

JUDSON FONSECA QUINTÃO JÚNIOR

**INFLUÊNCIAS DA IDADE E DO SEXO SOBRE PARÂMETROS
CONTRÁTEIS E CINÉTICA DO CÁLCIO EM CARDIOMIÓCITOS
ISOLADOS DE RATOS ESPONTÂNEAMENTE HIPERTENSOS.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Q7i
2016

Quintão Junior, Judson Fonseca, 19-
Influências da idade e do sexo sobre parâmetros
contráteis e cinética do cálcio em cardiomiócitos isolados de
ratos espontaneamente hipertensos / Judson Fonseca
Quintão Junior. - Viçosa, MG, 2016.
xvi, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador : Clóvis Andrade Neves.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Hipertensão. 2. Idade. 3. Sexo. 4. Sistema
cardiovascular - Doenças. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.132

JUDSON FONSECA QUINTÃO JÚNIOR

**INFLUÊNCIAS DA IDADE E DO SEXO SOBRE PARÂMETROS
CONTRÁTEIS E CINÉTICA DO CÁLCIO EM CARDIOMIÓCITOS
ISOLADOS DE RATOS ESPONTÂNEAMENTE HIPERTENSOS.**

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

APROVADA: 28 de outubro de 2016.

Miguel Araujo Carneiro Júnior

Izabel Regina Santos Costa Maldonado

Thales Nicolau Prímola Gomes

André Talvani Pedrosa da Silva

Clóvis Andrade Neves
(Orientador)

À minha mãe, pelo exemplo de vida, amor e ensinamentos.

À Fabiana, Nanci, Marina, Larissa e Allan.

Ao amor da minha vida, minha esposa Natália.

Aos meus tios, primos e minha avó Judith.

À memória do meu pai, avós e tia Graça.

Aos meus queridos amigos do BIOEX.

Aos animais experimentais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meus caminhos e me dar saúde e força nos momentos difíceis para continuar lutando pelos meus ideais e objetivos.

À minha mãe Rosalina, minha irmã Fabiana, minha tia Nanci, minhas sobrinhas Marina e Larissa, meu cunhado Allan, minha esposa Natália, minha sogra Maria do Carmo, meus cunhados Hugo e Hudson pela amizade, cumplicidade, por todo amor incondicional. Vocês são a minha fonte de inspiração para seguir sempre em busca dos meus sonhos. Obrigado pelo apoio e doação incondicional. Todas as minhas conquistas são por vocês e para vocês. Amo todos vocês!

A todos os meus familiares, tios e primos, em especial minha avó “Caçuleta” pelas orações e pelo carinho comigo. Vocês são a melhor família do mundo.

Aos meus avós João Barbosa e Antônia, tios e primos, minha segunda família, obrigado pelo carinho e por estarem comigo sempre.

Ao professor e orientador Clovis Andrade Neves pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e paciência nas nossas reuniões, por me passar paz e confiança nos momentos de dúvidas e incertezas.

Ao professor e coorientador Antônio José Natali por ser um espelho de profissional para mim, pelos ensinamentos, competência, humildade e acima de tudo pela amizade.

Ao professor Thales Nicolau Prímola Gomes, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos grandes amigos / irmãos Miguel, Angelita e Lucas pela amizade verdadeira, pelos conselhos sempre pontuais, pelos desabafos, pelas gargalhadas e palhaçadas, pelos encontros semanais e momentos juntos, amamos vocês, vocês são da nossa família.

Aos grandes amigos Lucas, Victor, Aurora, Juliana e Filipe Drumond pelos momentos felizes, pela cumplicidade no trabalho, pelos conselhos, pelas brincadeiras que sempre descontraíam e pela boa vontade constante.

À UFV e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo apoio na minha formação profissional.

A todos os amigos do BIOEX e do programa de pós-graduação da Biologia Celular, pela boa convivência e bons momentos de trabalho.

À secretária da Pós-Graduação da Biologia, Beth, sempre apoiando e socorrendo os estudantes com muita gentileza e carinho.

Aos professores e funcionários do departamento de Biologia Geral da UFV pelos ensinamentos e boa convivência.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou a realização dos experimentos de microscopia confocal.

Ao professor José Geraldo Mill pela importante parceria.

Aos professores Izabel Maldonado e André Talvani pela honrosa participação na banca de defesa de tese.

Aos professores, funcionários e alunos da Escola Estadual Santa Rita de Cássia, Escola Municipal Juscelino Kubitschek e Escola Municipal Dr. José Teotônio Pacheco, onde leciono.

Aos grandes amigos e compadres Herbert Paixão, Leila e meu afilhado querido Pedro pela honra de ter vocês como amigos.

Aos amigos Leidinha, Conceição Telles, Aninha Marques e Eurico, pela amizade e carinho comigo e com meus familiares.

Aos grandes amigos da “República dos Patos” Serginho, Tiago, Mateus, dona Marta e Jerber Jr., e em especial, Marcelo e Danilo, por todos os anos de convivência aqui em Viçosa e em Rio Casca.

À CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma estiveram comigo nesta caminhada.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O modelo animal SHR (SpontaneouslyHypertensiveRat) e a progressão da hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	1
1.2- HAS e remodelamento cardíaco.....	2
1.3- Acoplamento excitação-contração (AEC) e o processo hipertensivo.....	4
1.4- Hipertensão arterial, idade e sexo: relação com o acoplamento excitação- contração (AEC).....	8
1.4.1- Envelhecimento e acoplamento excitação-contração (AEC).....	9
1.4.2- Diferenças entre os sexos e o AEC.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1- Animais de experimentação e tratamentos.....	15
3.2- Pressão arterial.....	15
3.3- Peso corporal, do coração e dos ventrículos.....	16
3.4- Isolamento dos cardiomiócitos.....	16
3.5- Análises morfológicas dos cardiomiócitos.....	18
3.6- Medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$	18
3.7- Medidas e análises das sparks espontâneas de $[Ca^{2+}]_i$	20
3.8- Contratilidade Celular.....	22
3.9- Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1- Características biométricas e parâmetros cardiovasculares.....	25

4.2-Dimensões dos cardiomiócitos.....	29
4.3- Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$	31
4.4- Medida das Sparks espontâneas de Ca^{2+}	38
4.5- Medida da contratilidade celular.....	44
4.6- Síntese dos principais resultados encontrados.....	48
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1- Efeitos da hipertensão e diferenças entre os sexos nos parâmetros biométricos e dimensão celular nos animais hipertensos jovens e idosos.....	50
5.2- Efeitos da hipertensão na sinalização intracelular de Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos dos animais hipertensos jovens e idosos.....	53
5.2.1- Sparks espontâneas de Ca^{2+}	56
5.3- Diferenças entre os sexos na sinalização intracelular de $[Ca^{2+}]_i$ e contratilidade dos cardiomiócitos dos animais SHR jovens e idosos.....	58
5.3.1- Diferenças entre os sexos e Sparks espontâneas de Ca^{2+}	61
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -MCP	- β -Miosina de cadeia pesada
AEC	- Acoplamento excitação-contração
ANOVA	- Análise de variância
AMP	- Adenosina monofosfato
ATP	- Trifosfato de Adenosina
ATPase	- Enzimas que catalisam a hidrólise do ATP (adenosina trifosfato) para produção de energia
Ca^{2+}	- Cálcio
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$	- Concentração de Ca^{2+} no RS
CaMKII	- Proteína cinase II dependente da via Ca^{2+} /calmodulina
c.c.r.	- Comprimento celular de repouzo
CEUA	- Comissão de Ética para Uso de Animais
CASQ2	- Calsequestrina
DCV	- Doenças Cardiovasculares
DHPR	- Receptores de diidropiridina
DMSO	- Dimetil-sulfóxido
EGTA	- Ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid
F	- Fluorescência máxima
F_0	- Fluorescência mínima
FK506	- Proteína de ligação a Tacrolimo
FKBP12.6	- FK506 bindingprotein, 12.6
Fluo-4 AM	- Fluo-4 acetoximetil-ester
FLB	- Fosfolambam
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
H8M	- Grupo hipertenso com 8 meses de idade macho

H8F	- Grupo hipertenso com 8 meses de idade fêmea
H17M	- Grupo hipertenso com 17 meses de idade macho
H17F	- Grupo hipertenso com 17 meses de idade fêmea
HEPES	- Ácido etanosulfônico-hidroxietyl piperazina
I_{CaL}	- Corrente de entrada de Ca^{2+} (pelo canal do tipo L)
I_{Tl}	- Corrente transitória de influxo
I_{to}	- Corrente repolarizante transitória de efluxo de K_+
I_{K+}	- Corrente de potássio
mAKAP	- Proteína cinase A de ancoragem
NCX	- Canais trocadores de sódio-cálcio
N8M	- Grupo normotenso com 8 meses de idade macho
N8F	- Grupo normotenso com 8 meses de idade fêmea
N17M	- Grupo normotenso com 17 meses de idade macho
N17F	- Grupo normotenso com 17 meses de idade fêmea
O_2	- Oxigênio
PAS	- Pressão arterial sistólica
PAD	- Pressão arterial diastólica
PAM	- Pressão arterial média
PDE	- fosfodiesterase
PDE4B	- isoforma da fosfodiesterase
PA	- Potencial de ação cardíaco
PKA	- Proteína cinase A
PP1	- Proteína fosfatase 1
PP2A	- Proteína fosfatase 2A
pH	- Potencial hidrogeniônico
RE- α	- Receptor de estrógeno do tipo alfa
RE- β	- Receptor de estrógeno do tipo beta

RyR	- Receptor de rianodina
RyR2	- Receptor de rianodina do tipo 2
RS	- Retículo sarcoplasmático
SERCA2a	- Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
Ser ²⁸⁰⁸	- Resíduo de serina 2808
Ser ²⁸¹⁴	- Resíduo de serina 2814
SHR	- Spontaneously Hypertensive Rat
SHHF	-Spontaneously Hypertensive Heart Failure
Túbulos-T	- Túbulos transversos
VE	- Ventrículo esquerdo
VD	- Ventrículo direito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens de microscopia confocal. (A) Cardiomiócito, incubado com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo 4 AM). A linha de varredura está representada em azul e foi posicionada no eixo longitudinal da célula, fora da região do núcleo. (B) Figura representativa das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. (C) Traços típicos do resultado da análise da imagem do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados.....20

Figura 2: Representação do programa utilizado (Ionwizard, Ionoptix, EUA) para aquisição dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente.....23

Figura 3: Traços representativos de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz e os parâmetros avaliados.....24

Figura 4: Dimensões dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos controle (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A e B) comprimento celular (μm); (C e D) largura celular (μm); (E e F) volume celular (mm^3). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito.....30

Figura 5: Registros típicos das imagens de fluorescência e os traçados gerados para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como a taxa de intensidade de fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica. VE= ventrículo esquerdo.....33

Figura 6: Registros típicos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como a taxa de intensidade de

fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica. VD= ventrículo direito.....34

Figura 7: Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos controle (barras claras) e hipertensos (barras escuras). (A e B) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (F/F_0); (C e D) Tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (ms); (E e F) Tempo para 50% do Decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito.....35

Figura 8: Registros típicos das imagens de fluorescência e as figuras representativas das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM. Setas amarelas indicam a ocorrência de sparks espontâneas de Ca^{2+} . VE= ventrículo esquerdo.....40

Figura 9: Registros típicos das imagens de fluorescência e as figuras representativas das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos isolados do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM. Setas amarelas indicam a ocorrência de sparks espontâneas de Ca^{2+} . VD= ventrículo direito.....41

Figura 10: Medida das sparks espontâneas de Ca^{2+} dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos controle (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A e B) Frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} (sparks $\times 100\mu m^{-1} \times s^{-1}$); (C e D) Amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito.....42

Figura 11: Medida da contratilidade celular dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos controle (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A e B) Amplitude de contração (%c.c.r.); (C e D) Tempo para o pico de contração (ms); (E e F) Tempo para 50% do relaxamento (ms). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal, peso do coração, peso dos ventrículos, peso do VE e peso do VD.....	25
Tabela 2: Peso relativo do coração, peso relativo dos ventrículos, peso relativo do VE e peso relativo do VD.....	26
Tabela 3: Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).....	28
Tabela 4: Número de células e de sparks espontâneas de Ca^{2+}	39
Tabela 5: Síntese dos principais resultados encontrados.....	49

RESUMO

QUINTÃO-JÚNIOR, Judson Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Influências da idade e do sexo sobre parâmetros contráteis e cinética do cálcio em cardiomiócitos isolados de ratos espontaneamente hipertensos.** Orientador: Clóvis Andrade Neves. Coorientador: Antônio José Natali.

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para doença cardiovascular e um precursor da insuficiência cardíaca produzindo grande preocupação para as autoridades de saúde pública. Atualmente, a hipertensão atinge proporções epidêmicas entre os idosos e os efeitos desta doença são maiores em homens do que em mulheres. Há evidências que tanto a hipertensão quanto a senescência são fatores que promovem hipertrofia cardíaca, alterações na homeostase intracelular do Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos levando à disfunção sistólica e diastólica em ratos hipertensos. Todavia, não há informações claras sobre as diferenças entre os sexos na sinalização intracelular de Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos de ratos hipertensos jovens e idosos. Este estudo teve como objetivo investigar as mudanças referentes à idade e as diferenças existente entre os sexos sobre os parâmetros contráteis e sinalização intracelular de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados dos ventrículos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Ratos SHR e ratos Wistar normotensos com 8 e 17 meses de idade foram separados aleatoriamente em 8 grupos: grupos normotensos controle com 8 e 17 meses macho (N8M e N17M, n=5); grupos normotensos controle com 8 e 17 meses fêmea (N8F e N17F, n=5); grupos hipertensos com 8 e 17 meses macho (H8M e H17M, n=5); grupos hipertensos com 8 e 17 meses fêmea (H8F e H17F, n=5). Após a eutanásia, os cardiomiócitos ventriculares foram isolados por dispersão enzimática. Para a determinação do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e das sparks espontâneas de Ca^{2+} , os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4 acetoximetil-ester (Fluo-4 AM) e colocados dentro de uma câmara experimental montada em um microscópio confocal. A contratilidade celular foi determinada através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, usando-se um sistema de detecção de bordas, com o auxílio de um microscópio invertido. Para as análises do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e contratilidade celular, utilizou-se a estimulação elétrica de campo (30V; 1Hz; em temperatura ambiente $\sim 25^\circ\text{C}$). Os registros das sparks espontâneas de Ca^{2+} foram realizados com as células quiescentes e a partir daí obteve-se 10 imagens por célula. Os resultados do presente estudo mostraram que a hipertensão arterial reduziu a amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a contratilidade celular nos cardiomiócitos

ventriculares dos ratos hipertensos de 8 meses de idade em ambos os sexos. Em contraste, a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a contratilidade celular foram maiores nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos de 17 meses de idade em ambos os sexos. Estes aumentos foram maiores nas fêmeas hipertensas. A hipertensão arterial aumentou a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos ratos hipertensos em todas as idades estudadas. Contudo, a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} foi menor nos cardiomiócitos dos ratos idosos comparado aos mais jovens. A amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} foi menor nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos de 8 meses e nas fêmeas hipertensas de 17 meses. Todavia, os efeitos da hipertensão sobre as sparks espontâneas de Ca^{2+} estavam menos proeminentes nas fêmeas hipertensas em comparação aos machos, independentemente da idade. Além disso, a hipertensão prolongou o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e o tempo para o pico de contração nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos de 8 meses. Este efeito foi menos proeminente nas fêmeas hipertensas. A hipertensão prolongou o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no ventrículo esquerdo das fêmeas hipertensas de 17 meses e no ventrículo direito dos ratos hipertensos de 17 meses. Não houve diferença entre os sexos para este parâmetro nos ratos hipertensos idosos. A hipertensão reduziu o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos de 8 meses. Não houve diferença entre os sexos para este parâmetro nestes animais. Entretanto, o tempo para o relaxamento celular foi menor nas fêmeas hipertensas de 8 meses em comparação aos machos da mesma idade. Não houve diferenças entre os sexos para este parâmetro nos ratos hipertensos idosos. Em conclusão, os cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos apresentaram alterações deletérias na sinalização intracelular de $[Ca^{2+}]_i$ e contratilidade celular em todas as idades estudadas. Algumas destas alterações estavam menos proeminentes nos cardiomiócitos das fêmeas hipertensas em comparação aos machos.

ABSTRACT

QUINTÃO-JÚNIOR, Judson Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Influences of age and sex on contractile parameters and calcium kinetics in cardiomyocytes isolated from spontaneously hypertensive rats.** Advisor: Clóvis Andrade Neves. Co-advisor: Antonio José Natali.

Hypertension is a major risk factor for cardiovascular disease and a precursor of heart failure producing major concern for public health authorities. Currently, hypertension reaches epidemic proportions among the elderly and the effects of this disease is greater in men than in women. There is evidence that both hypertension and senescence are factors that promote cardiac hypertrophy, changes in intracellular Ca^{2+} homeostasis, and contractility of cardiomyocytes leading to systolic and diastolic dysfunction in hypertensive rats. However, there is no clear information about the differences between the sexes in intracellular Ca^{2+} signaling and contractility of cardiomyocytes hypertensive rats young and old. The objective of the present study was to investigate changes in age and differences between the sexes in contractile parameters and intracellular Ca^{2+} signaling in cardiomyocytes isolated from the ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR and normotensive Wistar rats with 8 and 17 months of age were randomly divided into 8 groups: normotensive control groups with 8 and 17 months male (N8M and N17M, n = 5); normotensive control groups with 8 and 17 months female (N8F and N17F, n = 5); hypertensive groups with 8 and 17 months male (H8M and H17M, n = 5); Hypertensive groups with 8 and 17 months female (H8F and H17F, n = 5). After euthanasia, ventricular cardiomyocytes were isolated by enzymatic dispersion. To determine the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and spontaneously Ca^{2+} sparks, isolated cardiomyocytes were incubated with the Ca^{2+} fluorescent indicator Fluo-4 acetoxymethyl ester (Fluo-4 AM) and placed inside an experimental chamber mounted on a confocal microscope. Cellular contractility was determined by the technique of altering the length of the cardiomyocytes using an edge detection system with the aid of an inverted microscope. For analyzes of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and cell contractility, we used field electrical stimulation (30V, 1Hz, at room temperature ~ 25°C). The records of spontaneously Ca^{2+} sparks were carried out with quiescent cells, thereafter was obtained 10 images per cell. The results of this study showed that and cell contractility in ventricular cardiomyocytes of hypertensive rats of 8 months of age in both sexes. In contrast, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and cell contractility were greater in ventricular cardiomyocytes of hypertensive rats of 17 months of age in both sexes.

These increases were higher in hypertensive females. Hypertension increased the spontaneously Ca^{2+} sparks frequency in hypertensive rats at all ages studied. However, the spontaneously Ca^{2+} sparks frequency was smaller in cardiomyocytes of aged rats compared to young rats. The spontaneously Ca^{2+} sparks amplitude was smaller in ventricular cardiomyocytes of hypertensive rats of 8 months and in hypertensive females of 17 months. However, the effects of hypertension on the spontaneously Ca^{2+} sparks were less prominent in hypertensive females compared to males, regardless of age. Furthermore, hypertension increased the time to the peak of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and the time to peak contraction of the ventricular cardiomyocytes in hypertensive rats of 8 months. This effect was less prominent in the female hypertensive rat. Hypertension increased the time to the peak of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in the left ventricle of hypertensive female rat of 17 months and right ventricle of hypertensive rats of 17 months. There was no difference between sexes for this parameter in the elderly hypertensive rats. Hypertension reduced the time to 50% decay of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ventricular cardiomyocytes of hypertensive rat of 8 months. There was no difference between the sexes for this parameter in these animals. However, the relaxation time for the cell was smaller in hypertensive females of 8 months compared to males of the same age. There were no differences between sexes for this parameter in the elderly hypertensive rats. In conclusion, ventricular cardiomyocytes of the hypertensive rats showed deleterious changes in the intracellular signaling of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and cell contractility at all ages studied. Some of these changes were less prominent in cardiomyocytes of hypertensive females compared to males.

1- INTRODUÇÃO

As taxas de prevalência indicam que cerca de 30% dos adultos, mais de 60% dos idosos além de considerável número de crianças e adolescentes apresentam hipertensão arterial sistêmica (HAS) no Brasil (Andrade et al., 2015; SBC, 2016). A HAS é o fator de risco mais importante para doenças cardiovasculares (DCV) contribuindo para 50% das mortes por estas doenças. As DCV ainda são responsáveis por alta frequência de internações com altos custos socioeconômicos (SBC, 2016).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que a expectativa de vida dos brasileiros atingiu 74,08 anos em 2011. Doenças crônicas como a HAS e a aterosclerose que levam à insuficiência cardíaca crônica, atingem proporções epidêmicas entre os idosos (Janczewski e Lakatta, 2010). Além disso, estudos indicam que complicações oriundas do processo hipertensivo em geral são maiores em homens do que em mulheres (Noblat et al., 2004; Du et al., 2006). Uma característica que ajuda a explicar o melhor prognóstico nas mulheres em comparação com os homens é o fato de as mulheres apresentarem um menor grau de hipertrofia cardíaca em resposta a complicações cardiovasculares (Du et al., 2006; Podesser et al., 2007). No entanto, apesar dos relatos na literatura apontarem para diferenças relacionadas à idade e ao sexo na função cardíaca em humanos e em modelos animais de hipertensão, os mecanismos que explicam tais mudanças não estão totalmente esclarecidos.

1.1- O modelo animal SHR (Spontaneously Hipertensive Rat) e a progressão da hipertensão arterial sistêmica (HAS).

O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é um dos modelos de hipertensão arterial mais utilizado nos estudos sobre a fisiopatologia cardíaca induzida pela HAS. O modelo SHR foi desenvolvido por Okamoto e Aoki no ano de 1963 e consiste no cruzamento entre ratos Wistar com hipertensão espontânea detectada e pelo cruzamento entre suas proles (irmãos x irmãs) durante várias gerações, resultando em 100% dos descendentes manifestando a doença hipertensiva (Okamoto e Aoki, 1963).

Esse modelo apresenta vantagens com relação a outros modelos de hipertensão pela similaridade com as fases de progressão da hipertensão humana tendo fases de pré-hipertensão, de desenvolvimento e hipertensão sustentada por vários meses (Doggrell e Brown, 1998). Os critérios determinantes para diagnóstico da hipertensão arterial no

SHR são: pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 150 mmHg por um período superior a um mês sem intervenção externa, seja fisiológica ou cirúrgica (Doggrell e Brown, 1998; Pinto et al., 1998).

A hipertensão arterial no SHR começa a se estabelecer por volta do 3º mês de idade. No estágio inicial da hipertensão, fase de pré-hipertensão do 3º ao 4º mês, o rato SHR apresenta aumento no débito cardíaco com resistência periférica normal (Doggrell e Brown, 1998). Com a progressão da doença para estágios mais estáveis, por volta do 4º ao 6º mês de idade, observa-se a fase ativa da hipertensão que tem como característica o início do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Nesta fase, observa-se melhora da função contrátil, provavelmente como uma resposta protetora à sobrecarga de pressão. Posteriormente, por volta do 6º ao 7º mês observa-se a fase de hipertensão estabelecida e equilibrada. Nesta fase, nota-se que o débito cardíaco retorna ao normal e a hipertrofia dos vasos sanguíneos aumenta a resistência periférica total, progredindo para hipertrofia ventricular esquerda (Boluyt et al., 1994; Bing et al., 1995; Bell et al., 2004). Após essa fase, em torno do 18º ao 24º mês de idade, se observa o início da fase de insuficiência cardíaca (Bing et al., 1995).

1.2- HAS e remodelamento cardíaco.

O remodelamento cardíaco é a resposta adaptativa a diversos estímulos, tais como: a sobrecarga de pressão e de volume, ativação neuro-hormonal, processo inflamatório e outros agentes físicos e biológicos (Anversa et al., 1975; Weber, 2001; Matsubara et al., 2006; McMullen e Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010). Sob essas circunstâncias, o músculo cardíaco trabalha de forma mais intensa do que em condições normais, provocando um aumento no volume dos cardiomiócitos para compensar o aumento da sobrecarga de pressão na parede ventricular (Colan, 1997; McMullen e Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010). Esse aumento ocorre em resposta a condições patológicas, tais como a hipertensão arterial ou infarto do miocárdio, ou como resposta fisiológica, incluindo o crescimento normal após o nascimento, a gravidez e o treinamento físico, realizado de maneira crônica por atletas (Colan, 1997; Iemitsu et al., 2001; Weeks e McMullen, 2011). Contudo, na hipertrofia patológica, observa-se a perda de cardiomiócitos (por necrose ou apoptose), o aumento dos elementos intersticiais que levarão à formação de fibrose, disfunções no ciclo intracelular do Ca^{2+} gerando alterações deletérias no acoplamento excitação-contração cardíaco (AEC) e aumento do

risco de morte (Bers, 2002; McMullen e Jennings, 2007; Kemi et al., 2008; Chan et al., 2011).

Durante o desenvolvimento da HAS, alterações morfológicas e funcionais ocorrem nos ventrículos de acordo com o tipo e o tempo da instalação do processo hipertensivo. A sobrecarga crônica de pressão promovida pela HAS no músculo cardíaco provoca o aumento do estresse sobre a parede ventricular esquerda. Essa sobrecarga de pressão gera o aumento na espessura do ventrículo esquerdo (VE) (aumento da largura dos cardiomiócitos com a formação de novos sarcômeros) e redução na câmara cardíaca e no volume diastólico final, caracterizando a hipertrofia ventricular do tipo concêntrica (Pawlush et al., 1993; McMullen e Jennings, 2007). Com a progressão do processo hipertensivo, observa-se também aumentos desproporcionais na matriz extracelular de colágeno, levando à diminuição da complacência ventricular. Com isso, há um desequilíbrio na função cardíaca, progredindo para insuficiência cardíaca (McMullen e Jennings, 2007).

A morfologia e função ventricular foram amplamente estudadas em modelos animais e em seres humanos, sendo que, na maioria destes estudos a atenção estava voltada à fisiologia do VE. Apenas nas últimas duas décadas houve um interesse pelos estudos no ventrículo direito (VD). A avaliação da função do VD tornou-se importante no prognóstico e tratamento de doenças como a hipertensão pulmonar, cardiomiopatias, insuficiência cardíaca congestiva e infarto agudo do miocárdio (Ghio et al., 2001; Zornoff et al., 2002; Vitarelli e Terzano, 2010). A fisiologia do VD está relacionada com a baixa impedância hidráulica que é característica do leito vascular pulmonar. Em comparação com a circulação sistêmica, a circulação pulmonar tem a resistência vascular menor com maior distensibilidade arterial. Em condições normais, as pressões exercidas no VD são menores do que as pressões exercidas no VE e o tempo de contração isovolumétrico são mais curtos (Vitarelli e Terzano, 2010).

Em condições patológicas, o VD tem melhor tolerância à sobrecarga de volume do que a sobrecarga de pressão, portanto, pode permanecer bem adaptado às lesões valvulares por longos períodos de tempo. Em contraste, na sobrecarga de pressão como o ocorrido na HAS e hipertensão pulmonar, a resposta adaptativa a esta sobrecarga é a hipertrofia ventricular direita, seguida da dilatação do VD podendo levar à insuficiência ventricular (Vitarelli e Terzano, 2010). O aumento da sobrecarga de pressão e a presença da hipertrofia do VD também podem provocar disfunções diastólicas no VE, dado a interdependência entre os dois ventrículos (Voelkel et al., 2006; Haddad et al.,

2008). A interdependência morfológica e funcional entre os dois ventrículos poderia ser explicada por três mecanismos: 1) aumento da pressão diastólica final do VD em resposta ao aumento do volume do VE; 2) transmissão mecânica da tensão sofrida pelo VE ao VD através das fibras musculares comuns aos dois ventrículos; 3) fatores humorais como as catecolaminas, que poderiam mediar a hipertrofia dos ventrículos como resposta à sobrecarga pressórica de um dos dois ventrículos (Gottdiener et al., 1985).

Neste contexto, com o objetivo de determinar os efeitos da hipertensão arterial no remodelamento ventricular, Amanuma e colaboradores (1994) realizaram biópsia endomiocárdica biventricular em um grupo de pacientes com hipertensão arterial essencial, divididos segundo o grau de hipertensão, como: leve, moderada ou severa. Os resultados deste estudo mostraram um aumento da largura dos cardiomiócitos tanto no VD quanto no VE, à medida que o grau de hipertensão aumentava. O mesmo comportamento observou-se em relação à fibrose intersticial, que aumentou de acordo com o grau de severidade da hipertensão. Observou-se ainda, que a hipertrofia dos cardiomiócitos e o aumento da fibrose intersticial nos ventrículos progredem de maneira proporcional às alterações do eletrocardiograma realizado nos pacientes (Amanuma et al., 1994).

Não há registros na literatura a respeito dos efeitos da HAS na remodelação do VD e nem nos mecanismos de acoplamento excitação-contração (AEC) dos cardiomiócitos do VD de ratos SHR. Contudo, dados do nosso grupo de estudos (não publicados), indicaram que a HAS nos ratos SHR de 6 meses de idade leva a hipertrofia do tipo excêntrica (aumento do comprimento dos cardiomiócitos) no VD destes animais, além do prolongamento no tempo para o pico do transiente intracelular global de Ca^{2+} (transiente de $[Ca^{2+}]_i$).

1.3- Acoplamento excitação-contração (AEC) e o processo hipertensivo.

O acoplamento excitação-contração (AEC) é o processo que envolve desde a excitação elétrica dos cardiomiócitos até a contração, sendo o cálcio (Ca^{2+}) fundamental neste processo.

No AEC, com a despolarização do sarcolema após o potencial de ação cardíaco (PA), acontece o influxo de Ca^{2+} para o interior do cardiomiócito (Fabiato, 1983). Esse

influxo ocorre em função da abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L dependentes de voltagem, sendo estes chamados de receptores de dihidropiridina (DHPR). Nos ratos, os DHPR são os principais locais de entrada de Ca^{2+} em cardiomiócitos (Bers, 2002). Estes canais são localizados principalmente nos túbulos transversos (túbulos-T) da membrana plasmática, voltados para o retículo sarcoplasmático (RS) (Scriven et al., 2000). O influxo de Ca^{2+} nestes canais gera uma corrente de entrada de Ca^{2+} (I_{CaL}), provocando um aumento do Ca^{2+} no citosol que será responsável pela liberação de mais Ca^{2+} pelo RS. A liberação de Ca^{2+} pelo RS acontece pela abertura de canais chamados de receptores de rianodina (RyR) (Cannell e Kong, 2012). O espaço existente entre a membrana plasmática e a membrana do RS é denominado subespaço. Esse arranjo estrutural favorece a formação de microdomínios de Ca^{2+} facilitando, desta forma, a ligação localizada do Ca^{2+} aos receptores alvos (Berridge, 2006; Cheng e Lederer, 2008). A organização espacial do Ca^{2+} em microdomínios é uma forma de aumentar a versatilidade do sistema de sinalização celular, permitindo a regulação de diferentes processos dentro de regiões específicas da célula (Berridge, 2006). O subespaço também é visto na membrana do RS e nesse local é encontrada a unidade liberadora de Ca^{2+} , os RyR, representada pelos canais do tipo 2 (RyR2) nas células cardíacas. A estrutura formada pelos canais do tipo L, o subespaço e os RyR2 formam o complexo estrutural e funcional do AEC chamado de couplon (Franzini-Armstrong et al., 1999).

A entrada do Ca^{2+} pelos canais do tipo L faz aumentar a concentração de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no subespaço. Quando a concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ atinge o limiar de 10^{-8} e 10^{-7} M, ativa os RyR2 para liberar o Ca^{2+} do RS, sendo que a ativação máxima ocorre entre 10^{-6} e 10^{-5} M (Meissner, 2002). Esse processo é conhecido como liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato e Fabiato, 1978; Fabiato, 1983). Em um couplon existem cerca de 10-25 DHPR / 100 RyR2, sendo que aproximadamente 6-20 RyR2 são abertos em cada couplon (Bers, 2002; 2008). A ativação dos RyR2 provoca aumentos transitórios na concentração citoplasmática de Ca^{2+} , variando desde eventos mais discretos como as sparks de Ca^{2+} , até eventos menos discretos como o transiente intracelular de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A entrada de Ca^{2+} nos cardiomiócitos pela abertura dos canais do tipo L, combinado com a liberação de Ca^{2+} pelos RyR2 durante o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, favorecerá a ligação do Ca^{2+} à troponina C, ativando os filamentos contráteis e provocando a contração celular (Bers, 2002; Cheng e Lederer, 2008).

No momento da diástole cardíaca ocorre a dissociação do Ca^{2+} dos sítios de ligação com a troponina C e a remoção do Ca^{2+} do sarcoplasma, promovendo o

relaxamento celular. O processo de remoção do Ca^{2+} envolve quatro mecanismos: 1) captação do Ca^{2+} para o RS através da isoforma cardíaca da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a); 2) remoção do Ca^{2+} do sarcoplasma para fora da célula via Ca^{2+} ATPase do sarcolema; 3) remoção do Ca^{2+} para fora da célula via canais trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e 4) captação do Ca^{2+} pelas mitocôndrias (Bers, 2002). Em cardiomiócitos de ratos, o mecanismo mais importante para remoção do Ca^{2+} do sarcoplasma é a captação do Ca^{2+} através da SERCA2a, correspondendo por aproximadamente 92% da captação total (Bassani et al., 1994). Apenas 5-8% são removidos para fora da célula através da ATPase do sarcolema e do NCX (Bers, 2008). Em cardiomiócitos de coelho, cães, gatos e no ventrículo de humanos esta relação é de aproximadamente 70% pela SERCA2a e de 25-28% pela ATPase do sarcolema e NCX (Bers, 2008). Na insuficiência cardíaca esse balanço pode modificar-se para aproximadamente 50-50%, sendo observada uma perda na atividade da SERCA2a e um aumento da extrusão de Ca^{2+} via NCX (Pogwizd et al., 2001; Piacentino et al., 2003).

Com relação à SERCA2a, sua atividade é regulada principalmente pelo seu inibidor endógeno, afosfolamban (FLB). Quando a FLB é fosforilada, ela é liberada da SERCA2a, cessando assim a inibição e, conseqüentemente, aumentando a atividade de ATPase e captação do Ca^{2+} para o RS (Bers, 2002). O mecanismo de regulação via FLB envolve a fosforilação do resíduo de serina 16 (Ser-16) pela proteína quinase A (PKA), por uma via dependente de monofosfato de adenosina (AMP) cíclico e a fosforilação de um resíduo de treonina (Thr-17) pela proteína quinase II ativada pela via da Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) (Kirchberger et al., 1974; Mattiazzi et al., 2005).

Também na fase diastólica do AEC é possível encontrar eventos de liberação espontânea de Ca^{2+} . Estes eventos de liberação espontânea de Ca^{2+} são chamados “sparks espontâneas de Ca^{2+} ”. As sparks espontâneas de Ca^{2+} são liberações espontâneas provenientes da abertura dos RyR2 quando a célula está relaxada. As sparks foram descritas pela primeira vez por Cheng et al. (1993), e são definidas como eventos elementares de liberação de Ca^{2+} em uma única unidade liberadora. A unidade liberadora de Ca^{2+} é formada pelo conjunto de RyR2 no RS. (Cheng et al., 1993; Guatimosim et al., 2002; Cheng e Lederer, 2008). As sparks de Ca^{2+} podem ser medidas por meio de corantes fluorescentes sensíveis ao Ca^{2+} e observadas em microscópio confocal de varredura a laser, produzindo imagens contendo informações espaciais em uma dimensão temporal, onde o Ca^{2+} citosólico livre é representado por diferentes intensidades de pixel (Picht et al., 2007). Uma spark espontânea ocupa a área de

aproximadamente 2,0 μm de diâmetro (Cheng e Lederer, 2008). Em alta concentração de Ca^{2+} exógeno, os eventos locais de Ca^{2+} correspondentes a uma spark são chamados picos de Ca^{2+} , que se estendem por 0,6 μm num tempo de duração de aproximadamente 8 ms (Cheng e Lederer, 2008). Os picos de Ca^{2+} são utilizados para visualizar o fluxo de liberação de Ca^{2+} durante as sparks espontâneas de Ca^{2+} em células do músculo cardíaco (Cheng et al., 1999). Para que ocorram as sparks espontâneas de Ca^{2+} não é necessária a entrada de Ca^{2+} no miócito através dos canais de Ca^{2+} do tipo L ou por outras vias através da membrana plasmática. Alguns estudos mostram que no potencial de repouso de -80 mV, mesmo com a retirada total do Ca^{2+} extracelular ainda assim são encontradas sparks espontâneas de Ca^{2+} (Cheng et al., 1993; Cannell et al., 1994). A abertura dos RyR2 para ocorrerem estes eventos espontâneos dependem da concentração de Ca^{2+} no citosol e da concentração de Ca^{2+} no lúmen do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$). No que se refere à $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, alguns estudos apontam um papel crítico do conteúdo de Ca^{2+} no RS na regulação dos RyR2 e na sinalização do Ca^{2+} no AEC. A queda da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ promove o fechamento dos RyR2, provocando o encerramento das sparks espontâneas de Ca^{2+} . Em contrapartida, um aumento excessivo na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ promove um aumento na sensibilidade dos RyR2, aumentando a frequência de sparks espontâneas (Cheng et al., 1996; Santana et al., 1997; Gyorke e Gyorke, 1998). Estudos usando estimuladores e inibidores dos RyR2 como a cafeína e tetracaína, mostraram que o aumento da frequência das sparks de Ca^{2+} leva a um aumento no efluxo de Ca^{2+} do RS, ocasionando o esgotamento do Ca^{2+} no RS e, como resultado, uma redução na frequência de sparks. Outros estudos apontam que o aumento na frequência de sparks espontâneas de Ca^{2+} proveniente do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ está associado ao aparecimento de ondas de Ca^{2+} , sendo que esta sobrecarga de Ca^{2+} no RS pode se relacionar a problemas cardíacos, como arritmias (Cheng et al., 1993; Cheng et al., 1996).

Algumas doenças, como a HAS, podem alterar os mecanismos envolvidos no processo de AEC (Bers, 2002; Kemi et al., 2008). O estresse imposto pela HAS crônica causa adaptações patológicas no músculo cardíaco, principalmente no VE. Essas adaptações são uma resposta do músculo cardíaco saudável à sobrecarga de trabalho e estão associadas com o aparecimento de disfunções na sinalização do Ca^{2+} , como a redução na atividade e expressão da SERCA2a (Dash et al., 2001; Bers, 2002), o aumento na expressão e atividade dos NCX, (Sipido et al., 2002; Xiong et al., 2005), o prolongamento no potencial de ação cardíaco (PA) (Kaab et al., 1998; Wickenden et al.,

1999; Lacombe et al., 2007), o aumento na distância entre o RS e os túbulos-T (Song et al., 2006) e o aumento da frequência de liberação das sparks espontâneas de Ca^{2+} do RS (Marks et al., 2002).

1.4- Hipertensão arterial, idade e sexo: relação com o acoplamento excitação- contração (AEC).

A HAS provoca alterações no funcionamento cardíaco, sendo que anormalidades elétricas e mecânicas já foram relatadas em cardiomiócitos ventriculares de ratos SHR (Boluyt et al., 1995; Shorofsky et al., 1999; Roman-Campos et al., 2012). Entretanto, até onde vai nosso conhecimento, a relação dessas anormalidades com o sexo não foram ainda pesquisadas.

Nos estágios iniciais da HAS (por volta do 4º ao 6º mês de idade em SHR) observa-se um aumento da amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e um aumento da contratilidade celular para compensar o aumento da sobrecarga de pressão e manter o débito cardíaco. Esse processo ocorre principalmente em função do aumento da atividade dos RyR2 (Chen-Izu et al., 2007). Em estágios mais avançados, há uma redução na atividade da SERCA2a, acompanhada pelo aumento da atividade dos NCX, provocando maior saída de Ca^{2+} dos cardiomiócitos, e queda do conteúdo de Ca^{2+} do RS. Isso contribui para que o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja menor e mais lento, gerando uma maior concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma durante a diástole (Bers, 2002; Kemi et al., 2008). A exposição a um longo período de hipertensão gera hipertrofia cardíaca patológica, que poderá evoluir para insuficiência cardíaca (Bing et al., 2002). Desta forma, são vários os estudos que têm relatado disfunções no AEC com a instalação da insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca é um estado crônico em que as perturbações no ciclo intracelular do Ca^{2+} ocorrem simultaneamente à deterioração da função cardíaca e do aumento da arritmogênese (Houser et al., 2000; Wasserstrom et al., 2009). Outras disfunções têm sido relatadas no AEC com a instalação da insuficiência cardíaca, por exemplo: a diminuição na rede de túbulos-T provocando o distanciamento dos RyR2 e DHPR (Balijepalli et al., 2003), disfunções na ativação dos RyR2, provocando uma liberação desordenada de Ca^{2+} do RS (Song et al., 2006) e a diminuição da captação de Ca^{2+} pelo RS em função da diminuição na atividade e expressão da SERCA2a (Hasenfuss, 1998; Dash et al., 2001).

Sabe-se que o percentual de insuficiência cardíaca gerada pelo processo hipertensivo crônico aumenta sensivelmente na população idosa (Barretto e Wajngarten, 1998). Contudo, os mecanismos envolvidos na gênese da HAS durante o processo de envelhecimento em humanos e modelos animais de hipertensão são pouco compreendidos.

1.4.1 – Envelhecimento e acoplamento excitação-contração (AEC)

O impacto da idade na função contrátil do coração foi investigado em humanos e modelos animais. Estudos em humanos indicam que a função contrátil do coração é relativamente bem preservada em repouso independentemente da idade, embora a capacidade de aumentar a força contrátil em resposta ao aumento da demanda cardíaca esteja comprometida; e o relaxamento do miocárdio seja retardado em adultos mais velhos (Lakatta e Sollott, 2002; Lakatta e Levy, 2003). Resultados similares foram observados em modelos animais, onde o declínio da função contrátil do coração em função do envelhecimento ocorre simultaneamente com alterações no ciclo intracelular de Ca^{2+} (Xiao et al., 1994; Lim et al., 2000; Isenberg et al., 2003; Fares e Howlett, 2010; Howlett, 2010).

A maioria dos estudos com animais utilizaram ratos e camundongos com aproximadamente 24 meses de idade como modelo animal idoso, comparados com animais entre 3 a 8 meses de idade (adultos jovens) (Fares e Howlett, 2010; Kapur et al., 2010).

Alguns destes estudos indicaram que durante o processo de envelhecimento, ocorrem alterações no sistema cardiovascular, como aumento da rigidez arterial, aumento da pós-carga, aumento da massa do VE (aumento da espessura da parede do VE), acúmulo de tecido fibroso (colágeno) e redução na complacência miocárdica (Anversa et al., 1990; Burgess et al., 2001; Lakatta e Levy, 2003). Estas alterações estruturais contribuem para a redução no débito cardíaco e na função contrátil em indivíduos idosos (Lakatta e Levy, 2003; Bernhard e Laufer, 2008).

No nível celular foi mostrado um declínio na função contrátil devido ao envelhecimento. Quando os cardiomiócitos são estimulados em uma frequência lenta (<1 Hz), não há diferença na contratilidade dos cardiomiócitos de animais idosos comparados com animais jovens (Capasso et al., 1992; Xiao et al., 1994; Lim et al., 2000; Farrell e Howlett, 2007). Entretanto, quando os cardiomiócitos são estimulados a

frequências mais elevadas (>2 Hz), a contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares nos animais idosos (24 e 34 meses de idade) é menor quando comparados aos animais jovens (1 a 5 meses de idade) (Xiao et al., 1994; Lim et al., 2000). Além disso, os tempos de contração e relaxamento celular são prolongados nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos idosos (Xiao et al., 1994; Lim et al., 2000).

Os mecanismos responsáveis pelo declínio da função contrátil nos ratos idosos estão associados com a redução no transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e no prolongamento do tempo de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Lim et al., 2000; Isenberg et al., 2003). Estas modificações na sinalização intracelular de Ca^{2+} e na contratilidade celular provocadas pelo envelhecimento podem se dar, pelo menos em parte, por alterações em alguns mecanismos moleculares envolvidos no AEC. Sobre estes mecanismos, estudos indicam uma redução na densidade (Assayag et al., 1998; Nicholl e Howlett, 2006) e na fosforilação dos RyR2 nos cardiomiócitos dos animais idosos (10, 24, 26 e 28 meses de idade) em comparação aos animais jovens (4, 6 e 8 meses de idade) (Xu e Narayanan, 1998). Também foi observado na literatura, uma redução na expressão e atividade da SERCA2a nos cardiomiócitos de ratos idosos (24 e 26 meses de idade), em comparação com animais jovens (1, 2, 6 e 8 meses de idade) (Froehlich et al., 1978; Wei et al., 1984; Lompre et al., 1991; Lim et al., 1999). A redução na capacidade da SERCA2a de captar o Ca^{2+} para o RS pode prolongar o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e como consequência, prolongar o tempo de contração celular (Lompre et al., 1991). Alterações relacionadas à idade na regulação da SERCA2a pelo seu inibidor endógeno FLB também podem alterar a contratilidade celular. Estudos sobre o envelhecimento indicam que a FLB é expressa em níveis elevados nos cardiomiócitos de ratos idosos (24 e 34 meses de idade), comparados aos ratos jovens (5 meses de idade) (Lim et al., 1999). Além disso, a fosforilação da FLB pela PKA está reduzida nos cardiomiócitos de ratos idosos (26 e 28 meses de idade), comparados aos ratos jovens (6 a 8 meses de idade) (Xu e Narayanan, 1998).

Outros estudos investigaram a atividade do trocador NCX nos cardiomiócitos de ratos idosos. Contudo, os resultados são inconsistentes, com relatos apontando aumento na expressão do NCX em função do envelhecimento (Mace et al., 2003), ou que a expressão do NCX se mantém inalterada ou reduzida (Abete et al., 1996; Lim et al., 1999; Mace et al., 2003). O aumento da expressão do NCX pode contribuir para o aumento do influxo de Ca^{2+} durante o PA cardíaco, podendo gerar um prolongamento

do tempo de contração celular, observado nos cardiomiócitos dos ratos idosos (Lakatta e Sollott, 2002).

As manifestações da doença cardíaca hipertensiva e do envelhecimento do coração são similares. Há evidências que tanto a HAS quanto a senescência são fatores que promovem a remodelação cardíaca com: hipertrofia ventricular, fibrose miocárdica e alterações na homeostase do Ca^{2+} , que contribuem para a disfunção miocárdica (Varagic et al., 2001; Bing et al., 2002).

Neste contexto, com o objetivo de investigar as mudanças no AEC em resposta ao processo de envelhecimento e da hipertensão, Kapur e colaboradores (2010) estudaram ratos SHR, divididos em quatro faixas etárias: 6, 7, 9 e 22 meses de idade. Os autores compararam os ratos SHR com seus respectivos controles normotensos e observaram as mudanças no ciclo intracelular do Ca^{2+} em função da progressão da doença hipertensiva. Como resultados, eles encontraram um efeito inotrópico positivo compensatório nos animais SHR de 7 e 9 meses de idade, seguido do aumento na amplitude e no tempo de duração do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos animais SHR de 9 meses. O prolongamento do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi ainda maior nos animais SHR de 22 meses de idade, apesar de observarem uma redução na amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos animais desta idade. Os autores observaram ainda um aumento na incidência das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos dos animais SHR, comparados aos controles em todas as idades, sugerindo maior probabilidade de surgimento de arritmias, antes mesmo da instauração da insuficiência cardíaca. Outros estudos encontraram prolongamento no potencial de ação cardíaco induzidos pelo processo de envelhecimento (Cheng et al., 1996; Dibb et al., 2007). Entretanto, estas pesquisas foram realizadas apenas com animais machos. Diante de tal fato, considera-se necessário o aprofundamento desses estudos, visando apontar os efeitos da hipertensão e do envelhecimento na função contrátil e sinalização intracelular de Ca^{2+} , também em fêmeas SHR.

1.4.2 – Diferenças entre os sexos e o AEC

Estudos apontam que as complicações existentes em função da HAS além de sofrerem influência do envelhecimento, são mais proeminentes em homens do que em mulheres, sugerindo uma diferença na fisiopatologia da doença relacionada ao sexo (Messerli et al., 1987; Noblat et al., 2004; Du et al., 2006).

Em um trabalho sistemático quantitativo de 2003 a 2008 englobando 44 estudos em 35 países, foi identificada uma prevalência global de hipertensão arterial de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (Pereira et al., 2009). No Brasil, estudos populacionais nos últimos anos apontaram uma prevalência de hipertensão arterial acima de 30%, sendo 40,1% na população masculina e 32,2% na população feminina (SBC, 2016); achados semelhantes à de outros países (Pereira et al., 2009).

Estudos clínicos têm identificado diferenças marcantes entre homens e mulheres na incidência e na expressão de diversas doenças cardiovasculares (Czubryt et al., 2006; Pilote et al., 2007; Roger et al., 2011). As mulheres geralmente apresentam coronariopatia e infarto do miocárdio cerca de 10 anos mais tarde do que os homens (Regitz-Zagrosek e Seeland, 2012). Cardiomiopatias hipertróficas e dilatadas ocorrem com mais frequência em homens do que em mulheres (Regitz-Zagrosek e Seeland, 2012). As fêmeas são mais resistentes a lesões isquêmicas (Imahashi et al., 2004) e menos propensas a desenvolverem insuficiência cardíaca crônica durante a sobrecarga de pressão (Douglas et al., 1998).

No nível celular, estudos apontam diferenças marcantes nos cardiomiócitos de ratos e ratas saudáveis. Neste sentido, Farrell e colaboradores (2010) estudaram as diferenças sexuais no mecanismo de AEC em ratos e ratas da linhagem Fischer. Os autores observaram menor contratilidade dos cardiomiócitos nas fêmeas com relação aos machos. Eles também observaram que a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ era menor e mais lenta nos cardiomiócitos das fêmeas.

Howllet e colaboradores (2010) observaram algumas mudanças associadas à idade e ao sexo no AEC em ratos da linhagem Fischer com 3 e 24 meses de idade. Os resultados mostraram que a amplitude de contração e a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ diminuíram com a idade nos machos. Em contraste, observaram que a idade não afetou a contratilidade e nem a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nas ratas. Os valores da contratilidade e da amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foram menores nas ratas jovens. Assim, pelo menos em ratos Fischer, as mudanças dependentes da idade são mais proeminentes nos ratos machos do que nas fêmeas.

Em um único estudo encontrado utilizando o modelo SHR, Chan e colaboradores (2011) observaram algumas mudanças associadas à idade e ao sexo na estrutura e função cardíaca em ratos e ratas SHR e seus controles normotensos Wistar e Wistar Kioto com idades entre 3 e 30 meses. Os resultados deste estudo mostraram que os ratos SHR machos e fêmeas apresentaram hipertrofia ventricular esquerda iniciando

aos 3 meses de idade e aumentando gradativamente durante o período de envelhecimento, sendo mais proeminente a partir dos 15 meses de idade. Contudo, os ratos SHR machos e fêmeas apresentaram hipertrofia ventricular direita a partir dos 15 meses de idade. Independentemente do sexo, apresentaram prolongamento no potencial de ação cardíaco a partir do 6º ao 9º mês de idade, tendo os valores triplicados por volta do 21º mês de idade. Entretanto, apenas o coração dos ratos SHR machos idosos (a partir dos 15 meses de idade) apresentaram redução na função sistólica. Contudo, este estudo não abordou os efeitos relacionados à idade e as diferenças entre o sexo na sinalização intracelular de Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos isolados em ratos SHR.

Desta forma, o presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que os processos de envelhecimento somado à HAS promoveriam alterações deletérias na função contrátil e sinalização intracelular de Ca^{2+} nos ratos SHR, sendo que estas mudanças seriam menos proeminentes nas fêmeas hipertensas.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Investigar as alterações provocadas pelo envelhecimento somado à HAS e as diferenças entre os sexos sobre a morfologia, sinalização intracelular de Ca^{2+} e parâmetros contráteis em cardiomiócitos isolados dos ventrículos de ratos SHR.

2.2- Objetivos Específicos:

Analisar as mudanças referentes à idade e as diferenças entre os sexos:

1. Nas características biométricas e dimensões dos cardiomiócitos ventriculares de ratos hipertensos.
2. No transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos ventriculares de ratos hipertensos.
3. Na amplitude e frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} dos cardiomiócitos ventriculares de ratos hipertensos.
4. Na amplitude e no tempo do ciclo contração-relaxamento dos cardiomiócitos ventriculares de ratos hipertensos.

3- METODOLOGIA

3.1- Animais de experimentação e tratamentos:

Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Ratus Norvegicus*) machos e fêmeas e 20 ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats - SHR*) machos e fêmeas, com 8 e 17 meses de idade. Os animais usados no presente estudo foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG, e do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo – ES. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto recebeu a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa sob o número do processo: 82/2013.

Os ratos foram alojados em gaiolas coletivas, sendo 5 animais por gaiola. Receberam água e ração própria *ad libitum*, sendo mantidos em ambiente com temperatura média controlada de aproximadamente 22°C e submetidos a um regime de luminosidade de 12 horas de escuridão e 12 horas de claridade durante o período do experimento.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos, a saber:

- Grupo normotenso controle 8 meses macho (N8M, n=5);
- Grupo normotenso controle 8 meses fêmea (N8F, n=5);
- Grupo hipertenso 8 meses macho (H8M, n=5);
- Grupo hipertenso 8 meses fêmea (H8F, n=5);
- Grupo normotenso controle 17 meses macho (N17M, n=5);
- Grupo normotenso controle 17 meses fêmea (N17F, n=5);
- Grupo hipertenso 17 meses macho (H17M, n=5);
- Grupo hipertenso 17 meses fêmea (H17F, n=5).

3.2- Pressão arterial:

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) de todos os animais foi realizada quando completaram o 8º e o 17º meses de idade. Por um período

de cinco dias antes da realização das medidas cardiovasculares, todos os ratos foram aclimatados aos aparatos e às condições utilizadas para as medidas da PAS e da PAD, durante sessões diárias. Os registros da PAS e da PAD foram realizados sempre no mesmo horário, em sala específica, com ambiente calmo, temperatura e luminosidade devidamente controladas. As medidas da PAS e da PAD foram realizadas por método não invasivo, sem utilização de anestésico, através de pletismografia de cauda. Utilizou-se um pletismógrafo devidamente calibrado e apropriado para medidas em ratos (LE 5001, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). Como procedimentos para aferição da pressão arterial, cada rato foi colocado em um dispositivo de contenção com aeração constante e aquecido a 29-32°C durante 10 minutos. O manguito de pressão e o transdutor de pulso foram colocados a aproximadamente 2-3 cm da ponta da cauda. Regulou-se o ganho de precisão do transdutor de pulso até o nível adequado, sendo que o manguito foi acionado e se inflou até ocluir a passagem do sangue pela artéria da cauda e o sinal de pulso desaparecer. A seguir, o manguito começou a desinflar, sendo que a PAS e a PAD foram determinadas a partir do momento da recaptção do sinal de pulso. Durante as aferições, foram realizadas três medidas da PAS e da PAD para cada rato, sendo considerada para registro a de valor intermediário.

3.3- Peso corporal, do coração e dos ventrículos:

Os animais foram pesados durante o período experimental, quando completaram o 8º e o 17º mês de idade e no dia da eutanásia, utilizando uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C). Após a eutanásia feita por meio de guilhotina, o coração foi removido, lavado em solução contendo 750 µM de CaCl₂ para retirar o excesso de sangue e pesado em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). Após, foi feita a perfusão das soluções de isolamento. Após a perfusão, os ventrículos (esquerdo e direito) foram separados dos átrios e pesados. Os índices de hipertrofia cardíaca e ventricular foram calculados pelas razões dos pesos do coração e dos ventrículos, respectivamente, pelo peso corporal do animal.

3.4- Isolamento dos cardiomiócitos:

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por (Natali et al., 2001). Após a eutanásia, para a remoção cirúrgica do coração as cartilagens costocodrais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Após a exposição da cavidade torácica, os vasos da base do coração,

a traquéia, o esôfago e parte dos pulmões foram seccionados sucessivamente até a remoção em bloco do coração. Logo após a remoção, o coração foi colocado em um béquer contendo solução nutritora (solução A, item 8.1 – Anexos). Após estes procedimentos, o coração foi transferido para uma placa de vidro, a aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura de microcirurgia na altura de sua segunda ramificação (tronco braquicefálico), fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula) acoplada a uma seringa de 1mL que foi fixada a um sistema de Langendorff adaptado (37°C), com controle manual da perfusão por meio de uma torneira.

Para o isolamento dos cardiomiócitos, o coração foi perfundido com solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 (solução A, item 8.1 - Anexos) em um fluxo constante, até que os vasos coronários estivessem limpos de sangue. Em seguida, trocou-se a perfusão para uma solução livre de cálcio contendo 0,1 mM de EGTA (solução B, item 8.1 – Anexos) durante 6 min. Em seguida, o coração foi perfundido com solução contendo 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) (solução C, item 8.1 – Anexos) durante 15 - 25 min. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O_2 100% – White Martins, Brasil) e mantidas a 37°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados (item 3.3). O ventrículo direito (VD) foi removido e o ventrículo esquerdo (VE) foi aberto na região do septo interventricular. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram removidos manualmente da superfície do VE. Os ventrículos foram separados e fragmentados. Logo após, as amostras foram colocadas em frascos contendo 5mL da solução enzimática (colagenase), (solução C, item 8.1 - Anexos). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 min em “banho-maria” a 37°C com oxigênio. A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30s. O sobrenadante foi removido e as células foram suspensas na solução 750 μM de CaCl_2 (solução A, item 8.1 - Anexos). O processo de centrifugação e suspensão das células foi repetido por mais 2 vezes. As células foram armazenadas em placas de vidro a 5°C até serem utilizadas. Somente células tolerantes ao Ca^{2+} , quiescentes e apresentando formato e estrias transversais bem definidas foram utilizadas. Os registros foram sempre feitos entre uma e seis horas após o isolamento.

3.5- Análises morfológicas dos cardiomiócitos:

Os experimentos de morfologia celular foram realizados no Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX) no Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa. As dimensões dos cardiomiócitos ventriculares (largura, comprimento e volume) foram avaliadas num total de 70 células por animal, conforme descrito anteriormente (Carneiro-Junior, 2009). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro montada num microscópio invertido (Nikon Eclipse –TS100, EUA) e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 8.2 – Anexos) em temperatura ambiente (~ 25°C).

As imagens das células foram visualizadas horizontalmente, com aumento de 400x - lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA) no monitor de um microcomputador. Estas imagens foram capturadas por uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se o programa de captação de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento celular foi determinado medindo-se a imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda. A largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior, no ponto médio dos cardiomiócitos. Para a realização das medições do comprimento e da largura dos cardiomiócitos, utilizou-se uma régua graduada. Na calibração do sistema de captação de imagens cada centímetro correspondia a 12 µm. Somente foram escolhidas para as medições células que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas e quiescentes. O volume celular dado em picolitros foi calculado usando-se a fórmula proposta por (Sato et al., 1996):

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

3.6- Medidas do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$:

As medidas do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos ventriculares foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV com o auxílio de um microscópio de varredura a laser confocal (LSM 510 Meta, ZeissGmbH, Alemanha), utilizando-se lente objetiva de imersão em óleo (Plan-Apo/1.4, 63x, Zeiss, Alemanha). Os cardiomiócitos foram incubados com Fluo-4 acetoximetil-ester (Fluo-4 AM,

Molecular Probes, Eugene, EUA), indicador fluorescente de Ca^{2+} permeável à membrana plasmática, conforme descrito anteriormente (Primola-Gomes et al., 2009).

O Fluo-4 AM ($5\mu\text{M}$) foi preparado em solução de estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO ($30\mu\text{l}$ de DMSO em $50\mu\text{g}$ de Fluo-4 AM). Adicionou-se $5\mu\text{l}$ dessa solução de Fluo-4 AM/DMSO em $500\mu\text{l}$ de meio celular, durante 20 min à temperatura ambiente. Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram lavados e suspensos em solução tampão HEPES (item 8.2 - Anexos) para remover o excesso da sonda fluorescente, acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 8.2 - Anexos) à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Quando o Fluo-4 AM está ligado ao Ca^{2+} e é excitado com o comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm que se relaciona às variações sarcoplasmáticas de Ca^{2+} . Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F_0 . Nas medidas do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, F representa a média da fluorescência máxima após os estímulos na fase sistólica do transiente, e F_0 representa a média da fluorescência mínima medida entre as contrações celulares na fase diastólica do transiente.

O transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi evocado por meio de estimulação de campo. Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA) por um par de eletrodos de platina, acoplados aos dois lados internos da câmara, com um pulso supra-limiar de 0,2ms e 30V (voltage square pulse), na frequência de 1 Hz para produzir condições estacionárias. Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (Line Scan Mode). A linha de varredura (512 pixels) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos. As varreduras foram feitas por meio de um laser de argônio (488nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens bidimensionais (tempo no eixo X e fluorescência no eixo Y) (Figura 1A).

Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas visíveis e com estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). As imagens obtidas foram processadas com auxílio de um software desenvolvido em plataforma MatLab®. As variáveis analisadas foram: amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0); tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima, em milissegundos) e tempo para 50%

do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até a metade do retorno à fluorescência basal, em milissegundos).

Os cardiomiócitos isolados dos animais de um determinado grupo experimental e seu respectivo grupo controle foram sempre analisados no mesmo dia.

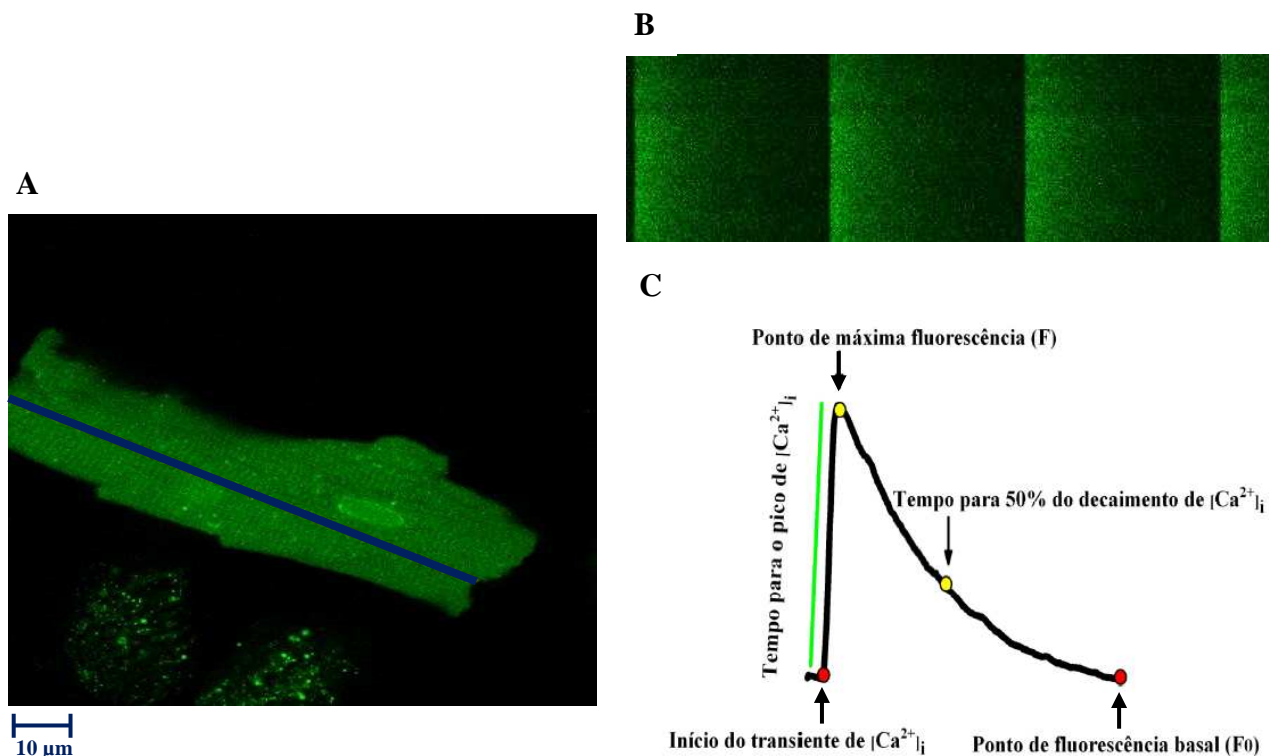


Figura 1. (A) Cardiomiócito, incubado com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo 4 AM). A linha de varredura está representada em azul e foi posicionada no eixo longitudinal da célula, fora da região do núcleo. (B) Figura representativa das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. (C) Traços típicos do resultado da análise da imagem do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados. Imagem ilustrativa modificada do estudo de (Carneiro-Junior, 2013).

3.7- Medidas e análises das sparks espontâneas de $[Ca^{2+}]_i$:

Para as medidas das sparks espontâneas de Ca^{2+} , os cardiomiócitos isolados dos grupos experimentais foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), mesmo procedimento usado no item 3.5. Quando o (Fluo-4 AM) está ligado ao Ca^{2+} e é excitado com o comprimento de onda de 488 nm emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações de $[Ca^{2+}]_i$

sarcoplasmática. Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F_0 , onde F_0 representa a fluorescência basal de Ca^{2+} , ou seja, os ruídos do fundo da imagem (background noise) e F representa a fluorescência das sparks espontâneas de Ca^{2+} em um dado momento de ocorrência, nos cardiomiócitos sem estímulo prévio. O procedimento para determinar F_0 consiste em duas etapas. Primeiro, selecionamos a spark espontânea de Ca^{2+} a ser analisada e identificamos o valor mínimo da imagem de fundo das sparks através das opções (Analyze – Histogram) no software livre (ImageJ). Segundo, inserimos o valor mínimo da imagem de fundo obtida, na opção background no plugin SparkMaster, no ImageJ. Este procedimento foi feito para cada imagem analisada.

As imagens de microscopia confocal foram feitas usando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (ZeissGmbH, Jena, Alemanha), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Para a aquisição das imagens, foi utilizada uma lente objetiva de imersão a óleo (63x). Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (Line Scan Mode). A linha de varredura (512 pixels) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar a região do núcleo (Figura 1A). A varredura foi feita por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y). Antes do registro das imagens as células foram estimuladas na frequência de 1 Hz por aproximadamente 40s. Após este tempo, a estimulação foi cessada e os registros foram feitos com a célula em repouso. Foram obtidas 10 imagens por célula, sendo que, estas imagens foram analisadas utilizando-se a interface gráfica SparkMaster, programa de análise de sparks inserido no plugin do software livre ImageJ (Picht et al., 2007). O SparkMaster é um programa automatizado que foi desenvolvido e adaptado a partir de algoritmos específicos para análises das sparks medidas por microscopia confocal (Cheng et al., 1999). Neste tipo de análise, o algoritmo identifica os sinais de fluorescência baseado nos seus desvios a partir do ruído de fundo da imagem original background noise. Assim, a imagem original é filtrada, normalizada e a média e o desvio-padrão do plano de fundo são calculados. As regiões da imagem excedendo 1,5 vezes o desvio-padrão a partir do plano de fundo são utilizadas para a construção de uma linha de base e para a normalização da imagem total. Esta última imagem normalizada é utilizada para a detecção e análise das sparks de Ca^{2+} , de forma que os eventos com áreas (em pixel) excedendo um limiar de detecção pré-estabelecido (3,0

vezes o desvio-padrão) são considerados possíveis sparks. A média e o desvio-padrão são calculados subtraindo-se as sparks em potencial. Após estes procedimentos, as possíveis sparks são consideradas para análise se as áreas contendo valores acima do limiar de detecção pré-estabelecido contêm valores de pixel que excedem o seguinte critério: desvio-padrão x fator de limiar + média do background. O fator de limiar é escolhido pelo usuário, sendo que, baseado em resultados anteriores (Picht et al., 2007), o fator adotado no presente trabalho foi 3,8. A velocidade de varredura (scanningspeed) e o tamanho do pixel (pixel size) foram 800 lines per seconds (lps) e 0,14 μm , respectivamente.

As variáveis analisadas foram:

- 1) Frequência das sparks (sparks x $100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$);
- 2) Amplitude das sparks ($\Delta F/F_0$) – Que corresponde à diferença entre o pico de fluorescência das sparks e a fluorescência do fundo (background).

3.8- Contratilidade Celular:

Os experimentos de contratilidade celular foram realizados no Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX) localizado no Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa. As contrações dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse –TS100, EUA) equipado com lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito anteriormente (Natali et al., 2001). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro montada no microscópio, e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 8.2 –Anexos) em temperatura ambiente (~ 25°C). Foram visualizados em um monitor com auxílio de uma câmera filmadora (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se o programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA).

As células foram estimuladas externamente a uma frequência de 1 Hz (30V duração, 5 ms) utilizando um par de eletrodos de aço acoplados aos dois lados internos da câmara, através de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA).

As bordas dos cardiomiócitos foram identificadas com duas janelas (direita esquerda) e definidas através do ajuste do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada dos cardiomiócitos. As contrações dos cardiomiócitos após a estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 2).

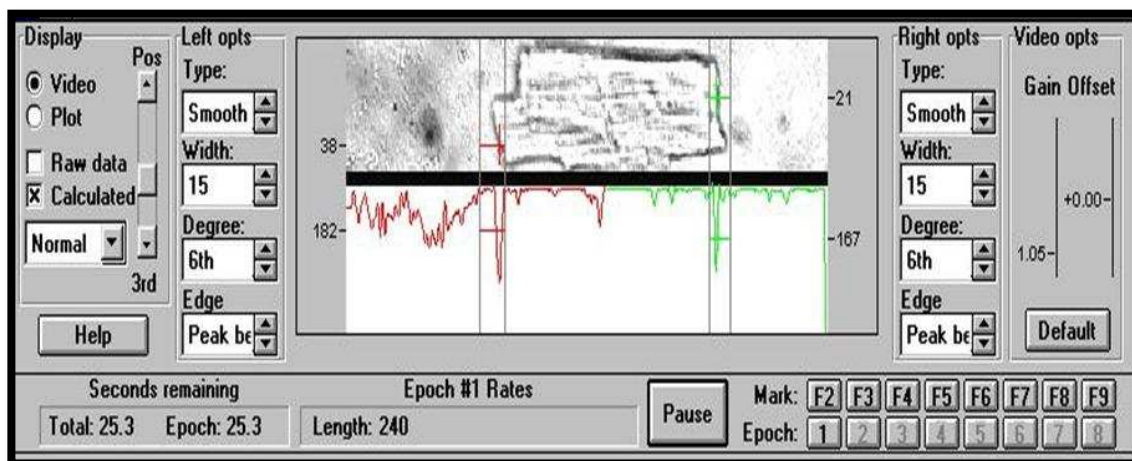


Figura 2. Representação do programa utilizado (Ionwizard, Ionoptix, EUA) para aquisição dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente. Imagem ilustrativa retirada do estudo de (Carneiro-Junior, 2013).

Somente os registros de cardiomiócitos em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem contrações involuntárias, foram analisadas. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e em temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). A partir dos registros obtidos, foram analisadas a amplitude de contração (% do comprimento celular de repouso), o tempo até o pico de contração (ms) e o tempo para 50% do relaxamento celular (ms). Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na figura 3. Durante cada dia de experimento de contratilidade celular, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

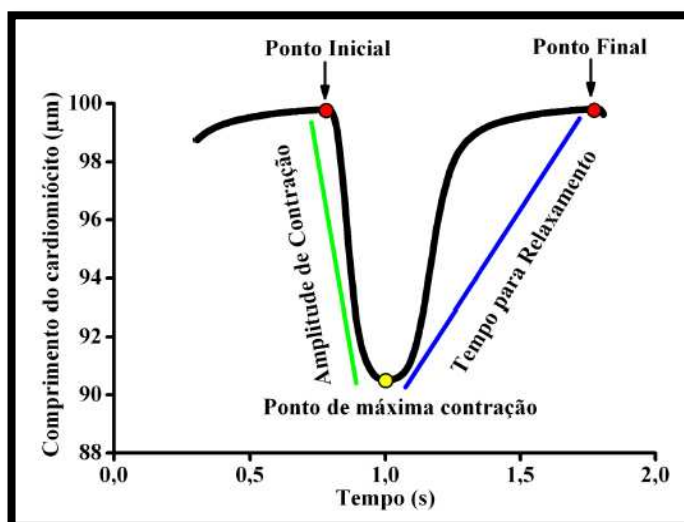


Figura 3. Traços representativos de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz e os parâmetros avaliados. Imagem ilustrativa retirada do estudo de (Carneiro-Junior, 2013).

3.9- Análise estatística:

Para a escolha dos testes estatísticos foi feita previamente uma análise da normalidade de cada variável medida. As diferenças entre os grupos experimentais em relação ao peso corporal, ao peso do coração, ao peso dos ventrículos, pressão arterial sistólica e diastólica, medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e da contratilidade celular foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA two-way), com o teste post-hoc de Tukey.

Para a análise da frequência e amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Após este procedimento, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis que corresponde à análise de variância não paramétrica, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos. As análises foram realizadas com o auxílio dos softwares Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA) e Matlab R2010a.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto para os parâmetros de frequência e amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} que são apresentados como mediana. O nível de significância adotado foi de $\alpha=5\%$.

4- RESULTADOS:

4.1- Características biométricas e parâmetros cardiovasculares:

Os resultados referentes à pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).

Grupos	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
N8M	118,1±5,4	89,6±9,5	99,1±6,4
N8F	119,8±7,9	88,3±7,7	98,8±7,3
H8M	193,1±5,9 a	127,3±9,5 a	149,2±6,8 a
H8F	186,3±6,4 c	120,0±8,0 c	142,1±5,8 c
N17M	142,1±4,6 a	103,8±7,0	116,6±5,9
N17F	133,0±5,5	101,1±5,2	101,1±5,2
H17M	190,6±5,9 e	118,1±9,0 e	142,3±6,7 e
H17F	197,5±5,5 f	127,0±8,9 f	150,5±6,4 f

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; PAM= pressão arterial média. N8M= grupo normotenso 8 meses macho; N8F= grupo normotenso 8 meses fêmea; H8M= grupo hipertenso 8 meses macho; H8F= grupo hipertenso 8 meses fêmea; N17M= grupo normotenso 17 meses macho; N17F= grupo normotenso 17 meses fêmea; H17M= grupo hipertenso 17 meses macho; H17F= grupo hipertenso 17 meses fêmea. (a) indica diferença em relação ao grupo N8M; (b) indica diferença em relação ao grupo H8M; (c) indica diferença em relação ao grupo N8F; (d) indica diferença em relação ao grupo H17M; (e) indica diferença em relação ao grupo N17M; (f) indica diferença em relação ao grupo N17F; (g) indica diferença em relação ao grupo H8F. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Como mostrado na tabela 1, a PAS, PAD e PAM foram maiores nos ratos dos grupos hipertensos em comparação aos ratos dos grupos normotensos, independentemente da idade.

A PAS dos ratos normotensos machos de 17 meses de idade foi significativamente maior em relação aos ratos normotensos machos de 8 meses de idade. Este resultado aponta os efeitos da idade na PAS dos ratos normotensos machos.

Não foram observadas diferenças significativas relacionadas ao sexo para os parâmetros de pressão arterial entre os grupos estudados.

Os resultados referentes aos pesos corporal, do coração, dos ventrículos, do VE, do VD, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal, peso do coração, peso dos ventrículos, peso do VE e peso do VD.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso do coração (g)	Peso dos ventrículos (g)	Peso do VE (g)	Peso do VD (g)
N8M	463±14	1,48±0,05	1,88±0,11	1,26±0,15	0,40±0,03
N8F	296±10 a	1,05±0,03 a	1,37±0,05 a	0,69±0,02 a	0,31±0,02
H8M	340±10 a	1,67±0,08 a	2,11±0,17	1,52±0,09	0,39±0,04
H8F	216±2 bc	1,19±0,03 b	1,39±0,03 b	0,87±0,03 b	0,35±0,04
N17M	603±23 a	1,81±0,05 a	2,31±0,16 a	1,38±0,10	0,50±0,06
N17F	365±14 ce	1,26±0,03 ce	1,53±0,10 e	1,01±0,06 ce	0,30±0,01 e
H17M	354±10 e	2,16±0,17 be	2,54±0,21	1,63±0,12	0,47±0,06
H17F	221±6 df	1,39±0,06 dg	1,59±0,21d	0,98±0,05 d	0,40±0,05

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. VE= ventrículo esquerdo; VD= ventrículo direito. N8M= grupo normotenso 8 meses macho; N8F= grupo normotenso 8 meses fêmea; H8M= grupo hipertenso 8 meses macho; H8F= grupo hipertenso 8 meses fêmea; N17M= grupo normotenso 17 meses macho; N17F= grupo normotenso 17 meses fêmea; H17M= grupo hipertenso 17 meses macho; H17F= grupo hipertenso 17 meses fêmea. (a) indica diferença em relação ao grupo N8M; (b) indica diferença em relação ao grupo H8M; (c) indica diferença em relação ao grupo N8F; (d) indica diferença em relação ao grupo H17M; (e) indica diferença em relação ao grupo N17M; (f) indica diferença em relação ao grupo N17F; (g) indica diferença em relação ao grupo H8F. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Como mostrado na tabela 2, os ratos hipertensos apresentaram menor peso corporal em relação aos ratos normotensos. Os ratos dos grupos N17M e N17F

apresentaram maior peso corporal quando comparados aos grupos N8M e N8F respectivamente. Os ratos hipertensos não apresentaram diferença significativa no peso corporal relacionado à idade. As fêmeas apresentaram menor peso corporal em relação aos machos.

Os ratos hipertensos machos apresentaram maior peso do coração quando comparados aos normotensos machos, independentemente da idade. As ratas hipertensas e normotensas apresentaram menor peso do coração em relação aos ratos hipertensos e normotensos machos, respectivamente. Ainda sobre o peso do coração, os ratos de 17 meses de idade apresentaram o peso do coração maior quando comparados aos ratos de 8 meses de idade, indicando os efeitos da idade sobre este parâmetro.

Em relação ao peso dos ventrículos, as ratas hipertensas e normotensas apresentaram o peso dos ventrículos significativamente menor em relação aos ratos hipertensos e normotensos machos, respectivamente. Os machos normotensos de 17 meses apresentaram maior peso dos ventrículos quando comparados aos machos normotensos de 8 meses. As ratas normotensas de 17 meses apresentaram maior peso do VE quando comparadas às ratas normotensas de 8 meses, evidenciando os efeitos da idade para estes parâmetros.

As ratas normotensas de 17 meses apresentaram o peso do VD menor quando comparadas aos machos normotensos de 17 meses, evidenciando a diferença entre os sexos no peso do VD nos animais normotensos idosos.

Os resultados referentes aos pesos relativos (que indicam a ocorrência ou não de hipertrofia) do coração, dos ventrículos, do VE e do VD estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Peso relativo do coração, peso relativo dos ventrículos, peso relativo do VE e peso relativo do VD.

Grupos	Peso Relativo do coração (mg/g)	Peso relativo dos ventrículos (mg/g)	Peso relativo do VE (mg/g)	Peso relativo do VD (mg/g)
N8M	3,20±0,02	4,05±0,19	2,72±0,28	0,87±0,06
N8F	3,58±0,17 a	4,66±0,24	2,33±0,08	1,09±0,08
H8M	4,93±0,21 a	6,26±0,24 a	4,49±0,27 a	1,17±0,15
H8F	5,50±0,12 bc	6,45±0,14 c	4,05±0,17 c	1,65±0,19 bc
N17M	3,02±0,12	3,92±0,23	2,34±0,14	0,85±0,10
N17F	3,48±0,05 e	4,19±0,24	2,77±0,14	0,84±0,06
H17M	6,09±0,42 eb	7,15±0,52 e	4,60±0,32 e	1,33±0,16 e
H17F	6,31±0,20 fg	7,20±0,27 fg	4,43±0,16 f	1,87±0,30 f

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. VE= ventrículo esquerdo; VD= ventrículo direito. N8M= grupo normotenso 8 meses macho; N8F= grupo normotenso 8 meses fêmea; H8M= grupo hipertenso 8 meses macho; H8F= grupo hipertenso 8 meses fêmea; N17M= grupo normotenso 17 meses macho; N17F= grupo normotenso 17 meses fêmea; H17M= grupo hipertenso 17 meses macho; H17F= grupo hipertenso 17 meses fêmea. (a) indica diferença em relação ao grupo N8M; (b) indica diferença em relação ao grupo H8M; (c) indica diferença em relação ao grupo N8F; (d) indica diferença em relação ao grupo H17M; (e) indica diferença em relação ao grupo N17M; (f) indica diferença em relação ao grupo N17F; (g) indica diferença em relação ao grupo H8F. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Como mostrado na tabela 3, os ratos hipertensos apresentaram maior peso relativo do coração, dos ventrículos e do VE quando comparados aos ratos normotensos, independentemente da idade. Os ratos hipertensos de 17 meses apresentaram valores maiores para o peso relativo do VD quando comparados aos ratos normotensos de 17 meses. Estes resultados em conjunto indicam a existência de hipertrofia ventricular provocada pela hipertensão.

Os ratos hipertensos machos de 17 meses de idade sofreram hipertrofia cardíaca mais intensa do que os ratos hipertensos machos de 8 meses de idade. As fêmeas hipertensas de 17 meses de idade sofreram hipertrofia cardíaca e ventricular

mais intensa do que as fêmeas hipertensas de 8 meses de idade, evidenciando os efeitos da idade nestes parâmetros.

As fêmeas hipertensas de 8 meses de idade sofreram hipertrofia cardíaca e ventricular direita mais intensa do que os machos da mesma idade.

4.2- Dimensões dos cardiomiócitos:

As dimensões dos cardiomiócitos foram tomadas das células isoladas dos VE e VD dos ratos de todos os grupos experimentais.

Os resultados referentes à medida do comprimento, largura e volume celular estão apresentados na figura 4.

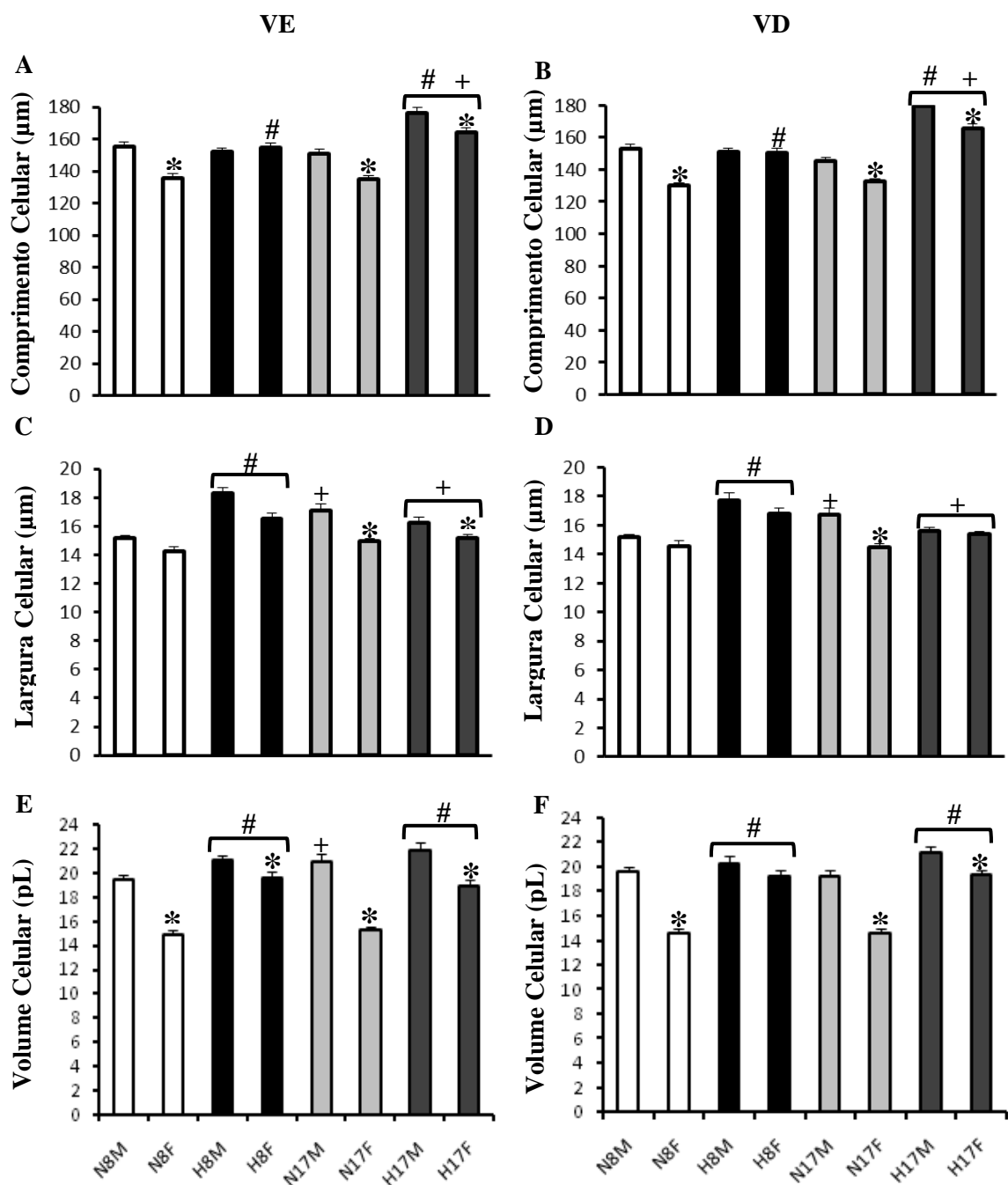


Figura 4. Dimensões dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos e hipertensos. VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea. Os dados são expressos como média ± erro padrão. (#) = fator hipertensão: indica diferença em relação aos grupos normotensos. (+) = fator idade: indica diferença em relação aos grupos normotensos e hipertensos de 8 meses. (*) = fator sexo: indica diferença em relação aos machos. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Fator hipertensão. Como apresentado na figura 4 (A e B), o comprimento dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos das fêmeas hipertensas de 8 meses de idade foram maiores do que aqueles do grupo controle (N8F). Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses também apresentaram maior comprimento celular, comparados aos cardiomiócitos isolados dos animais controle destes grupos (N17M e N17F). Estes resultados demonstram que a hipertensão provocou aumento do comprimento dos cardiomiócitos ventriculares das fêmeas de 8 meses e dos animais de 17 meses de idade, independentemente do sexo.

Como apresentado na figura 4 (C e D), os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses apresentaram maior largura celular quando comparado aos cardiomiócitos dos animais controle destes grupos (N8M e N8F). Não observamos efeito da hipertensão na largura dos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses. Podemos inferir que a hipertensão aumentou a largura dos cardiomiócitos ventriculares dos ratos machos e fêmeas de 8 meses de idade.

Nas Figuras 4 (E e F), observa-se que os cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais dos grupos hipertensos apresentaram maior volume celular quando comparados aos cardiomiócitos isolados dos animais dos grupos normotensos. Este resultado indica que a hipertensão aumentou o volume dos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos independentemente de outro fator.

Fator idade. Como apresentado na figura 4, os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior comprimento celular quando comparados aos animais hipertensos de 8 meses. A largura dos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos diminuiu com o tempo, ao contrário do que aconteceu com os animais normotensos. Observou-se também, que o volume dos cardiomiócitos do VE dos machos normotensos aumentou com a idade.

Fator sexo. Como apresentado na Figura 4, as fêmeas possuem cardiomiócitos com menor comprimento, largura e volume quando comparados aos machos, independentemente de outro fator.

4.3- Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$:

As medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas nos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos ratos de todos os grupos experimentais.

As figuras 5 e 6 apresentam registros típicos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, nos cardiomiócitos dos animais dos grupos experimentais, incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo4-AM) e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz.

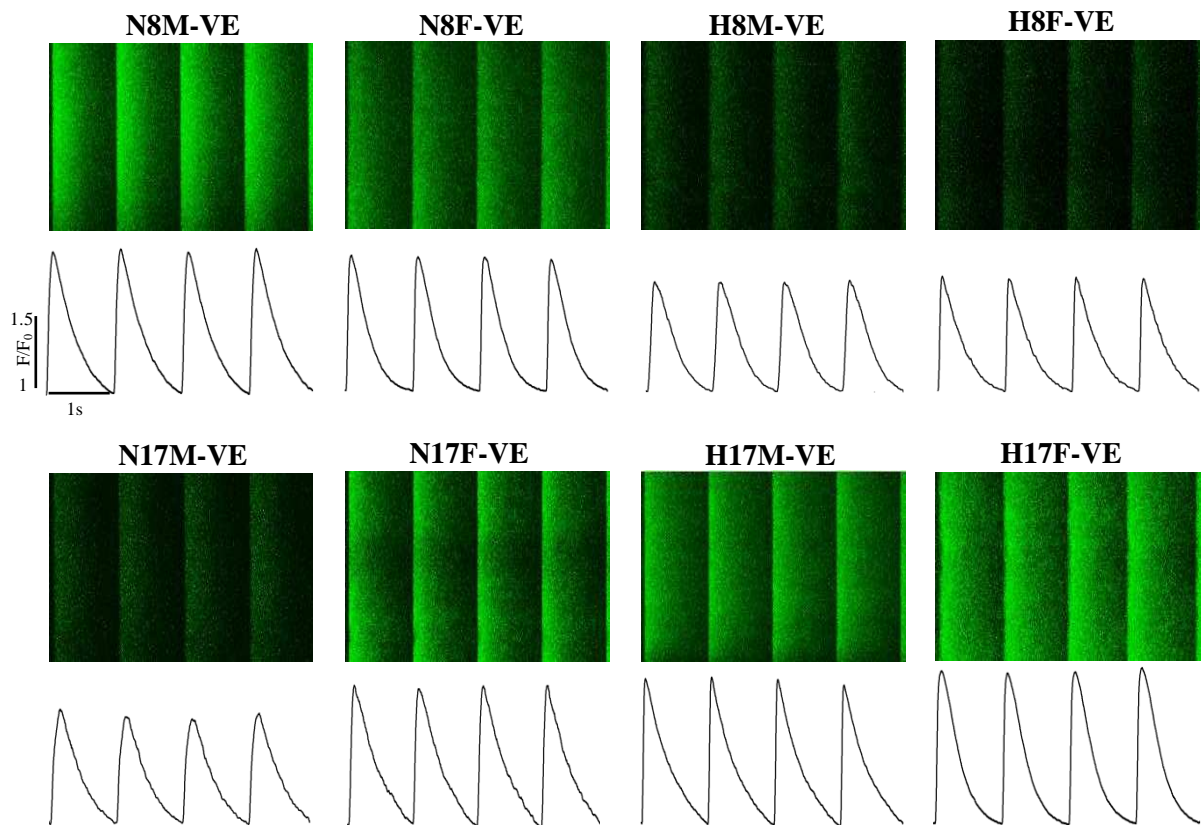


Figura 5. Registros típicos das imagens de fluorescência e os traçados gerados para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM) e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como a taxa de intensidade de fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica. VE= ventrículo esquerdo. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea.

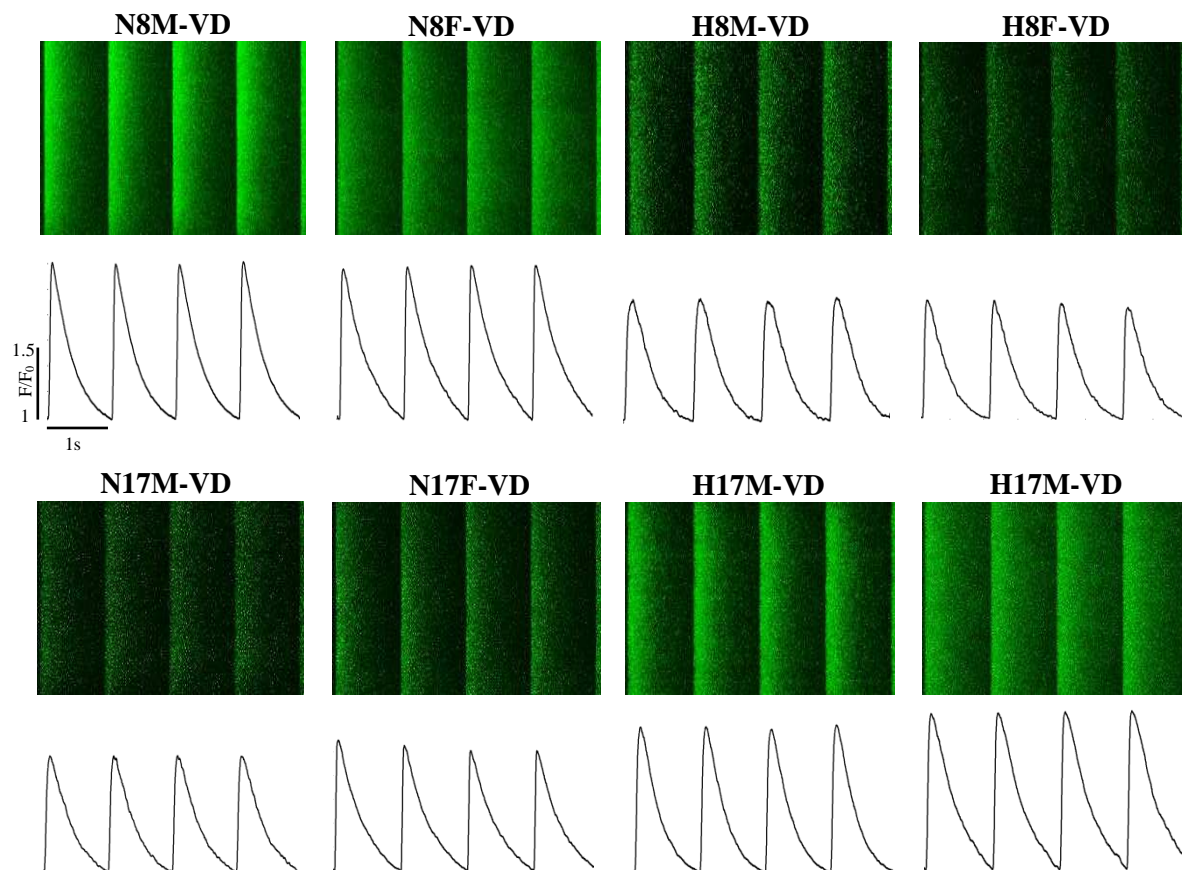


Figura 6. Registros típicos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como a taxa de intensidade de fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica. VD= ventrículo direito. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea.

Os resultados referentes à medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ estão apresentados na figura 7.

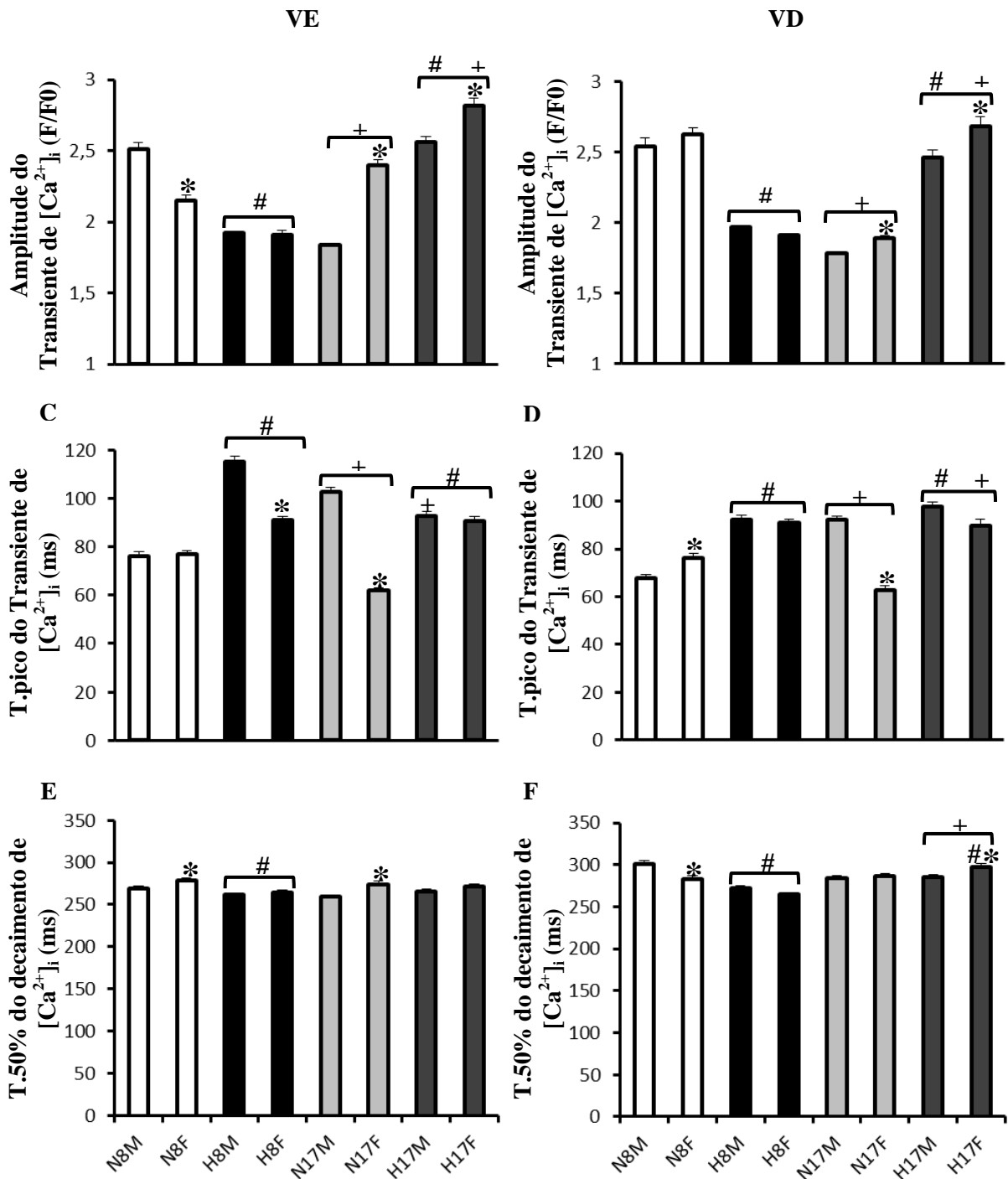


Figura 7. Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos e hipertensos. (A e B) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (F/F₀); (C e D) Tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (ms); (E e F) Tempo para 50% do Decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea. Os dados são expressos como média ± erro padrão. (#) = fator hipertensão: indica diferença em relação aos grupos normotensos. (+) = fator idade: indica diferença em relação aos grupos normotensos e hipertensos de 8 meses. (*) = fator sexo: indica diferença em relação aos machos. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Fator hipertensão: Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses apresentaram menor amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ comparados aos animais normotensos de 8 meses. Em contraste, os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ quando comparados aos animais normotensos de 17 meses (Figura 7 A e B).

Como apresentado na figura 7 (C, D, E e F) a hipertensão prolongou o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses de idade, nos cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas de 17 meses e nos cardiomiócitos do VD dos animais hipertensos de 17 meses, comparado aos animais normotensos da mesma idade. Observou-se também, que a hipertensão reduziu o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses, comparado aos normotensos da mesma idade. Em contraste, a hipertensão prolongou o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 17 meses, comparado à fêmea normotensa da mesma idade.

Fator idade: Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ comparados aos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 8 meses (Figura 7 A e B). Os resultados do presente estudo ainda mostraram que os cardiomiócitos ventriculares dos machos normotensos de 17 meses apresentaram menor amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos de 8 meses. A amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos do VD das fêmeas normotensas também diminuiu com a idade. Todavia, os cardiomiócitos do VE das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ comparadas aos cardiomiócitos das fêmeas normotensas de 8 meses.

Como apresentado na figura 7 (C e D) os cardiomiócitos do VE dos machos hipertensos de 17 meses apresentaram menor tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos de 8 meses. Esta redução também foi observada nos cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 17 meses, comparado com as fêmeas hipertensas mais jovens. Todavia, houve um prolongamento do tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos do VD dos machos hipertensos de 17 meses, comparados aos machos hipertensos de 8 meses. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram menor tempo para o pico do transiente de

$[Ca^{2+}]_i$ do que as fêmeas normotensas de 8 meses. Contudo, os cardiomiócitos ventriculares dos machos normotensos de 17 meses apresentaram maior tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparado aos cardiomiócitos dos machos normotensos de 8 meses.

Como apresentado na figura 7 (E e F) os cardiomiócitos do VD dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 8 meses.

Fator sexo: Os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas hipertensas de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparado aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparado aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade. Todavia, os cardiomiócitos do VE das fêmeas normotensas de 8 meses apresentaram menor amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ comparado aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade (Figura 7 A e B).

Como apresentado na figura 7 (C e D), os cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram menor tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, quando comparados aos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses também apresentaram menor tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade. Em contraste, os cardiomiócitos do VD das fêmeas normotensas de 8 meses apresentaram aumento no tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade.

Como apresentado na figura 7 (E e F), os cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 17 meses apresentaram maior tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos do VE das fêmeas normotensas apresentaram maior tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos machos normotensos, independentemente da idade. Contudo, os cardiomiócitos do VD das fêmeas normotensas de 8 meses apresentaram menor tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade.

Em resumo: a hipertensão reduziu a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos ratos hipertensos de 8 meses de idade. A amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foi maior nos cardiomiócitos dos ratos hipertensos de 17 meses. O aumento da amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ observado nos animais hipertensos de 17 meses foi maior nos cardiomiócitos ventriculares das fêmeas do que nos machos da mesma idade. Os resultados ainda mostraram que a hipertensão prolongou o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses de idade, no VE das fêmeas hipertensas de 17 meses e no VD dos animais hipertensos de 17 meses. Os efeitos da hipertensão sob o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ estavam menos proeminentes nos cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas mais jovens. Observou-se também, que a hipertensão reduziu o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses. Contudo, houve um prolongamento no tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 17 meses.

4.4- Medida das Sparks espontâneas de Ca^{2+} :

As características das sparks espontâneas de Ca^{2+} foram medidas em cardiomiócitos isolados dos ventrículos de todos os grupos experimentais.

O número de células e de sparks espontâneas de Ca^{2+} por grupo estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Número de células e de sparks espontâneas de Ca²⁺.

Grupos	Nº de células		Nº de sparks espontâneas	
	VE	VD	VE	VD
N8M	38	38	952	871
N8F	38	37	1390	1168
H8M	40	53	2437	3100
H8F	46	51	2314	3276
N17M	63	58	1927	1746
N17F	40	36	1470	838
H17M	56	60	3080	2545
H17F	60	36	4160	1772

N8M= grupo normotenso 8 meses macho; N8F= grupo normotenso 8 meses fêmea; H8M= grupo hipertenso 8 meses macho; H8F= grupo hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea. VE= ventrículo esquerdo; VD= ventrículo direito. Nº de células = número de células analisadas em cada ventrículo. Nº de sparks espontâneas = número de sparks espontâneas de Ca²⁺ em 10 registros de imagem por célula.

As figuras representativas das sparks espontâneas de Ca²⁺ estão apresentadas nas figuras 8 e 9. Os resultados referentes à medida das sparks espontâneas de Ca²⁺ estão apresentados na figura 10.

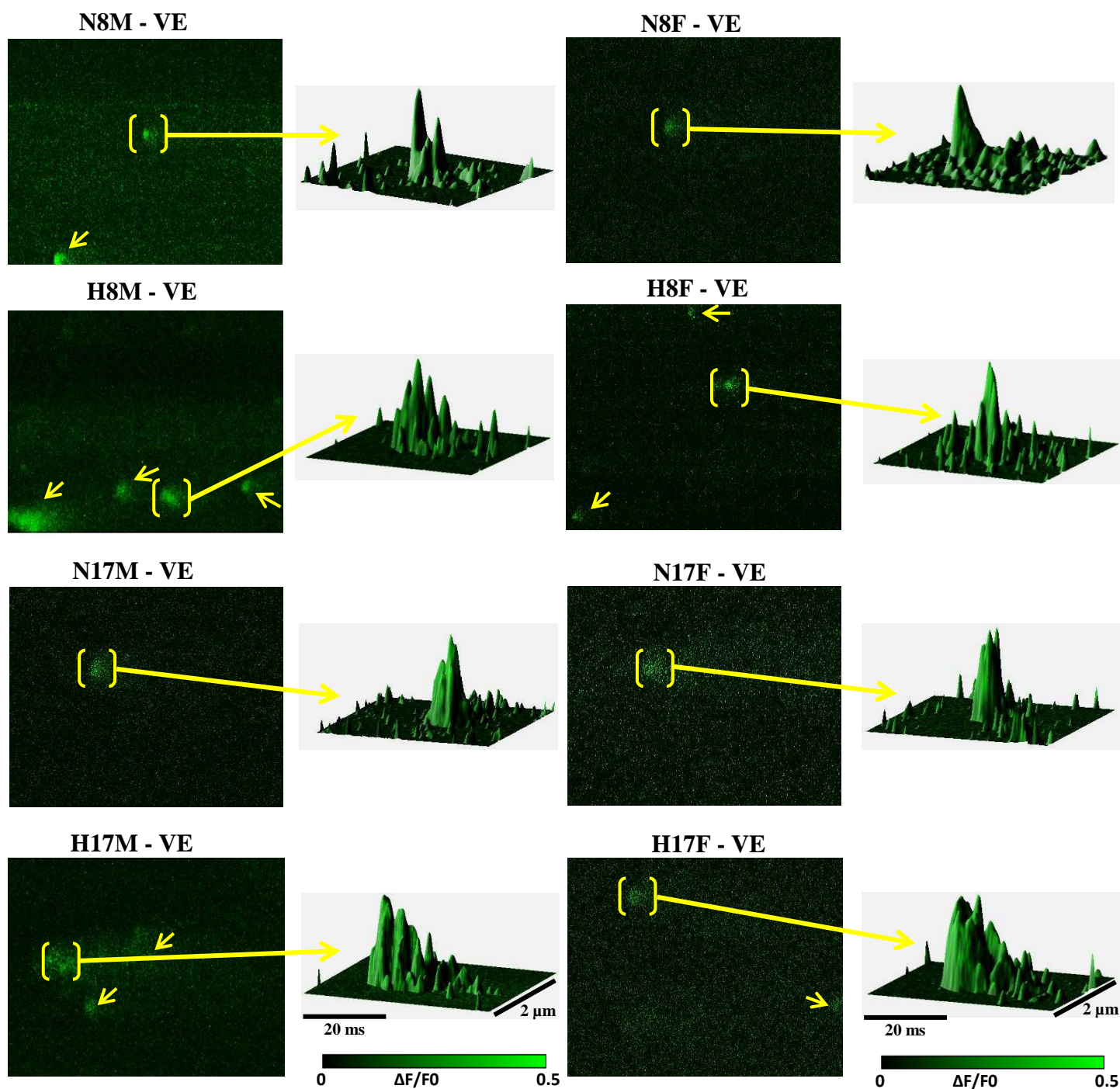


Figura 8. Registros típicos das imagens de fluorescência e as figuras representativas das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM. Setas amarelas indicam a ocorrência de sparks espontâneas de Ca^{2+} . VE= ventrículo esquerdo. N8M = normotenso controle 8 meses macho; N8F = normotenso controle 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso controle 17 meses macho; N17F = normotenso controle 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea.

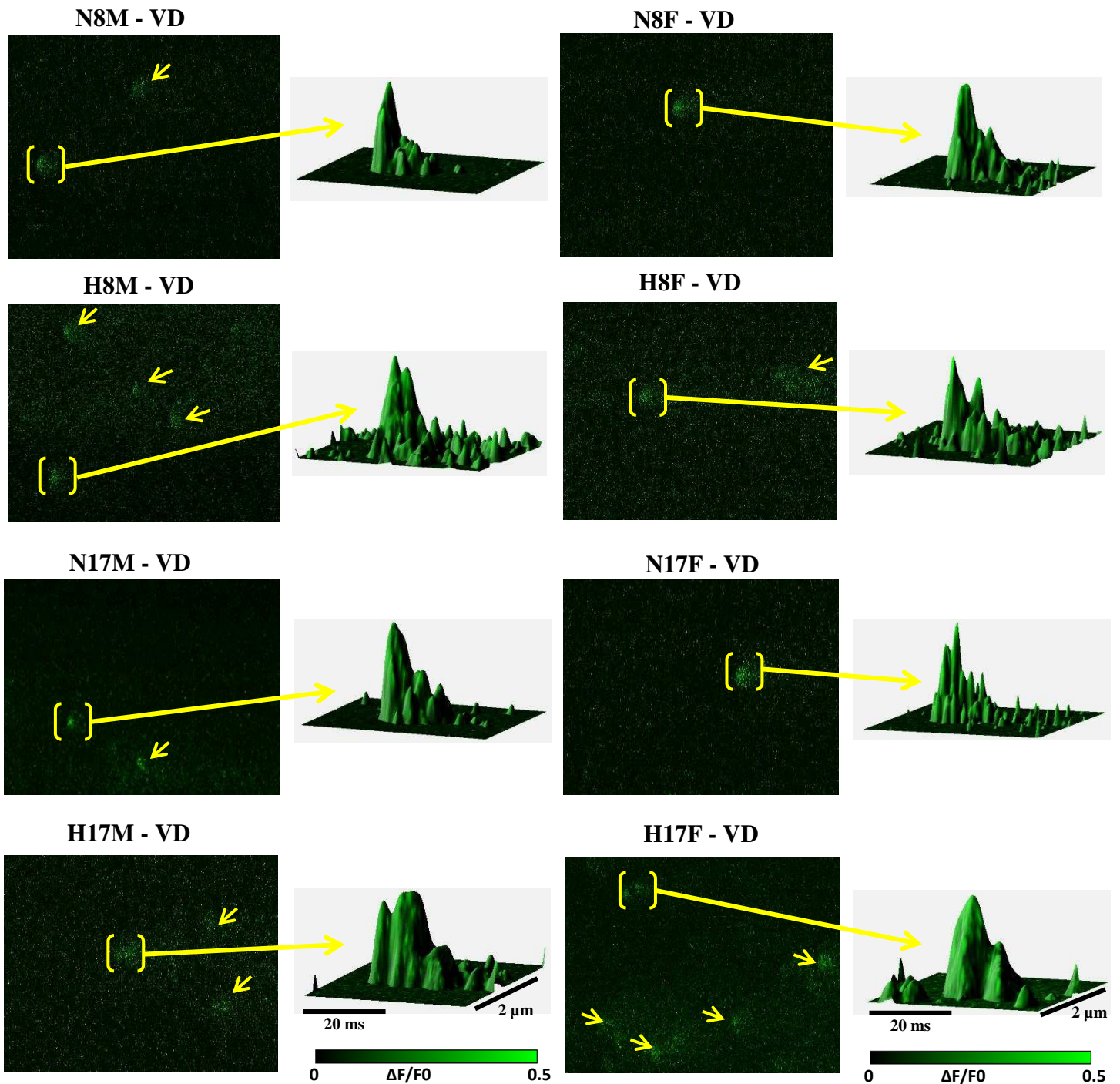


Figura 9. Registros típicos das imagens de fluorescência e as figuras representativas das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos isolados do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais, incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM. Setas amarelas indicam a ocorrência de sparks espontâneas de Ca^{2+} . VD= ventrículo direito. N8M = normotenso controle 8 meses macho; N8F = normotenso controle 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso controle 17 meses macho; N17F = normotenso controle 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea.

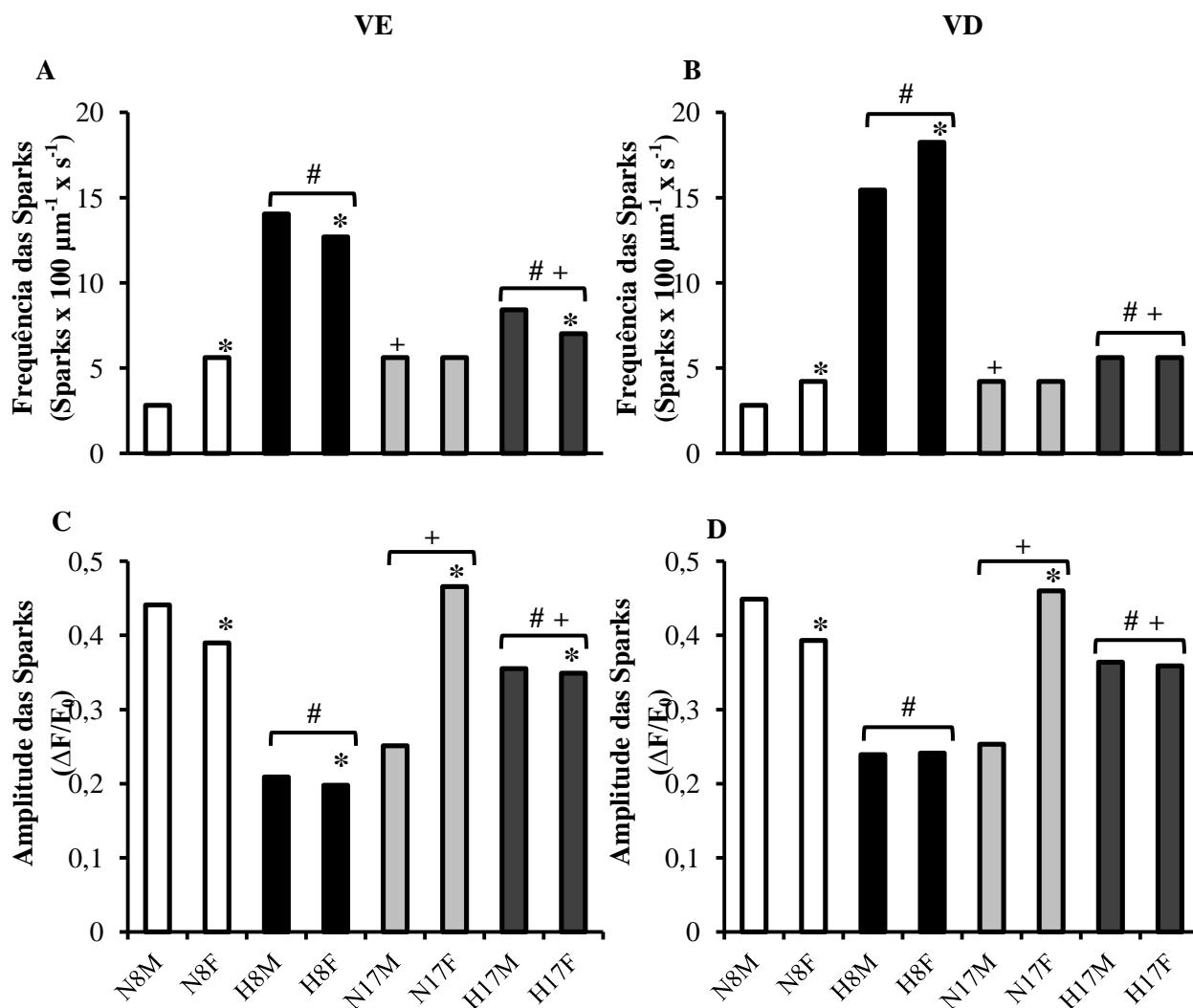


Figura 10. Medida das sparks espontâneas de Ca^{2+} dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos e hipertensos. (A e B) Frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} (sparks x $100\mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$); (C e D) Amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$). VE= ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea. Os dados são expressos como mediana. (#) = fator hipertensão: indica diferença em relação aos grupos normotensos. (+) = fator idade: indica diferença em relação aos grupos normotensos e hipertensos de 8 meses. (*) = fator sexo: indica diferença em relação aos machos. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Fator hipertensão: Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos apresentaram maior frequência e menor amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos animais normotensos, independentemente da idade. Todavia, os cardiomiócitos ventriculares dos machos hipertensos de 17 meses apresentaram maior

amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , quando comparados aos machos normotensos de 17 meses (Figura 10).

Fator idade: Como apresentado na figura 10, os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram menor frequência e maior amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 8 meses. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que os cardiomiócitos ventriculares dos ratos normotensos machos de 17 meses apresentaram maior frequência e menor amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos de 8 meses. Contudo, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos cardiomiócitos das fêmeas normotensas de 8 meses.

Fator sexo: Como apresentado na figura 10, os cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas apresentaram menor frequência e amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} do que os machos hipertensos, independentemente da idade. Todavia, os cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram maior frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} do que os cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 8 meses apresentaram maior frequência e menor amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade. Contudo, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} , comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade.

Em resumo: a hipertensão aumentou a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos ratos hipertensos em todas as idades estudadas. Entretanto, nos animais mais velhos este aumento foi menor. Os efeitos da hipertensão sobre a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} estavam menos proeminentes no VE das fêmeas hipertensas, independentemente da idade. Todavia, a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} estava aumentada nos cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 8 meses de idade, comparadas aos machos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que a hipertensão reduziu a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos ratos hipertensos de 8 meses, em ambos os sexos e nas fêmeas hipertensas de 17 meses, comparado aos seus respectivos controles normotensos. Em contraste, a hipertensão aumentou a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos machos hipertensos de 17 meses, comparado ao macho normotenso da mesma idade. Os ratos hipertensos mais

velhos apresentaram um aumento na amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} comparados com os ratos hipertensos mais jovens, em ambos os sexos. Os efeitos da hipertensão sob a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} estavam menos proeminentes no VE das fêmeas hipertensas independentemente da idade.

4.5- Medida da contratilidade celular:

As medidas da contratilidade celular foram realizadas em cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos ratos de todos os grupos experimentais.

Os resultados referentes às medidas da contratilidade celular estão apresentados na figura 11.



Figura 11. Medida da contratilidade celular dos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais normotensos e hipertensos. (A e B) Amplitude de contração (%c.c.r.); (C e D) Tempo para o pico de contração (ms); (E e F) Tempo para 50% do relaxamento (ms). VE = ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito. N8M = normotenso 8 meses macho; N8F = normotenso 8 meses fêmea; H8M = hipertenso 8 meses macho; H8F = hipertenso 8 meses fêmea; N17M = normotenso 17 meses macho; N17F = normotenso 17 meses fêmea; H17M = hipertenso 17 meses macho; H17F = hipertenso 17 meses fêmea. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. (#) = fator hipertensão: indica diferença em relação aos grupos normotensos. (+) = fator idade: indica diferença em relação aos grupos normotensos e hipertensos de 8 meses. (*) = fator sexo: indica diferença em relação aos machos. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Fator hipertensão: Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses de idade apresentaram menor amplitude de contração comparados aos animais normotensos da mesma idade. Em contraste, os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses de idade apresentaram maior amplitude de contração, quando comparados aos animais normotensos da mesma idade (Figura 11 A e B).

Como apresentado na figura 11 (C e D), os cardiomiócitos ventriculares dos machos hipertensos de 8 meses de idade apresentaram maior tempo para o pico de contração, comparados aos machos normotensos da mesma idade. Os cardiomiócitos do VD dos machos hipertensos de 17 meses de idade também apresentaram maior tempo para o pico de contração, comparados aos machos normotensos da mesma idade. Todavia, o tempo para o pico de contração foi menor nos cardiomiócitos ventriculares das fêmeas hipertensas comparados aos cardiomiócitos das fêmeas normotensas, independentemente da idade.

Como apresentado na figura 11 (E e F), os cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram menor tempo para 50% do relaxamento celular, comparados aos cardiomiócitos das fêmeas normotensas da mesma idade. Contudo, o tempo para 50% do relaxamento celular foi maior nos cardiomiócitos do VD dos machos hipertensos de 17 meses, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade.

Fator idade: Os cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior amplitude de contração, comparados aos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 8 meses. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares dos animais normotensos de 17 meses apresentaram menor amplitude de contração, comparados aos cardiomiócitos dos animais normotensos de 8 meses (Figura 11 A e B).

Como apresentado na figura 11 (C e D), os cardiomiócitos do VD dos animais hipertensos de 17 meses apresentaram maior tempo para o pico de contração, quando comparados aos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 8 meses. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que as fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior tempo para o pico de contração, comparados aos cardiomiócitos das fêmeas de 8 meses.

Como apresentado na figura 11 (E e F), os cardiomiócitos VD das fêmeas hipertensas de 17 meses apresentaram maior tempo para 50% do relaxamento celular, comparados aos cardiomiócitos das fêmeas hipertensas de 8 meses.

Fator sexo: os cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram menor amplitude de contração, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Em contraste, os cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 17 meses apresentaram maior amplitude de contração, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que, os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram menor amplitude de contração, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade (Figura 11 A e B).

Como apresentado na figura 11 (C e D), os cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram menor tempo para o pico de contração, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas normotensas de 17 meses apresentaram maior tempo para o pico de contração, comparados aos cardiomiócitos dos machos normotensos da mesma idade.

Como apresentado na figura 11 (E e F), os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas hipertensas de 8 meses apresentaram menor tempo para 50% do relaxamento celular, comparados aos cardiomiócitos dos machos hipertensos da mesma idade.

Em resumo: a hipertensão reduziu a amplitude de contração nos cardiomiócitos dos ratos hipertensos de 8 meses de idade e aumentou a amplitude de contração nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos de 17 meses, comparados aos seus respectivos controle normotensos. A hipertensão prolongou o tempo para o pico de contração nos cardiomiócitos dos ratos hipertensos machos de 8 meses e nos cardiomiócitos do VD dos ratos hipertensos machos de 17 meses, comparados aos seus respectivos controle normotensos. Os resultados do presente estudo ainda mostraram que a hipertensão reduziu o tempo para 50% do relaxamento celular nos cardiomiócitos do VD das fêmeas hipertensas de 8 meses, comparada as fêmeas normotensas da mesma idade. Os cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos mais velhos apresentaram um aumento na amplitude de contração e um prolongamento nos tempos para o pico de contração e para 50% do relaxamento celular (no VD), comparados aos cardiomiócitos dos ratos hipertensos mais jovens. Os efeitos da hipertensão sobre a amplitude de contração, tempos de contração e relaxamento celular estavam menos proeminentes nas fêmeas hipertensas de 8 meses.

4.6- Síntese dos principais resultados encontrados:

A síntese dos principais resultados encontrados no presente estudo está apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Síntese dos principais resultados encontrados.

Dimensões dos cardiomiócitos			Transiente de $[Ca^{2+}]_i$			Sparks espontâneas de Ca^{2+}		Contratilidade celular		
Comprimento	Largura	Volume	Amplitude	T. Pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$	T./50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$	Frequência das sparks	Amplitude das sparks	Amplitude de contração	T. Pico de contração	T. /50% relaxamento
↑ (VE e VD) fêmeas hipertensas 8 meses vs normotensas	↑ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↑ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↓ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↑ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↓ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↑ (VE e VD) hipertensos vs normotensos	↓ (VE e VD) hipertensos vs normotensos	↓ (VE e VD) hipertensos 8 meses vs normotensos	↑ (VE e VD) machos hipertensos vs machos normotensos	↓ VD fêmeas hipertensas 8 meses vs normotensas
↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs normotensos	↓ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↓ (VE e VD) fêmeas hipertensas vs machos hipertensos	↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs normotensos	↑ VD hipertensos 17 meses vs normotensos	↑ VD hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs normotensos	↓ (VE e VD) fêmeas hipertensas vs fêmeas normotensas	↑ VD machos hipertensos 17 meses vs machos normotensos
↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↓ (VE e VD) fêmeas hipertensas vs machos hipertensos		↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↓ VE hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ VD fêmeas hipertensas 17 meses vs machos	↓ VE fêmeas hipertensas vs machos	↓ VE fêmeas hipertensas vs machos	↑ (VE e VD) hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ VD hipertensos 17 meses vs hipertensos 8 meses	↑ VD fêmeas hipertensas 17 meses vs fêmeas hipertensas 8 meses
↓ (VE e VD) fêmeas hipertensas vs machos			↑ (VE e VD) fêmeas hipertensas 17 meses vs machos	↓ VE fêmeas hipertensas 17 meses vs machos				↓ VD fêmeas hipertensas 8 meses vs machos	↓ VE fêmeas hipertensas 8 meses vs machos	↓ (VE e VD) fêmeas hipertensas 8 meses vs machos
								↑ (VE e VD) fêmeas hipertensas 17 meses VS machos		

(↑) = indica aumento; (↓) = indica redução; (T.) = Tempo; VE = cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo; VD = cardiomiócitos isolados do ventrículo direito.

5- DISCUSSÃO:

5.1- Efeitos da hipertensão e diferenças entre os sexos nos parâmetros biométricos e dimensão celular nos animais hipertensos jovens e idosos.

Os valores da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais hipertensos no presente estudo foram em média 193 mmHg e 186 mmHg (nos ratos de 8 meses de idade, machos e fêmeas, respectivamente); 190 mmHg e 197 mmHg (nos ratos de 17 meses de idade, machos e fêmeas, respectivamente). Os valores da pressão arterial encontrados estão de acordo com o critério utilizado para o diagnóstico de hipertensão em ratos SHR, que corresponde à pressão arterial sistólica igual ou superior a 150 mmHg por um período superior a um mês, sem qualquer tipo de intervenção externa (Doggrell e Brown, 1998). Os resultados do presente estudo mostraram aumentos na PAS nos machos normotensos à medida que eles foram envelhecendo. Uma possível explicação para o aumento da PAS nos ratos idosos seria a hiperatividade do sistema nervoso simpático, que contribuiria para aumentar os valores de pressão arterial ao longo da vida. Nesse sentido, estudos têm demonstrado que o envelhecimento pode reduzir a atividade parassimpática para o nodo sinoatrial e aumentar a atividade simpática para o coração e sistema vascular (Eckberg et al., 1971; Mark, 1995). Desta forma, o aumento da liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático modifica o estado contrátil do músculo liso vascular, contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica e consequente aumento da PAS (Franchini et al., 1996; Virdis et al., 2011). Além disso, o envelhecimento pode promover o aumento da rigidez arterial através da maior deposição de colágeno, reduzindo a distensibilidade da parede arterial contribuindo para o aumento da PAS nos idosos (Burney e Bakris, 2009; Mosley e Lloyd-Jones, 2009; Virdis et al., 2011). Não encontramos diferenças entre os sexos nos valores de pressão arterial, independentemente da idade. Estes dados contrastam com estudos prévios que mostraram menores valores pressóricos nas fêmeas hipertensas em comparação aos machos de 2 meses (Ganten et al., 1989), de 1 a 4 meses (Chen e Meng, 1991) e de 3 a 21 meses de idade (Fukuda et al., 2004; Chan et al., 2011).

Os resultados do presente estudo mostraram que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) promoveu hipertrofia cardíaca através do aumento: no peso do coração, no peso relativo do coração e dos ventrículos nos ratos hipertensos em todas as idades estudadas. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que também

observaram o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica em ratos SHR, em diferentes idades (Bell et al., 2004; Weisser-Thomas et al., 2007; Alvarez et al., 2008; Chan et al., 2011). No nível celular, as análises morfométricas realizadas no presente estudo mostraram que a HAS aumentou a largura dos cardiomiócitos ventriculares nos ratos hipertensos de 8 meses. Contudo, não teve nenhum efeito sobre a largura dos cardiomiócitos dos animais hipertensos de 17 meses. Nossos resultados ainda mostraram que a HAS aumentou o comprimento celular nas fêmeas hipertensas de 8 meses e nos animais hipertensos de 17 meses. Observamos também, um aumento no volume dos cardiomiócitos ventriculares em todos os ratos hipertensos independentemente de outro fator.

O crescimento e desenvolvimento do coração estão associados à carga funcional imposta ao músculo cardíaco. Com o aumento da carga funcional devido à sobrecarga de pressão em um ambiente de hipertensão arterial, o coração trabalha mais do que sob condições normais (Anversa et al., 1990; Lakatta e Levy, 2003). Em resposta a este aumento crônico da carga, há um aumento inicial na massa do coração para normalizar o estresse que incide sobre a parede ventricular e permitir a função cardiovascular normal em repouso, “crescimento compensado” (Cooper e Tomanek, 1987; Sugden e Clerk, 1998; Hunter e Chien, 1999; Bernardo et al., 2010). Desta forma, o processo hipertensivo nos estágios iniciais (3º e 4º meses de idade) promove aumento no débito cardíaco com resistência periférica normal. Com a progressão da doença (após o 6º e 7º meses de idade), o débito cardíaco retorna aos níveis normais e a hipertrofia dos vasos sanguíneos provoca aumento na resistência periférica total, produzindo estresse sobre a parede ventricular esquerda, levando à hipertrofia do tipo concêntrica. Esta é caracterizada pelo aumento da espessura da parede ventricular através do aumento da largura dos cardiomiócitos com a formação de novos sarcômeros em paralelo e pela consequente redução da câmara cardíaca e do volume diastólico final (Pawlush et al., 1993; Doggrell e Brown, 1998; Bing et al., 2002; McMullen e Jennings, 2007). O aumento da sobrecarga de pressão sobre a parede ventricular induzida pela HAS, pode explicar o aumento na largura dos cardiomiócitos ventriculares encontrados nos animais hipertensos de 8 meses no presente estudo. Além disso, nossos resultados mostraram que a HAS promoveu aumento no comprimento dos cardiomiócitos nos animais de 17 meses de idade. Estudos prévios sobre os efeitos do envelhecimento em SHR utilizando análises ecocardiográficas mostraram que, ratos SHR machos apresentaram uma progressão de hipertrofia concêntrica para excêntrica com redução na espessura da

parede ventricular a partir do 15º mês de idade (Tsotetsi et al., 2001; Chan et al., 2011). Diversos modelos também mostraram aumentos no comprimento dos cardiomiócitos caracterizando hipertrofia excêntrica em animais SHR de 4 a 6 meses de idade (Brooksby et al., 1993; Kolwicz et al., 2009; Nguyen et al., 2016) em ratos e ratas SHHF – Spontaneously Hypertensive Heart Failure de 1 a 24 meses (Tamura et al., 1998; Tamura et al., 1999). Estes dois últimos estudos sugeriram que os aumentos no comprimento dos cardiomiócitos em função do processo hipertensivo progredem lentamente com o envelhecimento dos animais, entre 2 a 24 meses de idade, iniciando antes mesmo do aparecimento dos sinais e sintomas de insuficiência cardíaca. Estes dados vão de encontro aos nossos resultados, que sugeriram a presença de hipertrofia excêntrica nos animais hipertensos idosos mesmo antes que se estabelecesse a fase de insuficiência cardíaca.

O processo de envelhecimento somado à sobrecarga de pressão imposta pela HAS promove alterações no sistema cardiovascular como o aumento da rigidez arterial, aumento da pós-carga, aumento da massa ventricular, morte celular por apoptose ou necrose e posterior acúmulo de tecido fibroso (colágeno) com redução na complacência miocárdica (Anversa et al., 1990; Burgess et al., 2001; Lakatta e Levy, 2003; McMullen e Jennings, 2007). Com isso, a função cardíaca torna-se desequilibrada, progredindo para insuficiência cardíaca (McMullen e Jennings, 2007). O aumento no comprimento celular observado nos animais mais velhos no presente estudo, provavelmente se deu em decorrência do rearranjo estrutural dos cardiomiócitos como parte do processo de remodelamento para compensar o estresse exercido sobre a parede ventricular, na tentativa de manter a função contrátil do órgão conforme descreveram (Lakatta, 1999; Bernardo et al., 2010; Mill et al., 2011), em estudos similares.

A hipertrofia excêntrica refere-se ao aumento da massa cardíaca com aumento do volume da câmara ventricular (Grossman et al., 1975). Este tipo de hipertrofia é caracterizado pelo aumento do comprimento celular em função da maior síntese protéica e formação de novos sarcômeros em série, refletindo no aumento do volume celular como observado no presente estudo. A hipertrofia excêntrica patológica, geralmente está associada à redução da espessura das paredes ventriculares (Bernardo et al., 2010). No presente estudo, o envelhecimento reduziu a largura dos cardiomiócitos dos animais hipertensos. Além disso, nossos resultados mostraram que os efeitos da HAS sobre o comprimento, largura e volume dos cardiomiócitos estavam menos proeminentes nas fêmeas em comparação aos machos, independentemente da idade.

Estes dados estão de acordo com estudos que suportam a ideia de que os ratos SHR machos desenvolvem maiores hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular do que as fêmeas (Tamura et al., 1999). Resultados semelhantes foram descritos por estudos utilizando modelo animal de sobrecarga de pressão por bandagem aórtica (Douglas et al., 1998; Weinberg et al., 1999; Skavdahl et al., 2005). Os mecanismos moleculares que explicam o dimorfismo sexual são complexos e não são bem compreendidos (Babiker et al., 2002; Turgeon et al., 2004; Edwards, 2005; Mendelsohn e Karas, 2005; Luczak e Leinwand, 2009). Em geral, a literatura aponta um efeito cardioprotetor nas fêmeas na pré-menopausa, em comparação com os machos da mesma idade, mas esta proteção é abolida após a menopausa (Kannel, 2002; Mikkola e Clarkson, 2002; Wenger, 2002; Sullivan, 2003; Luczak e Leinwand, 2009). Assim, os hormônios sexuais (principalmente o estrógeno) têm participação fundamental nas propriedades cardioprotetoras nas fêmeas podendo explicar, pelo menos em parte, as diferenças sexuais no coração (Mendelsohn e Karas, 2005; Du et al., 2006; Luczak e Leinwand, 2009). Tanto os homens como as mulheres produzem estrógeno, no entanto, os níveis circulantes de estrógeno são 10-20 vezes menores nos homens (Luczak e Leinwand, 2009). O estrógeno é um hormônio esteróide, cujo mecanismo de ação clássico se dá pela ligação aos seus receptores intracelulares, tanto ao seu receptor alfa (RE α), quanto ao seu receptor beta (RE β). Esses receptores pertencem à superfamília de receptores hormonais nucleares, que ao formarem o complexo hormônio-receptor, passam a ativar diferentes fatores de transcrição gênica, estando envolvido em diversas cascatas de sinalização anti-hipertrofica (Bernardo et al., 2010). A expressão cardíaca de RE α é semelhante em ambos os sexos, enquanto que a expressão de RE β é maior no sexo masculino (Mahmoodzadehet al., 2006). Estudos com camundongos knockout indicaram que os RE β são importantes no desenvolvimento da hipertrofia patológica induzida por sobrecarga de pressão e em estudos com isquemia-reperfusão (Gabel et al., 2005; Pelzer et al., 2005; Skavdahl et al., 2005). Contudo, não é possível afirmar se estes mecanismos estão, de fato, envolvidos nas diferenças entre os sexos encontradas no presente estudo, entretanto, são mecanismos candidatos.

5.2- Efeitos da hipertensão na sinalização intracelular de Ca²⁺ e contratilidade dos cardiomiócitos dos animais hipertensos jovens e idosos.

Após observarmos que a hipertensão promoveu hipertrofia cardíaca nos animais

hipertensos em todas as idades estudadas, analisamos os efeitos da hipertensão e do envelhecimento sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, sparks espontâneas de Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos.

Perguntamos: de que forma a HAS somada ao envelhecimento alterariam os parâmetros contráteis e a sinalização intracelular de Ca^{2+} nos ratos hipertensos?

Sabe-se que o desenvolvimento do processo hipertensivo leva a um efeito inotrópico positivo compensatório iniciando após o 4º mês de idade no modelo SHR (Doggrell e Brown, 1998; Hasenfuss, 1998) até o gradativo aparecimento de disfunções no ciclo intracelular do Ca^{2+} e, conseqüente diminuição da função contrátil, culminando no aparecimento da insuficiência cardíaca após o 18º mês de idade (Conrad et al., 1991; Bing et al., 1995; Doggrell e Brown, 1998; Hasenfuss, 1998; Kapur et al., 2010). Estudos prévios relataram a ocorrência de anormalidades elétricas, mecânicas e no controle intracelular do Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares de ratos SHR, apontando que a hipertensão arterial pode alterar os mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação-contração (AEC) (Brooksby et al., 1993; Shorofsky et al., 1999; Mccrossan et al., 2004; Roman-Campos et al., 2012; Carneiro-Junior et al., 2013; Carneiro-Junior et al., 2014). Curiosamente, os resultados do presente estudo mostraram que a hipertensão reduziu a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos dos ratos jovens comparados aos respectivos controles normotensos. Esta alteração na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ refletiu precocemente no declínio da função contrátil dos cardiomiócitos ventriculares dos ratos mais jovens. Além disso, os resultados do presente estudo também mostraram prolongamento no tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e redução no tempo para 50% do decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos de 8 meses, comparados aos controles normotensos da mesma idade. Embora nossos resultados tenham divergido em relação a estudos prévios que apontaram um efeito inotrópico positivo compensatório em ratos SHR na faixa etária compreendida entre 6-9 meses de idade, (Shorofsky et al., 1999; Mccrossan et al., 2004), sabe-se que as alterações deletérias no ciclo intracelular do Ca^{2+} e contratilidade celular podem iniciar-se precocemente ainda na fase compensada da hipertensão (Bing et al., 1991; Weisser-Thomas et al., 2007; Kapur et al., 2010; Carneiro-Junior et al., 2013; Carneiro-Junior et al., 2014). Neste sentido, trabalhos anteriores indicaram um prolongamento no potencial de ação cardíaco com redução na contratilidade dos cardiomiócitos nos ratos SHR de 3 e 4 meses de idade (Weisser-Thomas et al., 2007), e um prolongamento no tempo de duração do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

nos cardiomiócitos dos ratos SHR de 7 e 9 meses de idade (Kapur et al., 2010).

Embora os nossos resultados não tenham mostrado os mecanismos inerentes a estas diferenças apresentadas, a literatura nos traz alguns mecanismos que aparecem como candidatos para tais mudanças: 1) diminuição da densidade da corrente repolarizante transitória de efluxo de K^+ (Ito) que prolongaria a duração do potencial de ação nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos SHR (Benitah et al., 1993; Hart, 1994; Roman-Campos et al., 2012); 2) a diminuição na rede de túbulos-T, provocando um aumento na distância entre os RyR2 e os receptores de diidropiridina (DHPR) que desaceleraria a taxa de liberação de Ca^{2+} do RS (Balijepalli et al., 2003); 3) a diminuição da captação de Ca^{2+} pelo RS em função da diminuição na atividade e expressão da SERCA2a prolongando a duração do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Hasenfuss, 1998; Dash et al., 2001; Kemi et al., 2008) e 4), o aumento da atividade dos canais NCX, compensando a deficiência na captação de Ca^{2+} para o RS promovendo maior saída de Ca^{2+} dos cardiomiócitos via NCX, reduzindo o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ e o tempo do relaxamento celular. Este quadro pode reduzir o conteúdo de Ca^{2+} do RS diminuindo a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a contratilidade celular (Bers, 2002; Kemi et al., 2008; Garcarena et al., 2009). Esses processos em conjunto contribuiriam para que o fluxo de Ca^{2+} seja menor e mais lento, com maior concentração de $[Ca^{2+}]_i$ durante a diástole. Contudo, com base apenas no presente estudo, não podemos afirmar se estes mecanismos estão realmente envolvidos nas alterações promovidas pela hipertensão no transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e contratilidade dos cardiomiócitos nos ratos hipertensos de 8 meses.

Na fase ativa do processo hipertensivo (iniciando por volta do 4º ao 6º mês de idade nos ratos SHR) se observa uma intensificação no fluxo de liberação de Ca^{2+} e na contratilidade celular para compensar o aumento da sobrecarga de pressão e manter o débito cardíaco em níveis normais, trata-se do “efeito inotrópico positivo”. Esse processo ocorre principalmente em função do aumento na atividade dos receptores de rianodina (RyR2) (Chen-Izu et al., 2007). Com a progressão da doença, a função contrátil diminui lentamente após o 18º mês de idade, culminando na fase de insuficiência cardíaca (Pfeffer et al., 1979; Conrad et al., 1991; Bing et al., 1995; Bing et al., 2002). Os resultados do presente estudo mostraram que os animais hipertensos de 17 meses de idade apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, com consequente aumento na amplitude de contração. Estes dados sugerem que os ratos hipertensos de 17 meses deste estudo ainda não entraram na fase de insuficiência

cardíaca, encontrando-se na fase compensada da doença. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que também encontraram um efeito inotrópico positivo nos ratos SHR entre 18 a 24 meses de idade (Bing et al., 1995; Weisser-Thomas et al., 2007).

Além do efeito inotrópico positivo encontrado nos animais hipertensos de 17 meses de idade, nossos resultados ainda mostraram que os cardiomiócitos do VD dos ratos hipertensos de 17 meses apresentaram prolongamento nos tempos para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (apenas nos machos) e no tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, com um consequente prolongamento dos tempos para o pico de contração e 50% do relaxamento celular, em comparação aos ratos hipertensos jovens. Resultados semelhantes foram observados em cardiomiócitos de ratos SHR idosos (Fares 2010), e ratos normotensos idosos (Zhu et al., 2005). Embora não tenhamos analisado os mecanismos moleculares inerentes a tais mudanças, estudos sobre os efeitos do envelhecimento indicam alterações deletérias na atividade da SERCA2a que podem explicar a lentificação do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e dos tempos de contração e relaxamento encontrados (Fares e Howlett, 2010). A atividade da SERCA2a é regulada principalmente pelo inibidor endógeno fosfolambam (FLB). Quando a FLB é fosforilada ela é liberada da SERCA2a, cessando assim o seu efeito inibidor e, consequentemente, aumentando a atividade de ATPase e captação do Ca^{2+} para o RS (Bers, 2002). O mecanismo de regulação via FLB envolve a fosforilação do resíduo de serina 16 (Ser-16) pela PKA, por uma via dependente de AMP cíclico e a fosforilação de um resíduo de treonina (Thr-17) pela proteína cinase II, ativada pela via da calmodulina (Kirchberger et al., 1974; Mattiazzi et al., 2005). Trabalhos anteriores apontam que a FLB é expressa em níveis elevados nos miócitos de ratos idosos (Lim et al., 1999). Além disso, a fosforilação da FLB pela PKA também diminui em função do processo de envelhecimento (Xu e Narayanan, 1998). Em conjunto, estes resultados sugerem que o processo de envelhecimento reduz a atividade da SERCA2a e em função disso, prolongaria os tempos para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e decaimento de $[Ca^{2+}]_i$.

5.2.1- Sparks espontâneas de Ca^{2+}

A liberação de Ca^{2+} do RS através dos RyR2 é a principal responsável pela geração do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos (Nayler et al., 1970; Fabiato, 1983). Estudos prévios tem investigado o impacto das doenças crônicas e do envelhecimento

sobre as sparks espontâneas de Ca^{2+} para estabelecer se as alterações na atividade dos RyR2 podem afetar os eventos de liberação de Ca^{2+} do RS (Zhu et al., 2005; Howlett et al., 2006; Kapur et al., 2010; Carneiro-Junior et al., 2014). Para verificarmos se a atividade dos RyR2 estava alterada em função da progressão do processo hipertensivo, avaliamos as características das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos isolados dos ventrículos dos animais de 8 e 17 meses. Nossos resultados mostraram que a hipertensão aumentou a frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos em comparação aos normotensos, em todas as idades estudadas. Contudo, este aumento estava menos proeminente nos cardiomiócitos dos ratos hipertensos mais velhos. Entretanto, observamos que a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} foi maior nos cardiomiócitos ventriculares dos animais hipertensos idosos em comparação aos mais jovens. Aumentos na frequência e na amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} podem aumentar a concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no sarcoplasma durante a diástole e reduzir o conteúdo de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, influenciando no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cheng e Lederer, 2008; Howlett, 2010).

As doenças cardíacas podem alterar as propriedades das sparks espontâneas de Ca^{2+} através das alterações nos mecanismos que controlam o ciclo do Ca^{2+} intracelular (Marks et al., 2002; Song et al., 2006; Cheng e Lederer, 2008; Shao et al., 2009; Kemi et al., 2012; Carneiro-Junior et al., 2014). Um dos principais problemas é a modificação da estrutura e atividade dos RyR2, que podem promover alterações na organização dos agrupamentos dos RyR2 (Marks, 2001; Cheng e Lederer, 2008). Nos estágios iniciais da hipertensão pode ocorrer aumento na atividade dos RyR2 (Chen-Izu et al., 2007). Os RyR2 estão associados às proteínas: FK506 bindingprotein, 12.6 (FKBP12.6), proteína cinase A (PKA), proteína cinase A de ancoragem (mAKAP), proteína fosfatase 1 (PP1) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Estas proteínas formam um complexo macromolecular que regulam a atividade dos RyR2 (Marks, 2001). O acoplamento entre os RyR2 é regulado pela proteína FKBP12.6, que se liga a quatro monômeros de RyR2 estabilizando o canal de liberação de Ca^{2+} , sendo importante na manutenção da atividade coordenada de liberação de Ca^{2+} durante a sístole e a diástole (Marks, 2001). O aumento na atividade dos RyR2 promovido pelo processo hipertensivo crônico pode provocar disfunções nos RyR2 e, conseqüentemente, nas proteínas associadas a este canal (Bers, 2002; Kemi et al., 2008). A dissociação da FKBP12.6 dos RyR2 é capaz de alterar significativamente as propriedades biofísicas dos canais, aumentando a sensibilidade dos RyR2 ao Ca^{2+} e, em função disso, aumentar a liberação de Ca^{2+}

devido à desestabilização dos RyR2 (Marks, 2001). A deficiência na FKBP12.6 promove o vazamento de Ca^{2+} do RS levando a arritmias (Lehnart et al., 2006). Em contraste, outro estudo prévio (Zissimopoulos et al., 2012) mostrou que não há envolvimento direto deste mecanismo no vazamento de Ca^{2+} , sugerindo que a FKBP12.6 pode não ser essencial para a estabilização dos RyR2 no rato. No entanto, mais estudos se fazem necessários para elucidar tais mecanismos.

Outra proteína envolvida na regulação da liberação de Ca^{2+} pelos RyR2s é a calcequestrina (CASQ2). A CASQ2 se liga ao RyR2 formando um complexo de liberação de Ca^{2+} no RS. A CASQ2 modula a função dos RyR2 da seguinte maneira: quando a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ é baixa, a CASQ2 se liga às proteínas triadina e/ou junctina na membrana do RS e inibe a atividade dos RyR2. Com a restauração da $[\text{Ca}^{2+}]$ no RS, aumentos na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ inibe a ligação da CASQ2 com as proteínas da membrana do RS, aumentando a atividade dos RyR2 (Gyorke e Terentyev, 2008). A deficiência na CASQ2 pode aumentar a sensibilidade dos RyR2s ao Ca^{2+} e, conseqüentemente, aumentar a frequência de liberação de Ca^{2+} do RS em baixas concentrações de Ca^{2+} no citosol (Stevens et al., 2009). Embora o presente estudo não tenha avaliado estas proteínas, tais mecanismos podem estar envolvidos nas alterações observadas nas sparks espontâneas de Ca^{2+} nos animais hipertensos, jovens e idosos.

5.3- Diferenças entre os sexos na sinalização intracelular de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e contratilidade dos cardiomiócitos dos animais SHR jovens e idosos.

É aceito na literatura que ratos SHR machos apresentam sintomas de insuficiência cardíaca aproximadamente aos 16-18 meses de idade, enquanto as fêmeas permanecem assintomáticas até os 22 meses. Os machos SHR desenvolvem disfunção ventricular esquerda e hipertrofia dos cardiomiócitos mais intensa do que as fêmeas (Tamura et al., 1999). Também é bem estabelecido na literatura que o risco de doença cardiovascular é inferior nas mulheres na pré-menopausa do que nos homens da mesma idade, sendo que o risco aumenta acentuadamente após a menopausa (Murphy e Steenbergen, 2007; Bhupathy et al., 2010). Portanto, as diferenças sexuais no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sparks espontâneas de Ca^{2+} e contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares de ratos SHR podem auxiliar no entendimento desses dados.

Os resultados do presente estudo mostraram que a hipertensão arterial somada ao envelhecimento promoveram alterações deletérias na sinalização intracelular de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

e na contratilidade dos cardiomiócitos dos ratos SHR. Diante deste quadro, será que tais alterações aconteceram de maneira distinta entre machos e fêmeas?

O presente estudo encontrou diferenças entre os sexos na sinalização intracelular de $[Ca^{2+}]_i$, e na contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares dos ratos hipertensos de 8 e 17 meses de idade. Nossos resultados mostraram que os cardiomiócitos ventriculares das fêmeas hipertensas de 17 meses apresentaram maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ comparado com os machos hipertensos da mesma idade. Estes aumentos refletiram numa maior amplitude de contração nos cardiomiócitos ventriculares das ratas hipertensas idosas comparadas aos machos hipertensos da mesma idade. Não houve diferença entre os sexos para este parâmetro nos animais hipertensos mais jovens.

É aceito na literatura que os hormônios sexuais são possíveis responsáveis por boa parte das diferenças globais relacionadas ao sexo, embora os mecanismos ainda não sejam totalmente compreendidos (Du et al., 2006). Sabe-se também, que as ratas SHR apresentam diminuição dos níveis de estradiol e aumento da testosterona a partir dos 12 meses de idade; com alcance de níveis não tituláveis de estradiol a partir de 18 meses de idade, compatível com o estado de menopausa (Fortepiani et al., 2003). Evidências experimentais sugerem que o estrógeno tem ação moduladora sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e sobre a sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} (Raddino et al., 1986; Wattanapermpool, 1998; Wattanapermpool et al., 2000). Estas variáveis constituem um dos mecanismos básicos pelos quais a força contrátil é regulada (Raddino et al., 1986; Wattanapermpool, 1998; Wattanapermpool et al., 2000). Neste sentido, Curl et al., (2001, 2003) mostraram que a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ estava reduzida e o tempo de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ era mais lento nos cardiomiócitos das ratas Wistar de 3 meses de idade em comparação com os machos da mesma idade. Estes autores não observaram mais estas diferenças quando compararam cardiomiócitos das fêmeas ovariectomizadas com os machos; entretanto, as diferenças foram restabelecidas quando as ratas ovariectomizadas foram tratadas com suplementação de estrógeno (Curl et al., 2001; Curl et al., 2003). Estudos prévios indicaram que o estrógeno suprime a corrente de Ca^{2+} pelo canal do tipo L (I_{CaL}) (Grohe et al., 1996; Meyer et al., 1998), embora outros estudos não tenham observado tais efeitos sobre a I_{CaL} (Farrell et al., 2010; Fares et al., 2012). Contudo, estes últimos autores mostraram que apesar de não terem observado os efeitos do estrógeno sobre a (I_{CaL}), a liberação de Ca^{2+} do RS através dos RyR2 foi maior em ratas ovariectomizadas. Estes dados vão ao encontro de outros estudos que sugerem que reduções nos níveis de

estrogênio podem aumentar a atividade dos RyR2 e, em consequência disso, aumentar a liberação de Ca^{2+} do RS nos cardiomiócitos das fêmeas. Este aumento acontece em função da elevação da atividade da PKA, uma das proteínas responsável pela regulação dos RyR2 (Kravtsov et al., 2007; Parks et al., 2014).

Não há consenso na literatura sobre os mecanismos envolvidos nas diferenças sexuais no AEC e, portanto, mais estudos precisam ser realizados. Além disso, até a presente data não encontramos trabalhos que abordassem as diferenças entre os sexos relacionados com o processo de envelhecimento no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]$ e sparks espontâneas de Ca^{2+} em ratos SHR. Contudo, um caminho interessante a ser considerado para regulação do AEC em cardiomiócitos são os monofosfatos cíclico de adenosina (cAMP) e a PKA (Bers, 2002; Parks et al., 2014). Estas proteínas fosforilam vários componentes do AEC, causando alterações inotrópicas e lusitrópicas no coração (Bers, 2001 e 2002, Zalket al., 2007). Após a ativação do receptor β -adrenérgico, a enzima adenilil-ciclase aumenta a conversão de ATP em cAMP, que é responsável por ativar a PKA (Bers, 2002). A PKA fosforila vários componentes dos mecanismos do AEC dentre eles o RyR2, FLB, SERCA2a e NCX promovendo alterações no ciclo intracelular do Ca^{2+} e no ciclo de contração-relaxamento celular (Bers, 2002). Desta forma, é possível que modificações na via cAMP/PKA em função do processo de envelhecimento possa elevar os níveis de cAMP circulantes nas ratas SHR fêmeas e, como consequência, aumentar a atividade da PKA que, por sua vez, promoveria maior fosforilação dos RyR2 aumentando sua atividade (Kravtsov et al., 2007; Parks et al., 2014). Com isso, este mecanismo torna-se candidato para explicar as maiores amplitudes de transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de contração encontrados nos cardiomiócitos ventriculares das fêmeas hipertensas de 17 meses do presente estudo.

Curiosamente, nossos resultados mostraram que os tempos para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tempo para o pico de contração e para 50% do relaxamento celular, foram menores nos cardiomiócitos das fêmeas hipertensas mais jovens em comparação aos machos hipertensos da mesma idade. Não houve diferença entre os sexos para estes parâmetros nos ratos hipertensos idosos. Estes resultados indicam um importante efeito cardioprotetor nas fêmeas hipertensas jovens, uma vez que o prolongamento do tempo do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido pela hipertensão estava menos proeminente nas fêmeas hipertensas de 8 meses em comparação aos machos hipertensos da mesma idade. Até a presente data, este é o primeiro estudo que abordou as diferenças entre os sexos para estes parâmetros em ratos SHR. Entretanto, estudos

com ratos e ratas jovens submetidos à indução de diabetes mellitus por streptozotocina, mostraram que os efeitos do diabetes sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, bem como as proteínas envolvidas na regulação da homeostase intracelular do Ca^{2+} estavam atenuados nos cardiomiócitos das fêmeas, em comparação aos machos (Zhong et al., 2003; Yaras et al., 2007). Estes autores ainda mostraram que o diabetes reduziu a expressão da SERCA2a e do seu inibidor FLB, aumentou a expressão da miosina de cadeia pesada (β -MCP) e aumentou a fosforilação dos RyR2. Contudo, os aumentos nestas proteínas induzidos pela doença foram menores nas fêmeas diabéticas comparadas aos machos. Entretanto, os mecanismos subjacentes a estas mudanças ainda não foram esclarecidos.

Estudos anteriores apontam que sobrecarga de pressão promovida pelo processo hipertensivo crônico também reduz a atividade e expressão da SERCA2a (Dash et al., 2001; Bers, 2002) e promove a reexpressão da β -MCP que possui menor atividade ATPásica. Como resultado, os cardiomiócitos reduzem a velocidade de encurtamento e tem a capacidade de relaxamento prejudicada, o que contribuiria para as disfunções contráteis cardíacas (Palmer, 2005; Mill et al., 2011). Assim, especulamos que um menor efeito deletério da hipertensão na atividade da SERCA2a, bem como menor expressão de β -MCP, podem estar envolvidos nas diferenças entre os sexos e serem responsáveis, pelo menos em parte, pelos menores tempos para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e de contração, e menor tempo para 50% do relaxamento celular nos cardiomiócitos das fêmeas hipertensas de 8 meses de idade, em comparação aos machos hipertensos da mesma idade.

5.3.1- Diferenças entre os sexos e Sparks espontâneas de Ca^{2+}

O estresse imposto pela hipertensão crônica promove alterações na atividade dos RyR2 culminando no aumento da frequência de liberação das sparks espontâneas de Ca^{2+} do RS (Marks et al., 2002; Cheng e Lederer, 2008). Em condições normais, os RyR2 não são ativados pelas sparks espontâneas de Ca^{2+} . Entretanto, quando acontece sobrecarga de Ca^{2+} no sarcoplasma ou no RS, as unidades liberadoras são ativadas e começam a liberar mais sparks de Ca^{2+} . Estas liberações múltiplas e sincronizadas de sparks de Ca^{2+} são denominadas “sparks compostos”. Os sparks compostos podem levar a uma propagação sincronizada de sparks, evoluindo para uma onda de Ca^{2+} que podem produzir extra-sístoles (Cheng e Lederer, 2008). Os fatores para que aconteça esta

propagação de sparks compostos incluem desde maior concentração de $[Ca^{2+}]$ extracelular ou no RS, bem como, maior frequência e amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} (Cheng e Lederer, 2008). Os resultados do presente estudo mostraram que, o processo hipertensivo somado ao envelhecimento, aumentaram tanto a frequência quanto a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos ratos hipertensos. Diante deste fato, uma pergunta se faz necessária: será que este efeito deletério se deu de forma distinta entre os sexos?

Nossos resultados mostraram que, os aumentos induzidos pela HAS na amplitude e na frequência das sparks espontâneas de Ca^{2+} foram menores nos cardiomiócitos do VE das fêmeas hipertensas em comparação aos machos, independentemente da idade. Estes resultados sugerem um importante efeito cardioprotetor nas fêmeas hipertensas, atenuando os efeitos da HAS sobre a liberação espontânea de Ca^{2+} nos cardiomiócitos dos ratos SHR. Até a presente data, não encontramos registros na literatura que mostrassem as diferenças entre os sexos nas sparks espontâneas de Ca^{2+} , nos cardiomiócitos ventriculares de ratos SHR jovens e idosos. Em conformidade com o presente estudo, trabalhos anteriores utilizando ratos e camundongos normotensos também demonstraram menor amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos das fêmeas (Farrell et al., 2010; Parks et al., 2014). Estes resultados também foram observados em animais diabéticos (Zhong et al., 2003; Yaras et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos nas diferenças sexuais nas sparks espontâneas de Ca^{2+} ainda não são bem compreendidos. Entretanto, é provável que o dimorfismo sexual na liberação de Ca^{2+} do RS seja atribuído, pelo menos em parte, aos menores níveis basais de cAMP encontrados nos cardiomiócitos das fêmeas. Os níveis de cAMP são regulados pela enzima fosfodiesterase (PDE) sendo responsável pela hidrólise do cAMP (Maurice et al., 2003; Zaccolo, 2011). Um estudo recente de Parks e colaboradores (2014), investigou o dimorfismo sexual na liberação de Ca^{2+} do RS e a participação da via cAMP/PKA na regulação deste mecanismo nos cardiomiócitos de camundongos C57BL. Os autores observaram que os cardiomiócitos das fêmeas têm níveis basais de cAMP mais baixos em comparação aos machos, devido à maior expressão da enzima reguladora fosfodiesterase (PDE4B). Neste contexto, menores níveis de cAMP podem atenuar a atividade da PKA levando a menor fosforilação dos RyR2 e como consequência, reduzir a liberação de Ca^{2+} do RS nos cardiomiócitos das fêmeas (Kravtsov et al., 2007; Parks et al., 2014).

6- CONCLUSÃO:

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- ✓ A hipertensão arterial provocou hipertrofia cardíaca nos animais hipertensos em todas as idades estudadas. O processo de envelhecimento intensificou a hipertrofia nos animais hipertensos idosos.
- ✓ A hipertensão aumentou a largura dos cardiomiócitos ventriculares nos animais hipertensos jovens, o comprimento dos cardiomiócitos nos animais hipertensos idosos e o volume celular nos animais hipertensos de 8 e 17 meses.
- ✓ Os valores de dimensão celular (comprimento, largura e volume) estavam menos proeminentes nas fêmeas hipertensas, independentemente de outro fator.
- ✓ O envelhecimento somado ao processo hipertensivo aumentou as amplitudes do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e de contração nos animais SHR.
- ✓ O envelhecimento somado ao processo hipertensivo prolongou o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos dos animais SHR e prolongou o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos do VD dos animais SHR.
- ✓ O prolongamento do tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela hipertensão foi menos proeminente no VE das fêmeas de 8 meses e no VD das fêmeas de 17 meses;
- ✓ O envelhecimento somado ao processo hipertensivo prolongou os tempos para o pico de contração e 50% do relaxamento, nos cardiomiócitos do VD dos animais SHR;
- ✓ Os efeitos da hipertensão sobre os tempos de contração e relaxamento celular foram menos proeminentes nas fêmeas hipertensas de 8 meses de idade, comparado com os machos da mesma idade.
- ✓ O envelhecimento somado ao processo hipertensivo aumentou a frequência e a amplitude das sparks espontâneas de Ca^{2+} nos cardiomiócitos dos animais SHR.
- ✓ Os efeitos do envelhecimento somados ao processo hipertensivo sobre as sparks espontâneas de Ca^{2+} foram menos proeminentes nas fêmeas hipertensas, comparadas com os machos.

7- REFERÊNCIAS

Abete, P., Ferrara, N., Cioppa, A., Ferrara, P., Bianco, S., Calabrese, C., Napoli, C., and Rengo, F. (1996). The role of aging on the control of contractile force by Na(+)-Ca²⁺ exchange in rat papillary muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51, M251-259.

Alvarez, M.C., Caldiz, C., Fantinelli, J.C., Garciarena, C.D., Console, G.M., Chiappe de Cingolani, G.E., and Mosca, S.M. (2008). Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens Res* 31, 1465-1476.

Amanuma, S., Sekiguchi, M., Ogasawara, S., Honda, M., and Hosoda, S. (1994). Biventricular endomyocardial biopsy findings in essential hypertension of graded severity. *Postgrad Med J* 70 Suppl 1, S67-71.

Andrade, S., SR, S., AS, B., PS, C., CL, S., and DC, M. (2015). Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiol Serv Saúde* 24, 297-304.

Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Meggs, L.G., and Capasso, J.M. (1990). Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 67, 871-885.

Anversa, P., Vitali-Mazza, L., Gandolfi, A., and Loud, A.V. (1975). Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. A light microscopic study. *Lab Invest* 33, 125-129.

Assayag, P., D, C.H., Marty, I., de Leiris, J., Lompre, A.M., Boucher, F., Valere, P.E., Lortet, S., Swynghedauw, B., and Besse, S. (1998). Effects of sustained low-flow ischemia on myocardial function and calcium-regulating proteins in adult and senescent rat hearts. *Cardiovasc Res* 38, 169-180.

Babiker, F.A., De Windt, L.J., van Eickels, M., Grohe, C., Meyer, R., and Doevendans, P.A. (2002). Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 53, 709-719.

Balijepalli, R.C., Lokuta, A.J., Maertz, N.A., Buck, J.M., Haworth, R.A., Valdivia, H.H., and Kamp, T.J. (2003). Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 59, 67-77.

Barretto, A.C.P., and Wajngarten, M. (1998). Insuficiência cardíaca nos idosos. *Arq Bras Cardiol* 71.

Bassani, J.W., Bassani, R.A., and Bers, D.M. (1994). Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-293.

- Bell, D., Kelso, E.J., Argent, C.C., Lee, G.R., Allen, A.R., and McDermott, B.J. (2004). Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Pathol* 13, 71-78.
- Benitah, J.P., Gomez, A.M., Bailly, P., Da Ponte, J.P., Berson, G., Delgado, C., and Lorente, P. (1993). Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* 469, 111-138.
- Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128, 191-227.
- Bernhard, D., and Laufer, G. (2008). The aging cardiomyocyte: a mini-review. *Gerontology* 54, 24-31.
- Berridge, M.J. (2006). Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- Bers, D.M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23-49.
- Bhupathy, P., Haines, C.D., and Leinwand, L.A. (2010). Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond)* 6, 77-95.
- Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Sen, S., Perreault, C.L., and Morgan, J.P. (1991). Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res* 68, 1390-1400.
- Bing, O.H., Brooks, W.W., Robinson, K.G., Slawsky, M.T., Hayes, J.A., Litwin, S.E., Sen, S., and Conrad, C.H. (1995). The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 27, 383-396.
- Bing, O.H., Conrad, C.H., Boluyt, M.O., Robinson, K.G., and Brooks, W.W. (2002). Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* 7, 71-88.
- Boluyt, M.O., Bing, O.H., and Lakatta, E.G. (1995). The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* 16 Suppl N, 19-30.
- Boluyt, M.O., O'Neill, L., Meredith, A.L., Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Crow, M.T., and Lakatta, E.G. (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 75, 23-32.

Brooksby, P., Levi, A.J., and Jones, J.V. (1993). Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 27, 1268-1277.

Burgess, M.L., McCrea, J.C., and Hedrick, H.L. (2001). Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. *Mech Ageing Dev* 122, 1739-1756.

Burney, B.O., and Bakris, G.L. (2009). Hypertension and its management in the elderly. *Semin Nephrol* 29, 604-609.

Cannell, M.B., Cheng, H., and Lederer, W.J. (1994). Spatial non-uniformities in $[Ca^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys J* 67, 1942-1956.

Cannell, M.B., and Kong, C.H. (2012). Local control in cardiac E-C coupling. *J Mol Cell Cardiol* 52, 298-303.

Capasso, J.M., Fitzpatrick, D., and Anversa, P. (1992). Cellular mechanisms of ventricular failure: myocyte kinetics and geometry with age. *Am J Physiol* 262, H1770-1781.

Carneiro-Junior, M.A. (2009). Treinamento físico de baixa intensidade e destreinamento: avaliação das propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos espontaneamente hipertensos. In *Mestrado em Educação Física (Viçosa MG, Universidade Federal de Viçosa)*.

Carneiro-Junior, M.A. (2013). Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos. In *Fisiologia Cardiovascular (Vitória ES, Universidade Federal do Espírito Santo)*.

Carneiro-Junior, M.A., Primola-Gomes, T.N., Quintao-Junior, J.F., Drummond, L.R., Lavorato, V.N., Drummond, F.R., Felix, L.B., Oliveira, E.M., Cruz, J.S., Natali, A.J., et al. (2013). Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol* (1985) 115, 107-115.

Carneiro-Junior, M.A., Quintao-Junior, J.F., Drummond, L.R., Lavorato, V.N., Drummond, F.R., Amadeu, M.A., Oliveira, E.M., Felix, L.B., Cruz, J.S., Mill, J.G., et al. (2014). Effect of exercise training on Ca^{2+} release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 0, 0.

Chan, V., Fenning, A., Levick, S.P., Loch, D., Chunduri, P., Iyer, A., Teo, Y.L., Hoey, A., Wilson, K., Burstow, D., et al. (2011). Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 57, 469-478.

Chen-Izu, Y., Chen, L., Banyasz, T., McCulle, S.L., Norton, B., Scharf, S.M., Agarwal, A., Patwardhan, A., Izu, L.T., and Balke, C.W. (2007). Hypertension-induced

remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3301-3310.

Chen, Y.F., and Meng, Q.C. (1991). Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 48, 85-96.

Cheng, H., Lederer, M.R., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1996). Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 270, C148-159.

Cheng, H., and Lederer, W.J. (2008). Calcium sparks. *Physiol Rev* 88, 1491-1545.

Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744.

Cheng, H., Song, L.S., Shirokova, N., Gonzalez, A., Lakatta, E.G., Rios, E., and Stern, M.D. (1999). Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J* 76, 606-617.

Colan, S.D. (1997). Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiol Clin* 15, 355-372.

Conrad, C.H., Brooks, W.W., Robinson, K.G., and Bing, O.H. (1991). Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol* 260, H136-145.

Cooper, G.t., and Tomanek, R.J. (1987). Model dependent behaviour of pressure hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res* 21, 342-351.

Curl, C.L., Wendt, I.R., Canny, B.J., and Kotsanas, G. (2003). Effects of ovariectomy and 17 beta-oestradiol replacement on $[Ca^{2+}]_i$ in female rat cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 489-494.

Curl, C.L., Wendt, I.R., and Kotsanas, G. (2001). Effects of gender on intracellular. *Pflugers Arch* 441, 709-716.

Czubryt, M.P., Espira, L., Lamoureux, L., and Abrenica, B. (2006). The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 93-109.

Dash, R., Frank, K.F., Carr, A.N., Moravec, C.S., and Kranias, E.G. (2001). Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1345-1353.

Dibb, K.M., Eisner, D.A., and Trafford, A.W. (2007). Regulation of systolic $[Ca^{2+}]_i$ and cellular Ca^{2+} flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca^{2+} , L-type Ca^{2+} current and diastolic $[Ca^{2+}]_i$. *J Physiol* 585, 579-592.

Doggrell, S.A., and Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 39, 89-105.

- Douglas, P.S., Katz, S.E., Weinberg, E.O., Chen, M.H., Bishop, S.P., and Lorell, B.H. (1998). Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 32, 1118-1125.
- Du, X.J., Fang, L., and Kiriazis, H. (2006). Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 111, 434-475.
- Eckberg, D.L., Drabinsky, M., and Braunwald, E. (1971). Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med* 285, 877-883.
- Edwards, D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335-376.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14.
- Fabiato, A., and Fabiato, F. (1978). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci* 307, 491-522.
- Fares, E., and Howlett, S.E. (2010). Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 1-7.
- Fares, E., Parks, R.J., Macdonald, J.K., Egar, J.M., and Howlett, S.E. (2012). Ovariectomy enhances SR Ca(2)(+) release and increases Ca(2)(+) spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 32-42.
- Farrell, S.R., and Howlett, S.E. (2007). The effects of isoproterenol on abnormal electrical and contractile activity and diastolic calcium are attenuated in myocytes from aged Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev* 128, 566-573.
- Farrell, S.R., Ross, J.L., and Howlett, S.E. (2010). Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H36-45.
- Fortepiani, L.A., Zhang, H., Racusen, L., Roberts, L.J., 2nd, and Reckelhoff, J.F. (2003). Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41, 640-645.
- Franchini, K.G., Moreira, E.D., Ida, F., and Krieger, E.M. (1996). Alterations in the cardiovascular control by the chemoreflex and the baroreflex in old rats. *Am J Physiol* 270, R310-313.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., and Ramesh, V. (1999). Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J* 77, 1528-1539.

Froehlich, J.P., Lakatta, E.G., Beard, E., Spurgeon, H.A., Weisfeldt, M.L., and Gerstenblith, G. (1978). Studies of sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in young adult and aged rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 10, 427-438.

Fukuda, S., Tsuchikura, S., and Iida, H. (2004). Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm. *Exp Anim* 53, 67-72.

Gabel, S.A., Walker, V.R., London, R.E., Steenbergen, C., Korach, K.S., and Murphy, E. (2005). Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38, 289-297.

Ganten, U., Schroder, G., Witt, M., Zimmermann, F., Ganten, D., and Stock, G. (1989). Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens* 7, 721-726.

Garciaarena, C.D., Pinilla, O.A., Nolly, M.B., Laguens, R.P., Escudero, E.M., Cingolani, H.E., and Ennis, I.L. (2009). Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 53, 708-714.

Ghio, S., Gavazzi, A., Campana, C., Inserra, C., Klersy, C., Sebastiani, R., Arbustini, E., Recusani, F., and Tavazzi, L. (2001). Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37, 183-188.

Gottdiener, J.S., Gay, J.A., Maron, B.J., and Fletcher, R.D. (1985). Increased right ventricular wall thickness in left ventricular pressure overload: echocardiographic determination of hypertrophic response of the "nonstressed" ventricle. *J Am Coll Cardiol* 6, 550-555.

Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Meyer, R., Linz, K.W., Karas, R.H., and Vetter, H. (1996). Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids* 61, 201-204.

Grossman, W., Jones, D., and McLaurin, L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64.

Guatimosim, S., Dilly, K., Santana, L.F., Saleet Jafri, M., Sobie, E.A., and Lederer, W.J. (2002). Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)]_i transient. *J Mol Cell Cardiol* 34, 941-950.

Gyorke, I., and Gyorke, S. (1998). Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites. *Biophys J* 75, 2801-2810.

Gyorke, S., and Terentyev, D. (2008). Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* 77, 245-255.

Haddad, F., Doyle, R., Murphy, D.J., and Hunt, S.A. (2008). Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* 117, 1717-1731.

Hart, G. (1994). Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 28, 933-946.

Hasenfuss, G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 39, 60-76.

Houser, S.R., Piacentino, V., 3rd, and Weisser, J. (2000). Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 32, 1595-1607.

Howlett, S.E. (2010). Age-associated changes in excitation-contraction coupling are more prominent in ventricular myocytes from male rats than in myocytes from female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H659-670.

Howlett, S.E., Grandy, S.A., and Ferrier, G.R. (2006). Calcium spark properties in ventricular myocytes are altered in aged mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1566-1574.

Hunter, J.J., and Chien, K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341, 1276-1283.

Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Sakai, S., Kobayashi, T., Fujii, N., Miyazaki, H., Matsuda, M., and Yamaguchi, I. (2001). Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R2029-2036.

Imahashi, K., London, R.E., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2004). Male/female differences in intracellular Na⁺ regulation during ischemia/reperfusion in mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 37, 747-753.

Isenberg, G., Borschke, B., and Rueckschloss, U. (2003). Ca²⁺ transients of cardiomyocytes from senescent mice peak late and decay slowly. *Cell Calcium* 34, 271-280.

Janczewski, A.M., and Lakatta, E.G. (2010). Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev* 15, 431-445.

Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beuckelmann, D.J., Steinbeck, G., McKinnon, D., and Tomaselli, G.F. (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98, 1383-1393.

Kannel, W.B. (2002). Cardioprotection: what is it? Who needs it? *Am J Manag Care* 8, 5-12.

- Kapur, S., Aistrup, G.L., Sharma, R., Kelly, J.E., Arora, R., Zheng, J., Veramasuneni, M., Kadish, A.H., Balke, C.W., and Wasserstrom, J.A. (2010). Early development of intracellular calcium cycling defects in intact hearts of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1843-1853.
- Kemi, O.J., Ellingsen, O., Smith, G.L., and Wisloff, U. (2008). Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Front Biosci* 13, 356-368.
- Kemi, O.J., MacQuaide, N., Hoydal, M.A., Ellingsen, O., Smith, G.L., and Wisloff, U. (2012). Exercise training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats. *J Cell Physiol* 227, 20-26.
- Kirchberger, M.A., Tada, M., and Katz, A.M. (1974). Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 6166-6173.
- Kolwicz, S.C., MacDonnell, S.M., Renna, B.F., Reger, P.O., Seqqat, R., Rafiq, K., Kendrick, Z.V., Houser, S.R., Sabri, A., and Libonati, J.R. (2009). Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1361-1368.
- Kravtsov, G.M., Kam, K.W., Liu, J., Wu, S., and Wong, T.M. (2007). Altered Ca(2+) handling by ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchange in the heart from ovariectomized rats: role of protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1625-1635.
- Lacombe, V.A., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Sridhar, A., Emani, S., Bonagura, J.D., Feldman, D.S., Gyorke, S., and Carnes, C.A. (2007). Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1787-1797.
- Lakatta, E.G. (1999). Cardiovascular aging research: the next horizons. *J Am Geriatr Soc* 47, 613-625.
- Lakatta, E.G., and Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107, 346-354.
- Lakatta, E.G., and Sollott, S.J. (2002). Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132, 699-721.
- Lehnart, S.E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X.H., Song, L.S., Tillman, E.J., Mancarella, S., Coromilas, J., Lederer, W.J., Kass, R.S., et al. (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7906-7910.

- Lim, C.C., Apstein, C.S., Colucci, W.S., and Liao, R. (2000). Impaired cell shortening and relengthening with increased pacing frequency are intrinsic to the senescent mouse cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2075-2082.
- Lim, C.C., Liao, R., Varma, N., and Apstein, C.S. (1999). Impaired lusitropy-frequency in the aging mouse: role of Ca(2+)-handling proteins and effects of isoproterenol. *Am J Physiol* 277, H2083-2090.
- Lompre, A.M., Lambert, F., Lakatta, E.G., and Schwartz, K. (1991). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. *Circ Res* 69, 1380-1388.
- Luczak, E.D., and Leinwand, L.A. (2009). Sex-based cardiac physiology. *Annu Rev Physiol* 71, 1-18.
- Mace, L.C., Palmer, B.M., Brown, D.A., Jew, K.N., Lynch, J.M., Glunt, J.M., Parsons, T.A., Cheung, J.Y., and Moore, R.L. (2003). Influence of age and run training on cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange. *J Appl Physiol* (1985) 95, 1994-2003.
- Mark, A.L. (1995). Sympathetic dysregulation in heart failure: mechanisms and therapy. *Clin Cardiol* 18, I3-8.
- Marks, A.R. (2001). Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* 33, 615-624.
- Marks, A.R., Priori, S., Memmi, M., Kontula, K., and Laitinen, P.J. (2002). Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cell Physiol* 190, 1-6.
- Matsubara, L.S., Narikawa, S., Ferreira, A.L., Paiva, S.A., Zornoff, L.M., and Matsubara, B.B. (2006). [Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart]. *Arq Bras Cardiol* 86, 126-130.
- Mattiazzi, A., Mundina-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L., and Kranias, E. (2005). Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 68, 366-375.
- Maurice, D.H., Palmer, D., Tilley, D.G., Dunkerley, H.A., Netherton, S.J., Raymond, D.R., Elbatarny, H.S., and Jimmo, S.L. (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64, 533-546.
- McCrossan, Z.A., Billeter, R., and White, E. (2004). Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63, 283-292.

- McMullen, J.R., and Jennings, G.L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 255-262.
- Meissner, G. (2002). Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci* 7, d2072-2080.
- Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 308, 1583-1587.
- Messerli, F.H., Garavaglia, G.E., Schmieder, R.E., Sundgaard-Riise, K., Nunez, B.D., and Amodeo, C. (1987). Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. *Ann Intern Med* 107, 158-161.
- Meyer, R., Linz, K.W., Surges, R., Meinardus, S., Veas, J., Hoffmann, A., Windholz, O., and Grohe, C. (1998). Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol* 83, 305-321.
- Mikkola, T.S., and Clarkson, T.B. (2002). Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 53, 605-619.
- Mill, J.G., Stefanon, I., dos Santos, L., and Baldo, M.P. (2011). Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res* 44, 890-898.
- Mosley, W.J., 2nd, and Lloyd-Jones, D.M. (2009). Epidemiology of hypertension in the elderly. *Clin Geriatr Med* 25, 179-189.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2007). Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 75, 478-486.
- Natali, A.J., Turner, D.L., Harrison, S.M., and White, E. (2001). Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol* 204, 1191-1199.
- Nayler, W.G., Daile, P., Chipperfield, D., and Gan, K. (1970). Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol* 219, 1620-1626.
- Nguyen, T.P., Sovari, A.A., Pezhouman, A., Iyer, S., Cao, H., Ko, C.Y., Bapat, A., Vahdani, N., Ghanim, M., Fishbein, M.C., et al. (2016). Increased susceptibility of spontaneously hypertensive rats to ventricular tachyarrhythmias in early hypertension. *J Physiol* 594, 1689-1707.
- Nicholl, P.A., and Howlett, S.E. (2006). Sarcoplasmic reticulum calcium release channels in ventricles of older adult hamsters. *Can J Aging* 25, 107-113.
- Noblat, M.B., L., G.B., L., and A., L. (2004). Complicações da hipertensão arterial em homens e mulheres atendidos em um ambulatório de referência. *Arq Bras Cardiol* 83.

- Okamoto, K., and Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27, 282-293.
- Palmer, B.M. (2005). Thick filament proteins and performance in human heart failure. *Heart Fail Rev* 10, 187-197.
- Parks, R.J., Ray, G., Bienvenu, L.A., Rose, R.A., and Howlett, S.E. (2014). Sex differences in SR Ca(2+) release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. *J Mol Cell Cardiol* 75, 162-173.
- Pawlus, D.G., Moore, R.L., Musch, T.I., and Davidson, W.R., Jr. (1993). Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. *J Appl Physiol* (1985) 74, 2598-2605.
- Pelzer, T., Loza, P.A., Hu, K., Bayer, B., Dienesch, C., Calvillo, L., Couse, J.F., Korach, K.S., Neyses, L., and Ertl, G. (2005). Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation* 111, 1492-1498.
- Pereira, M., Lunet, N., Azevedo, A., and Barros, H. (2009). Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *J Hypertens* 27, 963-975.
- Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fishbein, M.C., and Frohlich, E.D. (1979). Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 237, H461-468.
- Piacentino, V., 3rd, Weber, C.R., Chen, X., Weisser-Thomas, J., Margulies, K.B., Bers, D.M., and Houser, S.R. (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 92, 651-658.
- Picht, E., Zima, A.V., Blatter, L.A., and Bers, D.M. (2007). SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1073-1081.
- Pilote, L., Dasgupta, K., Guru, V., Humphries, K.H., McGrath, J., Norris, C., Rabi, D., Tremblay, J., Alamian, A., Barnett, T., et al. (2007). A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ* 176, S1-44.
- Pinto, Y.M., Paul, M., and Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39, 77-88.
- Podesser, B.K., Jain, M., Ngoy, S., Apstein, C.S., and Eberli, F.R. (2007). Unveiling gender differences in demand ischemia: a study in a rat model of genetic hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg* 31, 298-304.
- Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W., and Bers, D.M. (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium

exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88, 1159-1167.

Primola-Gomes, T.N., Campos, L.A., Lauton-Santos, S., Balthazar, C.H., Guatimosim, S., Capettini, L.S., Lemos, V.S., Coimbra, C.C., Soares, D.D., Carneiro-Junior, M.A., et al. (2009). Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol* (1985) 107, 593-598.

Raddino, R., Manca, C., Poli, E., Bolognesi, R., and Visioli, O. (1986). Effects of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 281, 57-65.

Regitz-Zagrosek, V., and Seeland, U. (2012). Sex and gender differences in clinical medicine. *Handb Exp Pharmacol*, 3-22.

Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Adams, R.J., Berry, J.D., Brown, T.M., Carnethon, M.R., Dai, S., de Simone, G., Ford, E.S., et al. (2011). Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18-e209.

Roman-Campos, D., Carneiro-Junior, M.A., Primola-Gomes, T.N., Silva, K.A., Quintao-Junior, J.F., Gondim, A.N., Duarte, H.L., Cruz, J.S., and Natali, A.J. (2012). Chronic exercise partially restores the transmural heterogeneity of action potential duration in left ventricular myocytes of spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 155-157.

Santana, L.F., Kranias, E.G., and Lederer, W.J. (1997). Calcium sparks and excitation-contraction coupling in phospholamban-deficient mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 503 (Pt 1), 21-29.

Satoh, H., Delbridge, L.M., Blatter, L.A., and Bers, D.M. (1996). Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J* 70, 1494-1504.

SBC (2016). 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 107, 1-83.

Scriven, D.R., Dan, P., and Moore, E.D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79, 2682-2691.

Shao, C.H., Wehrens, X.H., Wyatt, T.A., Parbhu, S., Rozanski, G.J., Patel, K.P., and Bidasee, K.R. (2009). Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol* (1985) 106, 1280-1292.

Shorofsky, S.R., Aggarwal, R., Corretti, M., Baffa, J.M., Strum, J.M., Al-Seikhan, B.A., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., Wier, W.G., and Balke, C.W. (1999). Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res* 84, 424-434.

- Sipido, K.R., Volders, P.G., Vos, M.A., and Verdonck, F. (2002). Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 53, 782-805.
- Skavdahl, M., Steenbergen, C., Clark, J., Myers, P., Demianenko, T., Mao, L., Rockman, H.A., Korach, K.S., and Murphy, E. (2005). Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H469-476.
- Song, L.S., Sobie, E.A., McCulle, S., Lederer, W.J., Balke, C.W., and Cheng, H. (2006). Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4305-4310.
- Stevens, S.C., Terentyev, D., Kalyanasundaram, A., Periasamy, M., and Gyorke, S. (2009). Intra-sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations are driven by dynamic regulation of ryanodine receptor function by luminal Ca²⁺ in cardiomyocytes. *J Physiol* 587, 4863-4872.
- Sugden, P.H., and Clerk, A. (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med (Berl)* 76, 725-746.
- Sullivan, J.L. (2003). Are menstruating women protected from heart disease because of, or in spite of, estrogen? Relevance to the iron hypothesis. *Am Heart J* 145, 190-194.
- Tamura, T., Onodera, T., Said, S., and Gerdes, A.M. (1998). Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J Mol Cell Cardiol* 30, 2175-2181.
- Tamura, T., Said, S., and Gerdes, A.M. (1999). Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension* 33, 676-680.
- Tsotetsi, O.J., Woodiwiss, A.J., Netjhardt, M., Qubu, D., Brooksbank, R., and Norton, G.R. (2001). Attenuation of cardiac failure, dilatation, damage, and detrimental interstitial remodeling without regression of hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 38, 846-851.
- Turgeon, J.L., McDonnell, D.P., Martin, K.A., and Wise, P.M. (2004). Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science* 304, 1269-1273.
- Varagic, J., Susic, D., and Frohlich, E. (2001). Heart, aging, and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 16, 336-341.
- Virdis, A., Bruno, R.M., Neves, M.F., Bernini, G., Taddei, S., and Ghiadoni, L. (2011). Hypertension in the elderly: an evidence-based review. *Curr Pharm Des* 17, 3020-3031.

Vitarelli, A., and Terzano, C. (2010). Do we have two hearts? New insights in right ventricular function supported by myocardial imaging echocardiography. *Heart Fail Rev* 15, 39-61.

Voelkel, N.F., Quaife, R.A., Leinwand, L.A., Barst, R.J., McGoon, M.D., Meldrum, D.R., Dupuis, J., Long, C.S., Rubin, L.J., Smart, F.W., et al. (2006). Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 114, 1883-1891.

Wasserstrom, J.A., Sharma, R., Kapur, S., Kelly, J.E., Kadish, A.H., Balke, C.W., and Aistrup, G.L. (2009). Multiple defects in intracellular calcium cycling in whole failing rat heart. *Circ Heart Fail* 2, 223-232.

Wattanapernpool, J. (1998). Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. *Life Sci* 63, 955-964.

Wattanapernpool, J., Riabroy, T., and Preawnim, S. (2000). Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sci* 66, 533-543.

Weber, K.T. (2001). Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension* 38, 588-591.

Weeks, K.L., and McMullen, J.R. (2011). The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)* 26, 97-105.

Wei, J.Y., Spurgeon, H.A., and Lakatta, E.G. (1984). Excitation-contraction in rat myocardium: alterations with adult aging. *Am J Physiol* 246, H784-791.

Weinberg, E.O., Thienelt, C.D., Katz, S.E., Bartunek, J., Tajima, M., Rohrbach, S., Douglas, P.S., and Lorell, B.H. (1999). Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 34, 264-273.

Weisser-Thomas, J., Nguyen, Q., Schuettel, M., Thomas, D., Dreiner, U., Grohe, C., and Meyer, R. (2007). Age and hypertrophy related changes in contractile post-rest behavior and action potential properties in isolated rat myocytes. *Age (Dordr)* 29, 205-217.

Wenger, N.K. (2002). Cardiovascular effects of raloxifene: the potential for cardiovascular protection in women. *Diabetes Obes Metab* 4, 166-176.

Wickenden, A.D., Lee, P., Sah, R., Huang, Q., Fishman, G.I., and Backx, P.H. (1999). Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 85, 1067-1076.

- Xiao, R.P., Spurgeon, H.A., O'Connor, F., and Lakatta, E.G. (1994). Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling. *J Clin Invest* 94, 2051-2059.
- Xiong, W., Tian, Y., DiSilvestre, D., and Tomaselli, G.F. (2005). Transmural heterogeneity of Na⁺-Ca²⁺ exchange: evidence for differential expression in normal and failing hearts. *Circ Res* 97, 207-209.
- Xu, A., and Narayanan, N. (1998). Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am J Physiol* 275, H2087-2094.
- Yaras, N., Tuncay, E., Purali, N., Sahinoglu, B., Vassort, G., and Turan, B. (2007). Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3584-3592.
- Zaccolo, M. (2011). Spatial control of cAMP signalling in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 11, 649-655.
- Zhong, Y., Reiser, P.J., and Matlib, M.A. (2003). Gender differences in myosin heavy chain-beta and phosphorylated phospholamban in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2688-2693.
- Zhu, X., Altschafli, B.A., Hajjar, R.J., Valdivia, H.H., and Schmidt, U. (2005). Altered Ca²⁺ sparks and gating properties of ryanodine receptors in aging cardiomyocytes. *Cell Calcium* 37, 583-591.
- Zissimopoulos, S., Seifan, S., Maxwell, C., Williams, A.J., and Lai, F.A. (2012). Disparities in the association of the ryanodine receptor and the FK506-binding proteins in mammalian heart. *J Cell Sci* 125, 1759-1769.
- Zornoff, L.A., Skali, H., Pfeffer, M.A., St John Sutton, M., Rouleau, J.L., Lamas, G.A., Plappert, T., Rouleau, J.R., Moye, L.A., Lewis, S.J., et al. (2002). Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 39, 1450-1455.

8- ANEXOS:

8.1- Soluções de isolamento:

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos ventriculares (Soluções A, B e C) foram feitas a partir de uma solução básica contendo 1 litro de água milli-Q e a seguinte composição (em mM):

Produto (mM):	Quantidade utilizada (g/L)
NaCl (130)	7,6
MgCl ₂ (1,43)	0,28
KCl (5,4)	0,4
HEPES (5)	0,062
Glicose (10)	1,8
Taurina (20)	2,38
Creatina (10)	1,3

O pH da solução básica foi ajustado para 7,3 e mantida em temperatura ambiente.

Solução A: Para fazer a solução de isolamento contendo Ca²⁺, foram adicionados 375 µL de CaCl₂(1 M) em 500 mL da solução básica.

Solução B: Para fazer a solução de isolamento livre de Ca²⁺, foram adicionados 250 µL de EGTA (100 mM) em 250 mL da solução básica.

Solução C: Para fazer a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase em 20 ml da solução básica.

8.2- Solução de perfusão tampão HEPES:

Para os procedimentos de medida e análise da contratilidade celular, transiente de [Ca²⁺]_i e das sparks espontâneas de Ca²⁺, os cardiomiócitos isolados dos ventrículos foram incubados com uma solução fisiológica contendo as soluções estoque e sopa:

Solução estoque:

Produto (mM):	Quantidade utilizada g/L
NaCl (113)	65,99
HEPES (5)	11,9
NaH ₂ PO ₄ (1)	1,42
MgSO ₄ (1)	2,46
KCl (5)	3,72

Solução sopa:

Produto (mM):	Quantidade utilizada g/100mL
C ₂ H ₃ NaO ₂ (20)	16,4
Glicose (10)	18,1
Insulina	0,5

Para fazer um litro desta solução, foram adicionados 100 mL da solução estoque, 10 mL da solução sopa e 1mL de CaCl₂ em água mili-Q. Esta solução foi ajustada para um pH= 7,4 e mantida em temperatura ambiente.