atividade proteolítica do complexo proteassomal, ainda ocorreu acúmulo de proteínas marcadas para degradação. Ambos os protocolos de TFA preveniram esta ocorrência, mantendo o conteúdo de proteínas ubiquitinadas próximos aos do grupo SHAM.

Infelizmente, as estratégias metodológicas utilizadas não nos permitem garantir que o aumento da marcação de proteínas para degradação (ubiquitinação) no músculo sóleo do grupo INF-SED e da degradação proteassomal estejam atingindo proteínas contráteis, apesar disso, os dados obtidos evidenciam a ativação do SUP na musculatura esquelética dos animais infartados sedentários, o que foi completamente prevenido por ambos os protocolos de TFA, sem qualquer diferença significativa entre os dois protocolos utilizados.

Apesar do crescente interesse científico sobre as alterações músculo-esqueléticas desencadeadas por quadros de disfunção cardíaca, até o momento, muito pouco se sabe sobre os mecanismos celulares responsáveis por estas alterações. Além disso, apesar de os benefícios morfofuncionais do TFA na musculatura esquelética de pacientes com IC já serem descritos na literatura há anos, a literatura carece de estudos que avaliem vias intracelulares capazes de modular esta resposta, bem como os efeitos de diferentes modalidades e intensidades de TFA. Nesse sentido, nosso estudo fornece evidências importantes sobre vias capazes de modular a evolução da miopatia esquelética num modelo animal de disfunção cardíaca de etiologia isquêmica, além de apresentar dados inéditos em relação aos efeitos de diferentes intensidades de TFA nas alterações músculo-esqueléticas em ratos infartados.

## 8 CONCLUSÃO

Analisados em conjunto, nossos dados sugerem que a miopatia esquelética desencadeada pelo infarto do miocárdio apresentou-se associada a prejuízos das vias metabólicas, aumento do estresse oxidativo e ativação do SUP em músculos esqueléticos com diferentes características, o que foi efetivamente prevenido tanto pelo TFA em intensidade moderada quanto pelo protocolo realizado em alta intensidade. E, apesar do TFA em alta intensidade ter proporcionado resultados superiores ao protocolo de intensidade moderada em relação à capacidade funcional dos animais, as adaptações músculo-esqueléticas às diferentes intensidades de TFA apresentaram-se muito semelhantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACSM American College of Sports Medicine Position Stand and American Heart Association. **Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities.** *Med Sci Sports Exerc* 30(6): 1009-1018. 1998
- 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
- ALP, P. R., NEWSHOLME, E. A. e ZAMMIT, V. A. **Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates.** *Biochem J* 154(3): 689-700. 1976
- AMERICA, H. F. S. O. **Conceptualization and working definition of heart failure.** *J Card Fail* 12(1): e10-11. 2006
- ANDRADE, F. H., REID, M. B., ALLEN, D. G. e WESTERBLAD, H. **Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse.** *J Physiol* 509 ( Pt 2): 565-575. 1998
- 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
- AUSTIN, J., WILLIAMS, R., ROSS, L., MOSELEY, L. e HUTCHISON, S. **Randomised controlled trial of cardiac rehabilitation in elderly patients with heart failure.** *Eur J Heart Fail* 7(3): 411-417. 2005
- BACURAU, A. V., JARDIM, M. A., FERREIRA, J. C., BECHARA, L. R., BUENO JUNIOR, C. R., 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*. 2009
- BAUMEISTER, W., WALZ, J., ZUHL, F. e SEEMULLER, E. **The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease.** *Cell* 92(3): 367-380. 1998
- BEEHLER, B. C., SLEPH, P. G., BENMASSAOUD, L. e GROVER, G. J. **Reduction of skeletal muscle atrophy by a proteasome inhibitor in a rat model of denervation.** *Exp Biol Med (Maywood)* 231(3): 335-341. 2006
- BENGE, W., LITCHFIELD, R. L. e MARCUS, M. L. **Exercise capacity in patients with severe left ventricular dysfunction.** *Circulation* 61(5): 955-959. 1980
- 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
- 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
- BREUSING, N., ARNDT, J., VOSS, P., BRESGEN, N., WISWEDEL, I., GARDEMANN, A., SIEMS, W. e GRUNE, T. **Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung.** *Mech Ageing Dev* 130(11-12): 748-753. 2009
- BROOKE, M. H. e KAISER, K. K. **Muscle fiber types: how many and what kind?** *Arch Neurol* 23(4): 369-379. 1970
- 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 Ca<sup>2+</sup> handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure.** *J Appl Physiol* 109(3): 702-709. 2010
- BUHL, E. S., JESSEN, N., SCHMITZ, O., PEDERSEN, S. B., PEDERSEN, O., HOLMAN, G. D. e LUND, S. **Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner.** *Diabetes* 50(1): 12-17. 2001
- CIECHANOVER, A., HELLER, H., ELIAS, S., HAAS, A. L. e HERSHKO, A. **ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(3): 1365-1368. 1980
- CIECHANOVER, A., HELLER, H., KATZ-ETZION, R. e HERSHKO, A. **Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(2): 761-765. 1981
- CIVITARESE, A. E., CARLING, S., HEILBRONN, L. K., HULVER, M. H., UKROPCOVA, B., DEUTSCH, W. A., SMITH, S. R., RAVUSSIN, E. e TEAM, C. P. **Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans.** *PLoS Med* 4(3): e76. 2007
- 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
- COATS, A. J. **Clinical utility of exercise training in chronic systolic heart failure.** *Nat Rev Cardiol* 8(7): 380-392. 2011
- COATS, A. J., ADAMOPOULOS, S., MEYER, T. E., CONWAY, J. e SLEIGHT, P. **Effects of physical training in chronic heart failure.** *Lancet* 335(8681): 63-66. 1990
- COIRAULT, C., GUELLICH, 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
- DAI, D. F., SANTANA, L. F., VERMULST, M., TOMAZELA, D. M., EMOND, M. J., MACCOSS, M. J., GOLLAHON, K., MARTIN, G. M., LOEB, L. A., LADIGES, W. C. e RABINOVITCH, P. S. **Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging.** *Circulation* 119(21): 2789-2797. 2009
- DALLA LIBERA, L., RAVARA, B., GOBBO, V., BETTO, D. D., GERMINARIO, E., ANGELINI, A., EVANGELISTA, S. e VESCOVO, G. **Skeletal muscle proteins oxidation in chronic right heart failure in rats: can different beta-blockers prevent it to the same degree?** *Int J Cardiol* 143(2): 192-199. 2010
- DAVEY, P., MEYER, T., COATS, A., ADAMOPOULOS, S., CASADEI, B., CONWAY, J. e SLEIGHT, P. **Ventilation in chronic heart failure: effects of physical training.** *Br Heart J* 68(5): 473-477. 1992

- DRACUP, K., EVANGELISTA, L. S., HAMILTON, M. A., ERICKSON, V., HAGE, A., MORIGUCHI, J., CANARY, C., MACLELLAN, W. R. e FONAROW, G. C. **Effects of a home-based exercise program on clinical outcomes in heart failure.** *Am Heart J* 154(5): 877-883. 2007
- DREXLER, H., BANHARDT, U., MEINERTZ, T., WOLLSCHLAGER, H., LEHMANN, M. e JUST, H. **Contrasting peripheral short-term and long-term effects of converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled trial.** *Circulation* 79(3): 491-502. 1989
- 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
- FRAGA, R., FRANCO, F. G., ROVEDA, F., DE MATOS, L. N., BRAGA, A. M., RONDON, M. U., ROTTA, D. R., BRUM, P. C., BARRETTO, A. C., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol.** *Eur J Heart Fail* 9(6-7): 630-636. 2007
- FRIDOVICH, I. **Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters.** *J Biol Chem* 272(30): 18515-18517. 1997
- FUEGER, P. T., SHEARER, J., KRUEGER, T. M., POSEY, K. A., BRACY, D. P., HEIKKINEN, S., LAAKSO, M., ROTTMAN, J. N. e WASSERMAN, D. H. **Hexokinase II protein content is a determinant of exercise endurance capacity in the mouse.** *J Physiol* 566(Pt 2): 533-541. 2005
- 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
- GEROVASIL, V., DRAKOS, S., KRAVARI, M., MALLIARAS, K., KARATZANOS, E., DIMOPOULOS, S., TASOULIS, A., ANASTASIOU-NANA, M., ROUSSOS, C. e NANAS, S. **Physical exercise improves the peripheral microcirculation of patients with chronic heart failure.** *J Cardiopulm Rehabil Prev* 29(6): 385-391. 2009
- GIBALA, M. J., LITTLE, J. P., VAN ESSEN, M., WILKIN, G. P., BURGOMASTER, K. A., SAFDAR, A., RAHA, S. e TARNOPOLSKY, M. A. **Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance.** *J Physiol* 575(Pt 3): 901-911. 2006
- GLICKMAN, M. H. e CIECHANOVER, A. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.** *Physiol Rev* 82(2): 373-428. 2002
- 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
- GREIWE, J. S., HICKNER, R. C., HANSEN, P. A., RACETTE, S. B., CHEN, M. M. e HOLLOSZY, J. O. **Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans.** *J Appl Physiol* 87(1): 222-226. 1999
- GRZELAK, A., KRUSZEWSKI, M., MACIERZYNSKA, E., PIOTROWSKI, L., PULASKI, L., RYCHLIK, B. e BARTOSZ, G. **The effects of superoxide**



- dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes.** *Cell Mol Biol Lett* 14(1): 23-34. 2009
- 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
- Haidara, M. A., IBRAHIM, I. M., AL-TUWAIJRI, A. S., AWADALLA, S. A. e YASEEN, H. **Effect of alpha-tocopherol on glucose uptake and contractility in rat skeletal muscle.** *Med Sci Monit* 9(5): BR174-177. 2003
- 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
- HARRINGTON, D., ANKER, S. D., CHUA, T. P., WEBB-PEPLOE, K. M., PONIKOWSKI, P. P., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 30(7): 1758-1764. 1997
- HASSAN, H. M. e FRIDOVICH, I. **Regulation and role of superoxide dismutase.** *Biochem Soc Trans* 6(2): 356-361. 1978
- HAYES, J. D. e MCLELLAN, L. I. **Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress.** *Free Radic Res* 31(4): 273-300. 1999
- HOYDAL, M. A., WISLOFF, U., KEMI, O. J. e ELLINGSEN, O. **Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(6): 753-760. 2007
- JAMART, C., RAYMACKERS, J. M., LI AN, G., DELDICQUE, L. e FRANCAUX, M. **Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor.** *Muscle Nerve* 43(5): 708-716. 2011
- 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
- KAISER, P. e HUANG, L. **Global approaches to understanding ubiquitination.** *Genome Biol* 6(10): 233. 2005
- KELLERMANN, J. J. **The role of exercise therapy in patients with impaired ventricular function and chronic heart failure.** *J Cardiovasc Pharmacol* 10 Suppl 6: S172-177. 1987
- KEMI, O. J., HOYDAL, M. A., HARAM, P. M., GARNIER, A., FORTIN, D., VENTURA-CLAPIER, R. e ELLINGSEN, O. **Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan.** *Cardiovasc Res* 76(1): 91-99. 2007
- KOBA, S., GAO, Z. e SINOWAY, L. I. **Oxidative stress and the muscle reflex in heart failure.** *J Physiol* 587(Pt 21): 5227-5237. 2009
- 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
- KUWAHARA, H., HORIE, T., ISHIKAWA, S., TSUDA, C., KAWAKAMI, S., NODA, Y., KANEKO, T., TAHARA, S., TACHIBANA, T., OKABE, M., MELKI, J., TAKANO, R., TODA, T., MORIKAWA, D., NOJIRI, H., KUROSAWA, H., SHIRASAWA, T. e SHIMIZU, T. **Oxidative stress in skeletal muscle causes**

- severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy.** *Free Radic Biol Med* 48(9): 1252-1262. 2010
- LANG, C. C., CHOMSKY, D. B., RAYOS, G., YEOH, T. K. e WILSON, J. R. **Skeletal muscle mass and exercise performance in stable ambulatory patients with heart failure.** *J Appl Physiol* 82(1): 257-261. 1997
- 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
- LEE, K. R., CRONENWETT, J. L., SHLAFFER, M., CORPRON, C. e ZELENOCK, G. B. **Effect of superoxide dismutase plus catalase on Ca<sup>2+</sup> transport in ischemic and reperfused skeletal muscle.** *J Surg Res* 42(1): 24-32. 1987
- LEVINE, R. L. **Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease.** *Free Radic Biol Med* 32(9): 790-796. 2002
- 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
- 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
- LITCHFIELD, R. L., KERBER, R. E., BENGE, J. W., MARK, A. L., SOPKO, J., BHATNAGAR, R. K. e MARCUS, M. L. **Normal exercise capacity in patients with severe left ventricular dysfunction: compensatory mechanisms.** *Circulation* 66(1): 129-134. 1982
- LOEW, O. **A New Enzyme of General Occurrence in Organisms.** *Science* 11(279): 701-702. 1900
- LONGHURST, J., CAPONE, R. J. e ZELIS, R. **Evaluation of skeletal muscle capillary basement membrane thickness in congestive heart failure.** *Chest* 67(2): 195-198. 1975
- LOPEZ-JARAMILLO, P. **Defining the research priorities to fight the burden of cardiovascular diseases in Latin America.** *J Hypertens* 26(9): 1886-1889. 2008
- LUCAS, C., JOHNSON, W., HAMILTON, M. A., FONAROW, G. C., WOO, M. A., FLAVELL, C. M., CREASER, J. A. e STEVENSON, L. W. **Freedom from congestion predicts good survival despite previous class IV symptoms of heart failure.** *Am Heart J* 140(6): 840-847. 2000
- LUSTGARTEN, M. S., JANG, Y. C., LIU, Y., MULLER, F. L., QI, W., STEINHELPER, M., BROOKS, S. V., LARKIN, L., SHIMIZU, T., SHIRASAWA, T., MCMANUS, L. M., BHATTACHARYA, A., RICHARDSON, A. e VAN REMMEN, H. **Conditional knockout of Mn-SOD targeted to type IIB skeletal muscle fibers increases oxidative stress and is sufficient to alter aerobic exercise capacity.** *Am J Physiol Cell Physiol* 297(6): C1520-1532. 2009
- MAKINO, N., MAEDA, T., OYAMA, J., SASAKI, M., HIGUCHI, Y., MIMORI, K. e SHIMIZU, T. **Antioxidant therapy attenuates myocardial telomerase activity reduction in superoxide dismutase-deficient mice.** *J Mol Cell Cardiol* 50(4): 670-677. 2011

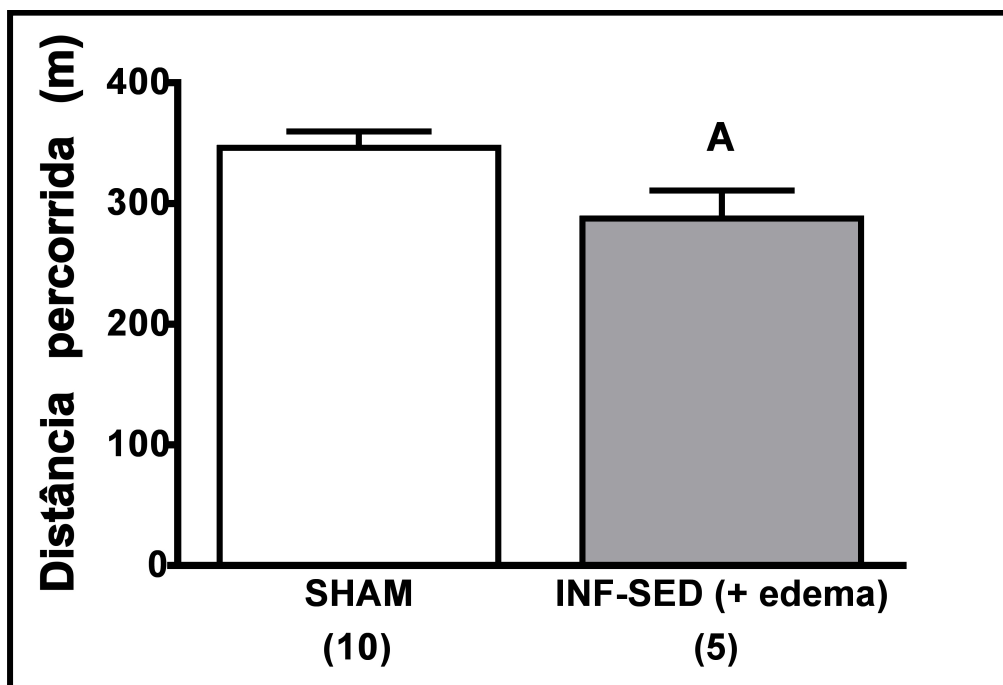
- MANCINI, D., BENAMINOVITZ, A., CORDISCO, M. E., KARMALLY, W. e WEINBERG, A. **Slowed glycogen utilization enhances exercise endurance in patients with heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 34(6): 1807-1812. 1999
- MANCINI, D. M., COYLE, E., COGGAN, A., BELTZ, J., FERRARO, N., MONTAIN, S. e WILSON, J. R. **Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to <sup>31</sup>P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure.** *Circulation* 80(5): 1338-1346. 1989
- 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
- MASSIE, B. M., CONWAY, M., YONGE, R., FROSTICK, S., SLEIGHT, P., LEDINGHAM, J., RADDA, G. e RAJAGOPALAN, B. **<sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure.** *Am J Cardiol* 60(4): 309-315. 1987
- 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 erythrocyte (hemocuprein).** *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055. 1969
- MCMULLEN, J. R. e JENNINGS, G. L. **Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4): 255-262. 2007
- MELOV, S., RAVENSCROFT, J., MALIK, S., GILL, M. S., WALKER, D. W., CLAYTON, P. E., WALLACE, D. C., MALFROY, B., DOCTROW, S. R. e LITHGOW, G. J. **Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics.** *Science* 289(5484): 1567-1569. 2000
- METTAUER, B., ZOLL, J., GARNIER, A. e VENTURA-CLAPIER, R. **Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure.** *Pflugers Arch* 452(6): 653-666. 2006
- 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
- MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway.** *N Engl J Med* 335(25): 1897-1905. 1996
- MOHOLDT, T. T., AMUNDSEN, B. H., RUSTAD, L. A., WAHBA, A., LOVO, K. T., GULLIKSTAD, L. R., BYE, A., SKOGVOLL, E., WISLOFF, U. e SLORDAHL, S. A. **Aerobic interval training versus continuous moderate exercise after coronary artery bypass surgery: a randomized study of cardiovascular effects and quality of life.** *Am Heart J* 158(6): 1031-1037. 2009
- MOLMEN-HANSEN, H. E., STOLEN, T., TJONNA, A. E., AAMOT, I. L., EKEBERG, I. S., TYLDUM, G. A., WISLOFF, U., INGUL, C. B. e STOYLEN, A. **Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011
- MULLER, F. L., SONG, W., LIU, Y., CHAUDHURI, A., PIEKE-DAHL, S., STRONG, R., HUANG, T. T., EPSTEIN, C. J., ROBERTS, L. J., 2ND, CSETE, M., FAULKNER, J. A. e VAN REMMEN, H. **Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy.** *Free Radic Biol Med* 40(11): 1993-2004. 2006

- MUSCH, T. I., GHAUL, M. R., TRANCHITELLA, V. e ZELIS, R. **Skeletal muscle glycogen depletion during submaximal exercise in rats with chronic heart failure.** *Basic Res Cardiol* 85(6): 606-618. 1990
- MUSCH, T. I., MOORE, R. L., RIEDY, M., BURKE, P., ZELIS, R., LEO, M. E., BRUNO, A. e BRADFORD, G. E. **Glycogen concentrations and endurance capacity of rats with chronic heart failure.** *J Appl Physiol* 64(3): 1153-1159. 1988
- NARKAR, V. A., DOWNES, M., YU, R. T., EMBLER, E., WANG, Y. X., BANAYO, E., MIHAYLOVA, M. M., NELSON, M. C., ZOU, Y., JUGUILON, H., KANG, H., SHAW, R. J. e EVANS, R. M. **AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics.** *Cell* 134(3): 405-415. 2008
- NICOLETTI, I., CICOIRA, M., ZANOLLA, L., FRANCESCHINI, L., BRIGHETTI, G., PILATI, M. e ZARDINI, P. **Skeletal muscle abnormalities in chronic heart failure patients: relation to exercise capacity and therapeutic implications.** *Congest Heart Fail* 9(3): 148-154. 2003
- NOWIS, D., MACZEWSKI, M., MACKIEWICZ, U., KUJAWA, M., RATAJSKA, A., WIECKOWSKI, M. R., WILCZYNSKI, G. M., MALINOWSKA, M., BIL, J., SALWA, P., BUGAJSKI, M., WOJCIK, C., SINSKI, M., ABRAMCZYK, P., WINIARSKA, M., DABROWSKA-IWANICKA, A., DUSZYNSKI, J., JAKOBISIAK, M. e GOLAB, J. **Cardiotoxicity of the anticancer therapeutic agent bortezomib.** *Am J Pathol* 176(6): 2658-2668. 2010
- NYSTROM, T. **Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence.** *EMBO J* 24(7): 1311-1317. 2005
- 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
- PARK, J. W., QI, W. N., CAI, Y., ZELKO, I., LIU, J. Q., CHEN, L. E., URBANIAK, J. R. e FOLZ, R. J. **Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): H181-187. 2005
- PICANO, E., GARGANI, L. e GHEORGHIADU, M. **Why, when, and how to assess pulmonary congestion in heart failure: pathophysiological, clinical, and methodological implications.** *Heart Fail Rev* 15(1): 63-72. 2010
- PIEPOLI, M., CLARK, A. L., VOLTERRANI, M., ADAMOPOULOS, S., SLEIGHT, P. e COATS, A. J. **Contribution of muscle afferents to the hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in patients with chronic heart failure: effects of physical training.** *Circulation* 93(5): 940-952. 1996
- POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., DE TATA, V. e CASINI, A. F. **The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.** *Biochem Pharmacol* 66(8): 1499-1503. 2003
- REID, M. B., STOKIC, D. S., KOCH, S. M., KHAWLI, F. A. e LEIS, A. A. **N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans.** *J Clin Invest* 94(6): 2468-2474. 1994
- ROGNMO, O., HETLAND, E., HELGERUD, J., HOFF, J. e SLORDAHL, S. A. **High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for**

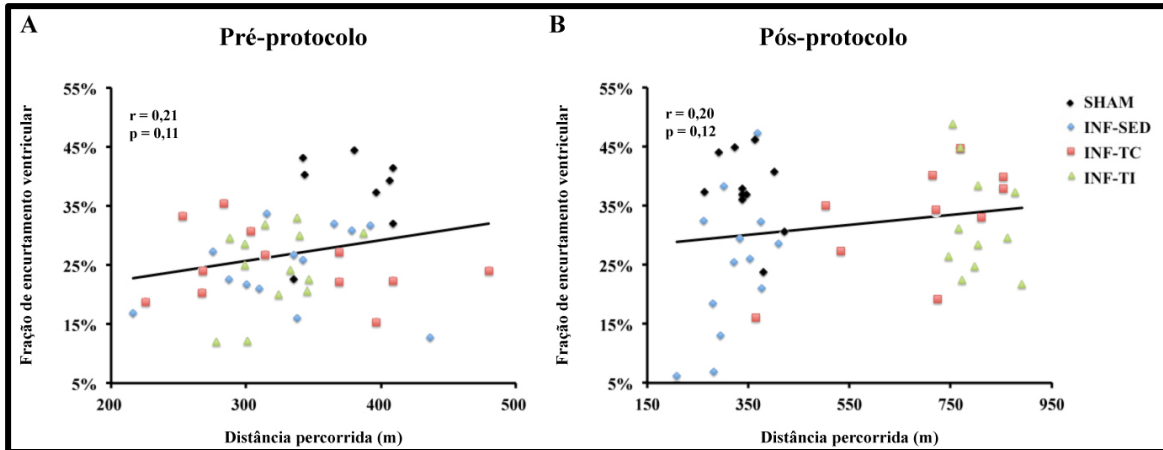
- increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 11(3): 216-222. 2004
- SELSBY, J. T. **Increased catalase expression improves muscle function in mdx mice.** *Exp Physiol* 96(2): 194-202. 2011
- SHANG, F., GONG, X. e TAYLOR, A. **Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated.** *J Biol Chem* 272(37): 23086-23093. 1997
- 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
- STOLEN, K. Q., KEMPPAINEN, J., UKKONEN, H., KALLIOKOSKI, K. K., LUOTOLAHTI, M., LEHIKONEN, P., HAMALAINEN, H., SALO, T., AIRAKSINEN, K. E., NUUTILA, P. e KNUUTI, J. **Exercise training improves biventricular oxidative metabolism and left ventricular efficiency in patients with dilated cardiomyopathy.** *J Am Coll Cardiol* 41(3): 460-467. 2003
- STRATTON, J. R., DUNN, J. F., ADAMOPOULOS, S., KEMP, G. J., COATS, A. J. e RAJAGOPALAN, B. **Training partially reverses skeletal muscle metabolic abnormalities during exercise in heart failure.** *J Appl Physiol* 76(4): 1575-1582. 1994
- SULLIVAN, M. J., HIGGINBOTHAM, M. B. e COBB, F. R. **Exercise training in patients with chronic heart failure delays ventilatory anaerobic threshold and improves submaximal exercise performance.** *Circulation* 79(2): 324-329. 1989
- SULLIVAN, M. J., HIGGINBOTHAM, M. B. e COBB, F. R. **Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects.** *Circulation* 78(3): 506-515. 1988
- SWAN, J. W., ANKER, S. D., WALTON, C., GODSLAND, I. F., CLARK, A. L., LEYVA, F., STEVENSON, J. C. e COATS, A. J. **Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 30(2): 527-532. 1997
- TJONNA, A. E., LEE, S. J., ROGNMO, O., STOLEN, T. O., BYE, A., HARAM, P. M., LOENNECHEN, J. P., AL-SHARE, Q. Y., SKOGVOLL, E., SLORDAHL, S. A., KEMI, O. J., NAJJAR, S. M. e WISLOFF, U. **Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study.** *Circulation* 118(4): 346-354. 2008
- TREIBER, N., MAITY, P., SINGH, K., KOHN, M., KEIST, A. F., FERCHIU, F., SANTE, L., FRESE, S., BLOCH, W., KREPPPEL, F., KOCHANNEK, S., SINDRILARU, A., IBEN, S., HOGEL, J., OHNMACHT, M., CLAES, L. E., IGNATIUS, A., CHUNG, J. H., LEE, M. J., KAMENISCH, Y., BERNEBURG, M., NIKOLAUS, T., BRAUNSTEIN, K., SPERFELD, A. D., LUDOLPH, A. C., BRIVIBA, K., WLASCHEK, M. e SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. **Accelerated aging phenotype in mice with conditional deficiency for mitochondrial superoxide dismutase in the connective tissue.** *Aging Cell* 10(2): 239-254. 2011
- WHITEHEAD, N. P., PHAM, C., GERVASIO, O. L. e ALLEN, D. G. **N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice.** *J Physiol* 586(7): 2003-2014. 2008
- WIEGAND, G. e REMINGTON, S. J. **Citrate synthase: structure, control, and mechanism.** *Annu Rev Biophys Chem* 15: 97-117. 1986
- WIENER, D. H., FINK, L. I., MARIS, J., JONES, R. A., CHANCE, B. e WILSON, J. R. **Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in patients with heart failure: role of reduced muscle blood flow.** *Circulation* 73(6): 1127-1136. 1986

- WILLIS, M. S., TOWNLEY-TILSON, W. H., KANG, E. Y., HOMEISTER, J. W. e PATTERSON, C. **Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease.** *Circ Res* 106(3): 463-478. 2010
- WILSON, J. R., MARTIN, J. L. e FERRARO, N. **Impaired skeletal muscle nutritive flow during exercise in patients with congestive heart failure: role of cardiac pump dysfunction as determined by the effect of dobutamine.** *Am J Cardiol* 53(9): 1308-1315. 1984
- WISLOFF, U., STOYLEN, A., LOENNECHEN, J. P., BRUVOLD, M., ROGNMO, O., HARAM, P. M., TJONNA, A. E., HELGERUD, J., SLORDAHL, S. A., LEE, S. J., VIDEM, V., BYE, A., SMITH, G. L., NAJJAR, S. M., ELLINGSEN, O. e SKJAERPE, T. **Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study.** *Circulation* 115(24): 3086-3094. 2007
- YAZDANYAR, A. e NEWMAN, A. B. **The burden of cardiovascular disease in the elderly: morbidity, mortality, and costs.** *Clin Geriatr Med* 25(4): 563-577, vii. 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
- ZAMMIT, V. A. e NEWSHOLME, E. A. **The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates.** *Biochem J* 160(3): 447-462. 1976
- 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

## APÊNDICES

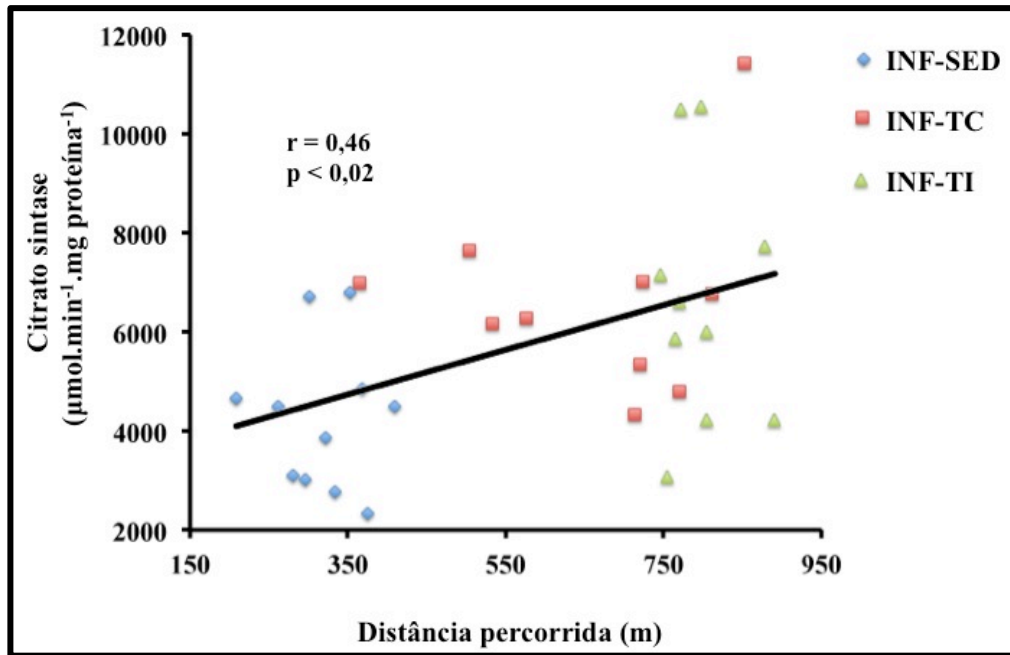


APÊNDICE A - Distância total percorrida em teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante em animais saudáveis SHAM ou infartados que apresentaram edema pulmonar 12 semanas após os procedimentos cirúrgicos (INF-SED [+ edema]). O número de animais por grupo encontra-se indicado entre parênteses. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado teste t de Student. A  $p < 0,05$  vs. SHAM;

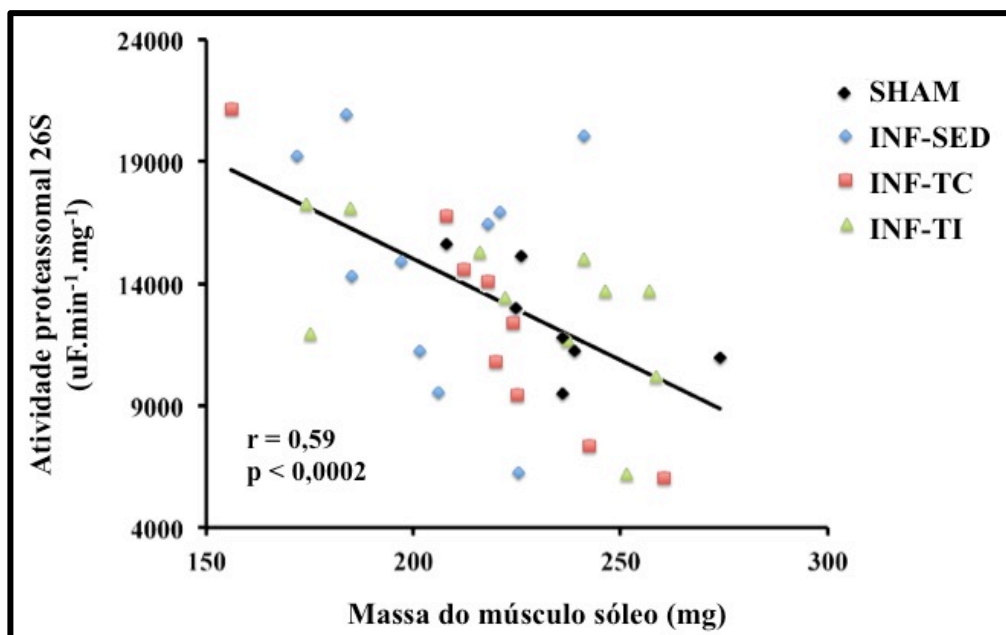


APÊNDICE B – Correlação entre a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e distância total percorrida em teste de corrida em esteira com carga incremental até a exaustão, quatro (A) e 12 (B) semanas após os procedimentos cirúrgicos.  $r$  = coeficiente de correlação de Pearson. Como nível de significância foi adotado  $p < 0,05$ .





APÊNDICE C – Correlação entre atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo plantar e distância total percorrida em teste de corrida em esteira com carga incremental.  $r$  = coeficiente de correlação de Pearson. Como nível de significância foi adotado  $p < 0,05$ .



APÊNDICE D – Correlação entre atividade do complexo proteassomal 26S e massa do músculo sóleo.  $r = 0,59$  e  $p < 0,0002$ . Como nível de significância foi adotado  $p < 0,05$ .

## ANEXOS

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	45%	29%	19%	37%
<b>2</b>	31%	26%	34%	30%
<b>3</b>	46%	7%	27%	26%
<b>4</b>	36%	38%	42%	22%
<b>5</b>	37%	30%	32%	28%
<b>6</b>	38%	6%	38%	22%
<b>7</b>	40%	13%	33%	38%
<b>8</b>	40%	18%	40%	45%
<b>9</b>	46%	32%	45%	31%
<b>10</b>			40%	
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>39,89%</b>	<b>22,11%</b>	<b>35,00%</b>	<b>31,00%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>5,09%</b>	<b>11,53%</b>	<b>7,76%</b>	<b>7,73%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>1,70%</b>	<b>3,84%</b>	<b>2,45%</b>	<b>2,58%</b>

ANEXO A – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiograma, apresentada em porcentagem (%). Os dados são referentes ao período pós-protocolo experimental (12 semanas após os procedimentos cirúrgicos).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	323	209	365	746
<b>2</b>	264	261	503	755
<b>3</b>	422	280	533	766
<b>4</b>	363	282	576	770
<b>5</b>	338	296	714	772
<b>6</b>	338	301	720	797
<b>7</b>	338	322	723	805
<b>8</b>	292	333	770	805
<b>9</b>	380	353	811	862
<b>10</b>	402	368	853	878
<b>11</b>	347	375	853	891
<b>12</b>		376		
<b>13</b>		409		
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>346,08</b>	<b>320,38</b>	<b>674,64</b>	<b>804,27</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>45,48</b>	<b>55,85</b>	<b>158,87</b>	<b>50,84</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>13,71</b>	<b>15,49</b>	<b>47,90</b>	<b>15,33</b>

ANEXO B – Distância total percorrida em teste de corrida em esteira com cargas incrementais até a exaustão, apresentada em metros. Os dados são referentes ao período pós-protocolo experimental (12 semanas após os procedimentos cirúrgicos).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	272,70	185,20	219,90	184,70
<b>2</b>	313,50	183,70	242,30	174,00
<b>3</b>	225,90	220,90	218,00	222,20
<b>4</b>	239,00	225,30	260,40	246,40
<b>5</b>	236,00	197,00	208,00	175,00
<b>6</b>	257,60	218,00	224,90	258,60
<b>7</b>	224,70	172,00	156,00	237,20
<b>8</b>	274,00	241,10	224,00	251,50
<b>9</b>	208,10	245,00	212,10	257,00
<b>10</b>		206,00		241,00
<b>11</b>		201,60		216,00
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>250,17</b>	<b>208,71</b>	<b>218,40</b>	<b>223,96</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>32,55</b>	<b>23,66</b>	<b>28,40</b>	<b>32,43</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>10,85</b>	<b>7,13</b>	<b>9,47</b>	<b>9,78</b>

ANEXO C – Massa do músculo sóleo, apresentada em mg.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	371,0	397,1	476,8	371,0
<b>2</b>	420,0	393,0	540,2	420,0
<b>3</b>	397,4	353,9	421,0	397,4
<b>4</b>	454,4	286,4	493,4	454,4
<b>5</b>	460,0	406,4	431,0	460,0
<b>6</b>	473,3	421,0	443,1	473,3
<b>7</b>	424,2	420,0	366,0	424,2
<b>8</b>	493,0	404,2	416,0	493,0
<b>9</b>	535,7	344,0	420,5	535,7
<b>10</b>	461,9	415,0		461,9
<b>11</b>	369,0	455,1		369,0
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>441,81</b>	<b>390,55</b>	<b>445,33</b>	<b>441,81</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>51,37</b>	<b>46,26</b>	<b>51,08</b>	<b>51,37</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>15,49</b>	<b>13,95</b>	<b>17,03</b>	<b>15,49</b>

ANEXO D – Massa do músculo plantar, apresentada em mg.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	2,82	2,87	2,93	3,19
<b>2</b>	3,29	3,02	3,09	2,63
<b>3</b>	3,09	2,93	2,92	3,38
<b>4</b>	2,98	3,39	3,37	3,11
<b>5</b>	2,79	3,06	3,01	3,35
<b>6</b>	2,60	3,16	3,01	3,55
<b>7</b>	2,56	3,23		3,18
<b>8</b>	2,51			4,10
<b>9</b>	2,77			3,18
<b>10</b>	2,87			2,97
<b>11</b>				3,34
<b>12</b>				2,83
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>2,83</b>	<b>3,09</b>	<b>3,06</b>	<b>3,23</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,24</b>	<b>0,18</b>	<b>0,17</b>	<b>0,37</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,08</b>	<b>0,07</b>	<b>0,07</b>	<b>0,11</b>

ANEXO E – Massa cardíaca corrigida pela massa corporal, apresentada em mg/g.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	4,53	4,74	4,07	4,51
<b>2</b>	4,55	5,17	4,85	4,52
<b>3</b>	4,47	4,73	4,52	4,58
<b>4</b>	4,50	4,30	4,80	4,90
<b>5</b>	4,46	4,91	4,34	4,49
<b>6</b>	4,38	4,10	4,60	4,39
<b>7</b>	4,00	4,86		4,65
<b>8</b>	4,65	4,59		4,64
<b>9</b>	4,23			4,07
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>4,42</b>	<b>4,68</b>	<b>4,53</b>	<b>4,53</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,20</b>	<b>0,34</b>	<b>0,29</b>	<b>0,22</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0,07</b>

ANEXO F – Razão massa úmida : massa seca dos pulmões.



<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	8291	2576	4800	5875
<b>2</b>	8853	6400	4343	6597
<b>3</b>	4066	3356	6759	3115
<b>4</b>	4050	4309	6981	3089
<b>5</b>	3636	3098	7635	4224
<b>6</b>	4003	4509	6180	4238
<b>7</b>	5500	2346	5340	6010
<b>8</b>	5185	3014	7010	10487
<b>9</b>	5171	4671	11423*	10549
<b>10</b>	4961	2762		7154
<b>11</b>	6274	6730		12087
<b>12</b>	3245	6804		7726
<b>13</b>	3713	3630		
<b>14</b>	6845	3865		
<b>15</b>	6650	4498		
<b>16</b>	9338			
<b>17</b>	5581			
<b>18</b>	6151			
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>5639,52</b>	<b>4171,15</b>	<b>6130,93</b>	<b>6762,43</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1818,53</b>	<b>1472,12</b>	<b>1180,20</b>	<b>2994,56</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>428,63</b>	<b>380,10</b>	<b>417,26</b>	<b>864,45</b>

ANEXO G – Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo, apresentada em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  proteínas citosólicas<sup>-1</sup>.  
 \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	8000	1495	3530	8064*
<b>2</b>	2824	1714	8777*	3102
<b>3</b>	4728	2346	3810	3974
<b>4</b>	5753	2488	3742	2910
<b>5</b>	3633	1208	3304	3111
<b>6</b>	9046	4620*	2322*	8168*
<b>7</b>	2723	1963	3418	3966
<b>8</b>	4154	4299*	3675	4748
<b>9</b>	5298	2725	2472*	3740
<b>10</b>	5840	2614		4712
<b>11</b>	3662	2089		3780
<b>12</b>	3140	2548		5180
<b>13</b>	1639	2430		
<b>14</b>	1900	3273		
<b>15</b>	2612			
<b>16</b>	3467			
<b>17</b>	5017			
<b>18</b>	2352			
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>4210,49</b>	<b>2240,90</b>	<b>3579,87</b>	<b>3922,20</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2019,23</b>	<b>575,37</b>	<b>196,69</b>	<b>767,59</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>475,94</b>	<b>166,10</b>	<b>80,30</b>	<b>242,73</b>

ANEXO H – Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo plantar, apresentada em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteínas citosólicas<sup>-1</sup>. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
1	0,211	0,180	0,227	0,263
2	0,178	0,210	0,193	0,228
3	0,174	0,180	0,147	0,344
4	0,367	0,197	0,228	0,218
5	0,368	0,157	0,185	0,304
6	0,241	0,159	0,367*	0,224
7	0,166	0,208	0,209	0,282
8	0,203	0,214	0,228	0,281
9	0,184	0,165		0,223
10	0,173	0,167		0,209
11	0,351	0,204		0,230
12	0,183	0,242		0,191
13	0,382	0,210		
14	0,222	0,209		
15	0,411	0,153		
16	0,177			
17	0,209			
18	0,225			
19				
20				
<b>MÉDIA</b>	<b>0,246</b>	<b>0,190</b>	<b>0,202</b>	<b>0,250</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,086</b>	<b>0,026</b>	<b>0,030</b>	<b>0,045</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,020</b>	<b>0,007</b>	<b>0,011</b>	<b>0,013</b>

ANEXO I – Atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo sóleo, apresentada em  $\Delta\text{UA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteínas citosólicas}^{-1}$ .  
 \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	0,355	0,441	0,317	0,113*
<b>2</b>	0,457	0,317	0,442	0,340
<b>3</b>	0,375	0,211	0,271	0,386
<b>4</b>	0,432	0,203	0,419	0,256
<b>5</b>	0,320	0,240	0,334	0,425
<b>6</b>	0,320	0,173	0,389	0,324
<b>7</b>	0,340	0,191	0,202	0,499
<b>8</b>	0,372	0,300	0,246	0,351
<b>9</b>	0,335	0,331	0,340	0,315
<b>10</b>	0,420	0,277	0,543	0,433
<b>11</b>	0,339	0,285		0,495
<b>12</b>	0,271	0,254		
<b>13</b>	0,415	0,333		
<b>14</b>	0,239	0,300		
<b>15</b>	0,395	0,245		
<b>16</b>	0,365	0,368		
<b>17</b>	0,404			
<b>18</b>	0,318			
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>0,360</b>	<b>0,279</b>	<b>0,350</b>	<b>0,382</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,056</b>	<b>0,071</b>	<b>0,101</b>	<b>0,080</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,013</b>	<b>0,018</b>	<b>0,032</b>	<b>0,025</b>

ANEXO J – Atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo plantar, apresentada em  $\Delta\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteínas citosólicas}^{-1}$ .  
 \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	892,4	622,7	1058,4	2063,0
<b>2</b>	1497,0	375,5	4209,3	1301,7
<b>3</b>	134,3	1995,2	2704,5	1409,1
<b>4</b>	479,8	142,6	376,7	1417,4
<b>5</b>	418,4	394,5	1474,7	274,6
<b>6</b>	979,8	1495,5	488,6	1914,6
<b>7</b>	503,6	918,1	1578,4	2297,3
<b>8</b>	521,7	1532,2	3481,4	2688,5
<b>9</b>	1304,6	731,0		3732,9
<b>10</b>	424,8	144,7		4342,0
<b>11</b>	725,6	1299,6		
<b>12</b>	2256,3	689,3		
<b>13</b>	203,0	1300,6		
<b>14</b>	2122,7	811,6		
<b>15</b>	332,1			
<b>16</b>	182,7			
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>811,18</b>	<b>889,51</b>	<b>1921,50</b>	<b>2144,11</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>663,78</b>	<b>561,94</b>	<b>1403,18</b>	<b>1202,18</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>165,94</b>	<b>150,19</b>	<b>496,10</b>	<b>380,16</b>

ANEXO L – Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, apresentado em  $\mu\text{g/g}$  de tecido seco.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	47,4	29,0	106,2	94,9
<b>2</b>	71,7	61,9	111,6	188,7
<b>3</b>	75,3	48,1	111,6	282,7
<b>4</b>	88,1	74,6	260,1	309,5
<b>5</b>	99,8	82,2	326,0	357,3
<b>6</b>	100,3	110,9	418,1	415,8
<b>7</b>	101,6	129,1	658,8	446,4
<b>8</b>	107,3	137,6	994,5	476,6
<b>9</b>	110,6	163,3		595,1
<b>10</b>	161,3	224,9		831,4*
<b>11</b>	165,2	208,7		
<b>12</b>	201,7	268,7		
<b>13</b>	205,7			
<b>14</b>	220,5			
<b>15</b>	331,8			
<b>16</b>	576,1*			
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>139,22</b>	<b>128,25</b>	<b>373,36</b>	<b>351,89</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>75,21</b>	<b>75,58</b>	<b>314,59</b>	<b>152,89</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>19,42</b>	<b>21,82</b>	<b>111,22</b>	<b>50,96</b>

ANEXO M – Conteúdo de glicogênio do músculo plantar, apresentado em  $\mu\text{g/g}$  de tecido seco. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	77,5%	73,0%	84,3%	80,0%
<b>2</b>	79,1%	75,8%	78,2%	75,8%
<b>3</b>	77,7%	83,8%	80,6%	73,5%
<b>4</b>	81,0%	65,0%	79,5%	81,4%
<b>5</b>	62,8%	70,3%	96,3%	85,3%
<b>6</b>	82,3%	64,1%	89,8%	93,9%
<b>7</b>	64,9%			
<b>8</b>	88,1%			
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>76,66%</b>	<b>72,00%</b>	<b>84,79%</b>	<b>81,66%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>8,58%</b>	<b>7,34%</b>	<b>7,04%</b>	<b>7,30%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>3,03%</b>	<b>3,00%</b>	<b>2,88%</b>	<b>2,98%</b>

ANEXO N – Porcentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	22,5%	27,0%	15,7%	20,0%
<b>2</b>	20,9%	24,2%	21,8%	24,2%
<b>3</b>	22,3%	16,2%	19,4%	26,5%
<b>4</b>	19,0%	35,0%	20,5%	18,6%
<b>5</b>	37,2%	29,7%	3,7%	14,7%
<b>6</b>	17,7%	35,9%	10,2%	6,1%
<b>7</b>	35,1%			
<b>8</b>	11,9%			
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>23,34%</b>	<b>28,00%</b>	<b>15,21%</b>	<b>18,34%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>8,58%</b>	<b>7,34%</b>	<b>7,04%</b>	<b>7,30%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>3,03%</b>	<b>3,00%</b>	<b>2,88%</b>	<b>2,98%</b>

ANEXO O – Porcentagem de fibras do tipo II no músculo sóleo.



<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	9,8%	4,4%	5,9%	14,4%
<b>2</b>	13,9%	20,4%	18,1%	13,7%
<b>3</b>	14,3%	3,8%	20,1%	11,5%
<b>4</b>	9,1%	8,6%	17,9%	16,1%
<b>5</b>	13,4%	12,0%	11,9%	17,3%
<b>6</b>	14,3%	7,9%	19,4%	11,7%
<b>7</b>		11,7%		16,1%
<b>8</b>				
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>12,47%</b>	<b>9,84%</b>	<b>15,56%</b>	<b>14,41%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,34%</b>	<b>5,62%</b>	<b>5,56%</b>	<b>2,25%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,96%</b>	<b>2,12%</b>	<b>2,27%</b>	<b>0,85%</b>

ANEXO P – Porcentagem de fibras do tipo I no músculo plantar.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	90,2%	95,6%	94,1%	85,6%
<b>2</b>	86,1%	79,6%	81,9%	86,3%
<b>3</b>	85,7%	96,2%	79,9%	88,5%
<b>4</b>	90,9%	91,4%	82,1%	83,9%
<b>5</b>	86,6%	88,0%	88,1%	82,7%
<b>6</b>	85,7%	92,1%	80,6%	88,3%
<b>7</b>		88,3%		83,9%
<b>8</b>				
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>87,53%</b>	<b>90,16%</b>	<b>84,44%</b>	<b>85,59%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,34%</b>	<b>5,62%</b>	<b>5,56%</b>	<b>2,25%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,96%</b>	<b>2,12%</b>	<b>2,27%</b>	<b>0,85%</b>

ANEXO Q – Porcentagem de fibras do tipo II no músculo plantar.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	6034,1	4325,8	4700,4	3657,7
<b>2</b>	9215,9	5361,0	5432,6	9145,5
<b>3</b>	9966,1	3949,1	5952,3	3570,2
<b>4</b>	8985,7	3361,1	4813,5	6202,0
<b>5</b>	5981,3	4579,0	5131,5	5114,6
<b>6</b>	5499,9	4508,6	5346,7	6366,5
<b>7</b>	4886,3			
<b>8</b>	5071,0			
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>6955,06</b>	<b>4347,42</b>	<b>5229,50</b>	<b>5676,05</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2071,74</b>	<b>669,18</b>	<b>456,09</b>	<b>2079,13</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>732,47</b>	<b>273,19</b>	<b>186,20</b>	<b>848,80</b>

ANEXO R – Área de secção transversa das fibras do tipo I do músculo sóleo, apresentada em  $\mu\text{m}^2$ .

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	5201,5	3406,3	3277,8	3316,2
<b>2</b>	8644,5	3463,4	8099,0	4777,3
<b>3</b>	7591,6	4320,6	2910,3	5533,7
<b>4</b>	8668,7	2750,8	5917,4	5895,4
<b>5</b>	4910,2	4976,6	3822,0	3421,3
<b>6</b>	4304,8	4933,7	6108,4	3157,8
<b>7</b>	4033,1			
<b>8</b>	4501,3			
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>5981,95</b>	<b>3975,22</b>	<b>5022,47</b>	<b>4350,27</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1980,59</b>	<b>908,36</b>	<b>2019,50</b>	<b>1210,35</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>700,25</b>	<b>370,84</b>	<b>824,46</b>	<b>494,13</b>

ANEXO S – Área de secção transversa das fibras do tipo II do músculo sóleo, apresentada em  $\mu\text{m}^2$ .

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	2186,7	2233,0	2363,6	2626,5
<b>2</b>	2258,4	2264,2	2543,3	2317,3
<b>3</b>	4658,4	1838,5*	2731,5	2420,1
<b>4</b>	2214,3	2306,8	2104,7	2548,8
<b>5</b>	3209,6	3922,8*	2435,3	2613,8
<b>6</b>	3879,7	2222,3	3005,1	2503,3
<b>7</b>		2136,8		3154,6*
<b>8</b>				
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>3067,87</b>	<b>2232,61</b>	<b>2530,59</b>	<b>2504,96</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1036,27</b>	<b>62,81</b>	<b>311,16</b>	<b>119,13</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>423,05</b>	<b>28,09</b>	<b>127,03</b>	<b>48,63</b>

ANEXO T – Área de secção transversa das fibras do tipo I do músculo plantar, apresentada em  $\mu\text{m}^2$ . \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	3680,0	3381,2	3673,1	3082,3
<b>2</b>	5069,0	2970,1	3285,1	3308,3
<b>3</b>	7780,0*	3653,9	4413,9*	2944,3
<b>4</b>	3862,3	3186,9	2697,4*	3739,7
<b>5</b>	3652,1	3894,3	3315,4	4757,2
<b>6</b>	4656,4	3402,1	3361,3	3171,4
<b>7</b>		2831,9		3936,0
<b>8</b>				
<b>9</b>				
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>4183,96</b>	<b>3331,47</b>	<b>3408,69</b>	<b>3562,74</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>641,65</b>	<b>371,76</b>	<b>179,00</b>	<b>636,20</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>286,95</b>	<b>140,51</b>	<b>89,50</b>	<b>240,46</b>

ANEXO U – Área de secção transversa das fibras do tipo II do músculo plantar, apresentada em  $\mu\text{m}^2$ . \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	41,0	33,3	45,8	48,8
<b>2</b>	48,9	34,9	44,7	50,0
<b>3</b>	53,8	35,4	64,1	43,6
<b>4</b>	63,6	39,4	60,6	46,8
<b>5</b>	51,4	41,0	54,3	66,7*
<b>6</b>	44,4	42,2	62,9	48,5
<b>7</b>	53,5	46,5	37,8	54,3
<b>8</b>	69,8*	46,7	43,9	48,6
<b>9</b>	53,5	48,8	53,8	44,4
<b>10</b>	51,2	51,1		48,9
<b>11</b>	50,0	51,3		48,9
<b>12</b>	43,2	57,1		
<b>13</b>	45,5			
<b>14</b>	54,5			
<b>15</b>	43,2			
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>49,85</b>	<b>43,98</b>	<b>51,99</b>	<b>48,27</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>6,05</b>	<b>7,49</b>	<b>9,40</b>	<b>2,96</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>1,62</b>	<b>2,16</b>	<b>3,13</b>	<b>0,94</b>

ANEXO V – Atividade máxima da enzima superóxido dismutase no músculo sóleo, apresentada em unidades/mg de proteínas citosólicas. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
1	25,0	24,1	28,6	15,2
2	25,6	27,8	21,3	45,4
3	27,7	21,9	36,7	34,4
4	25,5	17,0	27,7	16,1
5	15,1*	18,6	28,4	16,7
6	23,5	10,4	20,8	30,2
7	25,5	23,5	13,7	16,7
8	22,7	27,3	19,6	30,4
9	27,1	16,7	21,8	21,8
10	25,9	14,6		19,8
11	22,2	19,4		27,1
12	26,0	13,0		
13	36,5	29,6		
14	36,5	33,3		
15	20,2			
16	36,5			
17	36,6*			
18				
19				
20				
<b>MÉDIA</b>	<b>27,10</b>	<b>21,22</b>	<b>24,28</b>	<b>24,88</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>5,25</b>	<b>6,73</b>	<b>6,72</b>	<b>9,57</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>1,36</b>	<b>1,80</b>	<b>2,24</b>	<b>2,89</b>

ANEXO X – Atividade máxima da enzima superóxido dismutase no músculo plantar, apresentada em unidades/mg de proteínas citosólicas. \*=valor atípico (*outlier*).



<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	0,400	1,219	1,362	0,862
<b>2</b>	0,762	1,390	1,419	1,352
<b>3</b>	0,857	1,571	1,505	1,467
<b>4</b>	1,371	1,667	1,552	1,762
<b>5</b>	1,486	1,733	1,743	1,800
<b>6</b>	1,667	1,771	2,048	2,257
<b>7</b>	1,695	1,781	2,733	2,267
<b>8</b>	2,371	2,114	2,867	2,562
<b>9</b>	2,600	2,238		2,667
<b>10</b>	2,667	2,267		2,829
<b>11</b>	2,905	2,362		3,429
<b>12</b>	2,962	2,714		3,886
<b>13</b>	3,448	2,771		
<b>14</b>	4,019	3,124		
<b>15</b>	4,181	3,276		
<b>16</b>		3,371		
<b>17</b>		3,990		
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>2,226</b>	<b>2,315</b>	<b>1,904</b>	<b>2,262</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1,168</b>	<b>0,785</b>	<b>0,594</b>	<b>0,877</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,302</b>	<b>0,190</b>	<b>0,210</b>	<b>0,253</b>

ANEXO Z – Atividade máxima da enzima catalase no músculo sóleo, apresentada em  $\Delta\text{UA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteínas citosólicas}^{-1}$ .

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	0,458	0,462	0,040	0,871
<b>2</b>	0,613	0,138	0,133	0,413
<b>3</b>	0,200	0,302	0,138	0,187
<b>4</b>	0,276	0,102	0,111	0,298
<b>5</b>	0,689	0,809	1,049	0,098
<b>6</b>	0,227	0,440	0,284	0,924
<b>7</b>	0,964	0,640	0,667	0,093
<b>8</b>	0,236	0,511	0,760	0,116
<b>9</b>	0,084	0,133	0,382	0,067
<b>10</b>				0,636
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>0,416</b>	<b>0,393</b>	<b>0,396</b>	<b>0,370</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,287</b>	<b>0,245</b>	<b>0,352</b>	<b>0,329</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,096</b>	<b>0,082</b>	<b>0,117</b>	<b>0,104</b>

ANEXO AA – Atividade máxima da enzima catalase no músculo plantar, apresentada em  $\Delta\text{UA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteínas citosólicas}^{-1}$ .

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	21,79	25,56	22,94	20,84
<b>2</b>	24,47	29,37	28,21	22,54
<b>3</b>	15,09	30,10	19,64	28,35
<b>4</b>	17,50	26,47	15,03	20,70
<b>5</b>	22,34	25,65	25,67	25,61
<b>6</b>	36,16	21,00	18,92	23,38
<b>7</b>	24,29	19,70	26,68	34,70
<b>8</b>	23,89	3,06*	12,30	15,89
<b>9</b>	27,83	23,51		20,39
<b>10</b>		22,22		24,19
<b>11</b>				32,81
<b>12</b>				27,71
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>23,71</b>	<b>24,84</b>	<b>21,17</b>	<b>24,76</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>6,03</b>	<b>3,57</b>	<b>5,70</b>	<b>5,42</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>2,01</b>	<b>1,19</b>	<b>2,01</b>	<b>1,56</b>

ANEXO AB – Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no músculo sóleo, apresentado em nmol/mg de proteínas citosólicas. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	3,49*	1,35	1,47	1,91
<b>2</b>	0,77	0,88	0,44	1,68
<b>3</b>	1,84	2,59	1,87	2,67
<b>4</b>	1,21	0,99	2,23	0,80
<b>5</b>	0,74	2,20	2,28	0,56
<b>6</b>	1,84	3,94	2,00	1,97
<b>7</b>	0,64	1,29	2,53	0,73
<b>8</b>	0,56	8,28*	2,55	2,12
<b>9</b>	0,82	4,09		2,74
<b>10</b>		0,58		2,29
<b>11</b>				0,79
<b>12</b>				2,42
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>1,05</b>	<b>1,99</b>	<b>1,92</b>	<b>1,72</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,52</b>	<b>1,31</b>	<b>0,70</b>	<b>0,80</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,18</b>	<b>0,44</b>	<b>0,25</b>	<b>0,23</b>

ANEXO AC – Conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) no músculo sóleo, apresentado em nmol/mg de proteínas citosólicas. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	1,23	6,14	3,37	4,15
<b>2</b>	4,00	1,10	1,91	1,61
<b>3</b>	2,17	3,24	4,75	7,07
<b>4</b>	2,17	5,60	4,43	1,14
<b>5</b>	0,77	1,13	0,91	5,37
<b>6</b>	0,82	4,85	5,07	2,44
<b>7</b>	5,66	1,86	1,06	6,58
<b>8</b>	2,63	0,35	0,80	1,23
<b>9</b>	3,84	1,35	1,92	1,31
<b>10</b>	4,72	0,99		0,83
<b>11</b>	3,61	5,44		1,93
<b>12</b>	4,09	4,50		8,86
<b>13</b>	1,48	1,19		
<b>14</b>	0,67			
<b>15</b>	0,81			
<b>16</b>	4,50			
<b>17</b>	0,98			
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>2,60</b>	<b>2,90</b>	<b>2,69</b>	<b>3,54</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1,65</b>	<b>2,11</b>	<b>1,73</b>	<b>2,77</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,40</b>	<b>0,59</b>	<b>0,58</b>	<b>0,80</b>

ANEXO AD – Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no músculo plantar, apresentado em nmol/mg de proteínas citosólicas.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	4,30	2,94	2,99	2,07
<b>2</b>	2,83	4,95*	4,04	3,75
<b>3</b>	4,13	4,25	2,72	1,54
<b>4</b>	3,18	2,07	2,10	4,83
<b>5</b>	4,95	3,66	3,90	1,70
<b>6</b>	4,13	1,99	1,85	3,52
<b>7</b>	1,47	2,77	4,81	2,55
<b>8</b>	3,41	3,11	5,13	4,38
<b>9</b>	3,31	3,58	3,63	3,89
<b>10</b>	2,25	4,30		4,44
<b>11</b>	1,63	2,86		3,63
<b>12</b>	2,50	3,23		1,73
<b>13</b>	2,13	3,23		
<b>14</b>	3,83			
<b>15</b>	3,82			
<b>16</b>	0,68			
<b>17</b>	2,75			
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>3,02</b>	<b>3,17</b>	<b>3,46</b>	<b>3,17</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1,14</b>	<b>0,72</b>	<b>1,14</b>	<b>1,19</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,28</b>	<b>0,21</b>	<b>0,38</b>	<b>0,34</b>

ANEXO AE – Conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) no músculo plantar, apresentado em nmol/mg de proteínas citosólicas. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	11,2	16,9	14,1	17,1
<b>2</b>	11,8	16,5	10,8	17,3
<b>3</b>	13,2	14,3	7,3	13,4
<b>4</b>	9,5	20,9	6,1	13,7
<b>5</b>	10,2	6,3	16,8	10,7
<b>6</b>	12,2	14,9	9,4	11,9
<b>7</b>	5,9	19,2	21,1	10,2
<b>8</b>	10,5	20,1	12,4	11,7
<b>9</b>	10,9	9,5	14,6	6,2
<b>10</b>	10,3	11,3		13,7
<b>11</b>	13,0	12,1		15,0
<b>12</b>	9,3	12,4		15,3
<b>13</b>	11,0	15,8		
<b>14</b>	15,1			
<b>15</b>	15,6			
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>11,31</b>	<b>14,63</b>	<b>12,51</b>	<b>13,02</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,39</b>	<b>4,27</b>	<b>4,74</b>	<b>3,13</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,62</b>	<b>1,18</b>	<b>1,58</b>	<b>0,90</b>

ANEXO AF – Atividade máxima do complexo proteossomal 26S no músculo sóleo, apresentada em  $10^3 \cdot \Delta uF \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteínas citosólicas<sup>-1</sup>.

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	2,2	4,9	2,7	3,9
<b>2</b>	3,6	4,9	3,9	3,6
<b>3</b>	2,6	3,3	3,5	3,5
<b>4</b>	4,0	3,4	3,8	3,4
<b>5</b>	4,3	4,0	3,1	3,5
<b>6</b>	3,2	4,1	3,2	3,4
<b>7</b>	2,8	3,2	3,5	4,4
<b>8</b>	3,7	2,8	4,6	4,0
<b>9</b>	3,3	3,4	1,9*	3,9
<b>10</b>	3,5	4,7		3,4
<b>11</b>	4,2	4,4		
<b>12</b>	1,8	3,8		
<b>13</b>	3,7			
<b>14</b>	3,6			
<b>15</b>	3,2			
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>3,31</b>	<b>3,91</b>	<b>3,54</b>	<b>3,70</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,71</b>	<b>0,71</b>	<b>0,58</b>	<b>0,34</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>0,18</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,11</b>

ANEXO AG – Atividade máxima do complexo proteossomal 26S no músculo plantar, apresentada em  $10^3 \cdot \Delta uF \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteínas citosólicas<sup>-1</sup>. \*=valor atípico (*outlier*).



<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	74%	123%	56%	111%
<b>2</b>	82%	140%	93%	147%
<b>3</b>	160%	94%	89%	78%
<b>4</b>	100%	146%	95%	154%
<b>5</b>	98%	172%	163%	157%
<b>6</b>	120%	187%	91%	108%
<b>7</b>	140%	189%	171%	83%
<b>8</b>	63%	130%	129%	64%
<b>9</b>	64%	43%*	73%	86%
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>100,00%</b>	<b>147,46%</b>	<b>106,55%</b>	<b>109,66%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>34,00%</b>	<b>33,15%</b>	<b>39,31%</b>	<b>35,25%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>11,33%</b>	<b>11,72%</b>	<b>13,10%</b>	<b>11,75%</b>

ANEXO AH – Conteúdo de proteínas ubiquitinadas no músculo sóleo, apresentado em porcentagem (%) do grupo SHAM. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	119%	153%*	141%	132%
<b>2</b>	110%	106%	113%	91%
<b>3</b>	107%	97%	115%	109%
<b>4</b>	130%	106%	112%	122%
<b>5</b>	102%	111%	109%	70%
<b>6</b>	120%	94%	88%	74%
<b>7</b>	82%	85%	120%	81%
<b>8</b>	74%	88%	75%	59%
<b>9</b>	56%	55%*	65%	133%
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>100,00%</b>	<b>98,07%</b>	<b>104,22%</b>	<b>96,88%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>24,22%</b>	<b>9,97%</b>	<b>23,76%</b>	<b>28,00%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>8,07%</b>	<b>3,77%</b>	<b>7,92%</b>	<b>9,33%</b>

ANEXO AI – Conteúdo de proteínas ubiquitinadas no músculo plantar, apresentado em porcentagem (%) do grupo SHAM. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	90%	118%	109%	121%
<b>2</b>	104%	127%	130%	120%
<b>3</b>	95%	147%	67%	109%
<b>4</b>	106%	135%	98%	145%
<b>5</b>	121%*	134%	102%	170%
<b>6</b>	157%*	202%*	176%*	198%
<b>7</b>	98%	225%*	147%	77%
<b>8</b>	107%	91%	111%	109%
<b>9</b>	99%	111%	102%	122%
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>100,00%</b>	<b>123,14%</b>	<b>108,17%</b>	<b>130,25%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>6,16%</b>	<b>18,29%</b>	<b>23,41%</b>	<b>36,00%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>2,33%</b>	<b>6,91%</b>	<b>8,28%</b>	<b>12,00%</b>

ANEXO AJ – Conteúdo de proteínas oxidadas no músculo sóleo, apresentado em porcentagem (%) do grupo SHAM. \*=valor atípico (*outlier*).

<b>n</b>	<b>SHAM</b>	<b>INF-SED</b>	<b>INF-TC</b>	<b>INF-TI</b>
<b>1</b>	89%	112%	94%	112%
<b>2</b>	107%	94%	100%	119%
<b>3</b>	147%*	104%	137%*	119%
<b>4</b>	113%	104%	103%	105%
<b>5</b>	81%	108%	79%	77%
<b>6</b>	81%	72%	90%	76%
<b>7</b>	106%	90%	112%	129%
<b>8</b>	124%	97%	98%	130%
<b>9</b>	100%	142%*	136%*	145%
<b>10</b>				
<b>11</b>				
<b>12</b>				
<b>13</b>				
<b>14</b>				
<b>15</b>				
<b>16</b>				
<b>17</b>				
<b>18</b>				
<b>19</b>				
<b>20</b>				
<b>MÉDIA</b>	<b>100,00%</b>	<b>97,74%</b>	<b>96,70%</b>	<b>112,61%</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>15,31%</b>	<b>12,69%</b>	<b>10,56%</b>	<b>23,33%</b>
<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>5,41%</b>	<b>4,49%</b>	<b>3,99%</b>	<b>7,78%</b>

ANEXO AL – Conteúdo de proteínas oxidadas no músculo plantar, apresentado em porcentagem (%) do grupo SHAM. \*=valor atípico (*outlier*).