

ANSELMO GOMES DE MOURA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO SOBRE PROPRIEDADES
HISTOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS, MECÂNICAS, GÊNICAS E
PROTEICAS DO CORAÇÃO DE RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

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

Orientador: Antônio José Natali

Coorientadores: Thales Nicolau Prímola Gomes
Miguel Araújo Carneiro Júnior

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M929e
2020

Moura, Anselmo Gomes de, 1983-
Efeitos do treinamento físico resistido sobre propriedades
histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do
coração de ratos espontaneamente hipertensos / Anselmo Gomes
de Moura. – Viçosa, MG, 2020.
104 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndice.

Orientador: Antônio José Natali.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 89-101.

1. Exercícios físicos. 2. Hipertensão. 3. Miócitos cardíacos.
4. Contração miocárdica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação
em Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 612.04

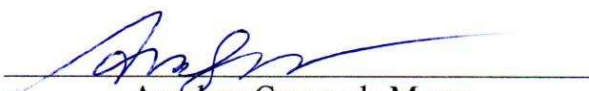
ANSELMO GOMES DE MOURA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO SOBRE PROPRIEDADES
HISTOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS, MECÂNICAS, GÊNICAS E
PROTEICAS DO CORAÇÃO DE RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

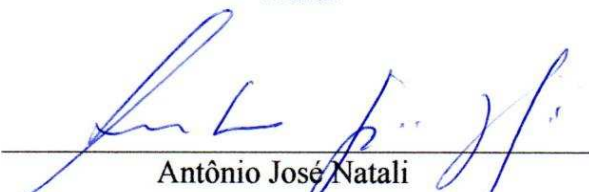
APROVADA: 21 de dezembro de 2020

Assentimento:



Anselmo Gomes de Moura

Autor



Antônio José Natali

Orientador

**À minha esposa Cíntia e à minha filha Maria Fernanda,
por resignificarem as palavras amor e união.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar o meu caminho.

À minha esposa Cíntia e à minha filha Maria Fernanda, pelo companheirismo, doação, por me aguentarem, respeitarem e por viverem comigo a maior experiência de amor que existe, que é formar uma família. Enfim, por estarem ao meu lado sempre. Amo vocês!

Aos meus pais Sueli e Moura, pela minha formação pessoal e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos Aneíse e Juninho, pelo carinho, amizade, e por acreditarem em mim. Amo vocês!

À minha família, pelo carinho e orações.

À família da Cíntia, a qual considero minha também, especialmente João, Simone, Thiago, Dona Valéria e Seu Raimundo pelo carinho, atenção e ajuda.

Ao Professor Antônio José Natali, por acreditar na minha ideia, pela oportunidade, orientação e pela referência de profissional e humildade desde os tempos de graduação.

Aos Professores Thales Nicolau Prímola Gomes e Miguel Araújo Carneiro Júnior, pela amizade, coorientação e por aceitarem compor minha banca de defesa de tese.

À Professora Emily Correna Carlo Reis, pelo auxílio na realização dos exames ecocardiográficos, pela amizade, por aceitar compor minha banca de defesa de tese.

Aos Professores Wellington Lunz e Alessandro de Oliveira, por aceitarem compor a banca da minha defesa.

Aos amigos do BIOEX Leonardo, Alexandre, Fábio, Leôncio, Franciany, Meilene, Filipe Rios, Felipe, Maíra, Luciano, Tiago Leal, Aurora, Juliano, Rafael, Emanuel, Wanessa,

Samuel, Jean e Bruna, pela amizade e auxílio na execução do projeto, sem eles, o estudo não seria possível.

Ao Professor Jader dos Santos Cruz, pela disponibilização de equipamentos e materiais e ao Alexandre e à Paula pelo auxílio, na execução das análises de expressão proteica no Laboratório de Membranas Excitáveis no Departamento de Bioquímica da UFMG.

À Professora Mariana Machado Neves, pelo auxílio, disponibilização de equipamentos e materiais para execução das análises histomorfométricas, e por aceitar compor minha banca de defesa de tese.

Ao Professor Jorge Abdala Dergam dos Santos, pela disponibilização de equipamentos e materiais para execução das análises histomorfométricas.

Ao Luiz Otávio e ao Renner, pelo auxílio na execução das análises histomorfométricas no Laboratório de Biologia Estrutural do departamento de Biologia da UFV.

À Denise Miranda, pela amizade e auxílio na análise da expressão gênica.

Ao Professor Sérgio de Paula e ao aluno de pós-doutorado Roberto, pela viabilização de análises de expressão gênica no Laboratório de Imunovirologia no departamento de Biologia da UFV.

À Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela viabilização de medida de quantificação da expressão gênica no Laboratório de Infectologia Molecular Animal da UFV.

À Professora Maria do Carmo Gouvêa Pelúzio e ao Ricardo de Britto Antonucci, pelo auxílio nestes pela viabilização de análises de conteúdo de lipídio no Laboratório de análises de alimentos no departamento de Nutrição da UFV.

Ao Professor José Geraldo Mill, do Centro de Ciências Fisiológicas da UFES, pela oportunidade de ceder as matrizes para os animais hipertensos.

Ao Sr. Adão e ao Juliano do Biotério Central do Centro Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, pela grande disponibilidade em ajudar com os animais experimentais.

Aos amigos Professores da Faculdade de Viçosa (FDV): Marcelo Cabral, Kátia Seguetto e Valter Miranda, pela amizade e por compartilhar as alegrias e as dores do ensino.

Aos meus amigos Professores do Centro Universitário Governador Ozonam Coelho (UNIFAGOC): Victor Lavorato, Daniela Rosado, Sabrina Domingues, Elizângela Fernandes, Roseny Maffia, Davi Silva, Rômulo Júnior, Renata Oliveira, Jaqueline Lopes, Gustavo Camargos, Liana Lobato, Marli Júlio, Fernando Vaz de Melo (in memoriam), Wellington Salles, Felipe Moniz e Andrês Chiapeta, pela amizade e por compartilhar as alegrias, as dores do ensino e as viagens de van para Ubá.

Aos meus alunos de graduação e especialização da FDV e UNIFAGOC, por me possibilitarem aprender mais sobre o universo encantador da Educação Física.

Aos amigos da academia UP Sport Center: Matheus, Carlos, Cristina, Felipe, Hebert, Renan, Darlan, Yasmim, Carol, Aline, Raquel, Cris, Sara, Júlia, Fernanda e todos os clientes que confiaram no meu trabalho.

Aos colegas de doutorado: Matheus, Felipe, Robson, João Paulo, Fernanda e Joel que juntos fizeram história como a primeira turma de doutores em Educação Física formados pela UFV.

Aos animais experimentais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, ficando aqui meu agradecimento.

À população brasileira que, além da CAPES, também financiou a realização do projeto por meio do CNPq e da FAPEMIG.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“O caminho é o que importa, não o seu fim. Se viajar depressa demais, vai perder aquilo que o fez viajar.”
(Louis L’Amour)

RESUMO

MOURA, Anselmo Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Efeitos do treinamento físico resistido sobre propriedades histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do coração de ratos espontaneamente hipertensos.** Orientador: Antônio José Natali Coorientadores: Thales Nicolau Prímola Gomes e Miguel Araújo Carneiro Júnior.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do treinamento resistido (TR) sobre propriedades histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do coração de ratos espontaneamente hipertensos. Para tal, ratos adultos da linhagem Wistar Kyoto ou espontaneamente hipertensos (SHR), com 16 semanas de idade, foram alocados em um dos 4 grupos, com 16 animais cada, a saber: normotenso sem treinamento (NS), normotenso treinado (NT), hipertenso sem treinamento (HS) e hipertenso treinado (HT). Os animais dos grupos NT e HT, foram submetidos a um protocolo de TR, com escaladas em escada vertical (80° de inclinação), 3 vezes por semana, durante 8 semanas. A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca de repouso (FCR) foram mensuradas antes e após o período de TR. O exame ecocardiográfico foi realizado após o período de TR, para analisar a morfologia e a função sistólica do ventrículo esquerdo (VE). As circunferências torácica (CT) e abdominal (CA) e o comprimento naso-anal foram medidas e a relação CA/CT e o índice de massa corporal (IMC) foram calculados. A quantidade total de lipídios foi determinada e o conteúdo de lipídio e o percentual de gordura foram calculados. Após eutanásia, foram determinadas as massas do coração (MCor), dos ventrículos (MV), do ventrículo direito (MVD), do septo interventricular (MS) e do VE (MVE). As razões MV:MCor, MVE:MCor e MVE:tíbia foram calculadas. No VE, a área de secção transversa (AST) foi mensurada e as proporções histomorfométricas de citoplasma, de núcleo, de vasos sanguíneos, de matriz extracelular e de colágeno tipo I e tipo III foram determinadas. A razão entre os colágenos III e I foi calculada (razão III:I). As expressões gênicas dos biomarcadores inflamatórios (TNF, fator de necrose tumoral; IL-10, interleucina 10), de função endotelial (VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; ET-1, endotelina 1) e de tecidos não contráteis (Colágeno tipo I e tipo III) do VE foram mensuradas. As expressões das proteínas reguladoras de cálcio (Ca^{2+}) do VE (SERCA2a, cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático 2a; NCX, trocador de sódio e cálcio; PLBt, fosfolambam total; CAV1.2, canal de cálcio do tipo L 1.2) foram determinadas. Em miócitos isolados do VE, foram

determinados a contratilidade e o Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) transiente. Os dados foram analisados por meio de ANOVA two-way para medidas repetidas ou ANOVA two-way, seguidas do post hoc de Tukey, quando necessário. O tamanho do efeito foi calculado utilizando-se o índice d de Cohen para grupos emparelhados. Os dados foram apresentados como média \pm EPM. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados mostraram que os animais SHR apresentaram maior força muscular relativa e menor massa corporal, comparados aos normotensos. O TR não reduziu a PA e a FCR ($p > 0,05$). O TR aumentou a Mcor, a MV, a MVE e as razões MV:Mcor, MVE:Mcor e MVE:tíbia, além de prevenir a redução dimensão interna do VE e da fração de ejeção. O TR preveniu o aumento da largura, da AST de miócitos, do % de núcleos e do colágeno do tipo I. Além disso, aumentou o percentual do colágeno do tipo III e a razão III:I e diminuiu o percentual de matriz extracelular ($p < 0,05$) no VE. Contudo, não houve efeito, tanto da hipertensão quanto do TR ($p > 0,05$), nas expressões gênicas de VEGF, ET-1, IL-10, TNF e colágenos tipo I e tipo III. Em miócitos isolados do VE, o TR aumentou a amplitude, as velocidades até o pico e de decaimento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transiente, a amplitude de contração, as velocidades de contração e de relaxamento celular ($p < 0,05$). O TR preveniu também o aumento da expressão proteica de FLBt ($p < 0,05$), sem alterar a expressão da SERCA2, NCX e CAV1.2 ($p > 0,05$) no VE. Em conclusão, o TR aplicado preveniu o remodelamento adverso, promoveu benefícios nas propriedades morfológicas, melhorou as propriedades mecânicas e a expressão proteica relativa à recaptção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, sem afetar a expressão gênica de biomarcadores inflamatórios, de função endotelial e de tecidos não contráteis no VE de ratos espontaneamente hipertensos.

Palavras-Chave: Exercícios Físicos. Hipertensão. Miócitos cardíacos. Contração miocárdica.

ABSTRACT

MOURA, Anselmo Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2020. **Effects of resistance training on histological, morphological, mechanical, genic and protein properties in spontaneously hypertensive rats.** Adviser: Antônio José Natali. Co-advisers: Thales Nicolau Prímola Gomes and Miguel Araújo Carneiro Júnior.

The aim of this study was to investigate the effects of resistance training (RT) on the histological, morphological, mechanical, genetic and protein properties in the heart of spontaneously hypertensive rats (SHR). Sixteen-week-old male normotensive Wistar Kyoto rats or SHR were allocated in one of the 4 groups of 16 animals each, as follows: normotensive control (NS), normotensive trained (NT), hypertensive control (HS) and hypertensive trained (HT). Animals from NT and HT groups were submitted to a RT protocol (climbing vertical ladder – inclination: 80 degrees), 3x/week, for 8 weeks. Blood pressure (BP) and resting heart rate (RHR) were measured before and after the RT period. The echocardiographic exam was performed after the TR period to analyze left ventricle (LV) morphology and systolic function. The thoracic (TC) and abdominal (AC) circumferences and the naso-anal length were measured, and the AC/TC ratio and body mass index (BMI) were calculated. The total amount of lipids was determined and the lipid content and fat percentage were calculated. After euthanasia, the heart (HM), ventricles (VM), right ventricle (RVM), interventricular septum (SM) and LV (LVM) were determined. The VM:HM, LVM:HM and LVM:tibia ratios were calculated. The myocyte cross-sectional area (CSA) and the percentages of cytoplasm, nucleus, blood vessels, collagen type I and type III fibers were histologically determined. The collagen fiber type III to type I ratio was calculated (III:I ratio). The gene expression of inflammatory biomarkers (TNF, tumor necrosis factor; IL-10, interleukin 10), endothelial function (VEGF, vascular endothelial growth factor; ET-1, endothelin 1) and non-contractile tissue of the LV (collagen type I and type III fibers) were measured. The expression of the Ca^{2+} regulatory proteins (SERCA2a, sarcoplasmic reticulum calcium ATPase; NCX, sodium – calcium exchanger; PLBt, phospholamban total; CAV1.2, calcium channel type 1.2) in the LV was measured. In isolated LV myocytes, it was measured contractile function and the intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) transient. The data were analyzed using two-way ANOVA for repeated measurements or two-way ANOVA, as appropriate, followed by the Tukey's post hoc test, when necessary. The effect size was calculated using the Cohen's d index for paired groups. Data are presented as mean \pm

SEM ($\alpha = 5\%$). The results showed that SHR had a higher relative muscular strength and lower body mass, compared to normotensive animals. The employed TR did not change BP and RHR ($p > 0.05$). The RT increased HM, VM, LVM, and VM:HM, LVM:HM, LVM:tibia ratio, and prevented the increase in the internal dimension of the LV and the ejection fraction. The TR prevented the increases in myocyte width and CSA, % of nuclei and in the collagen type I ($p < 0.05$). Besides that, increase % of collagen type III and in the III:I ratio, and decrease % of extracellular matrix ($p < 0.05$) in the LV ($p < 0.05$) in the LV. However, neither hypertension nor RT affected the expression of VEGF, ET-1, IL-10, TNF and collagen I and III genes in the LV ($p > 0.05$). In single LV myocytes, the RT augmented the amplitude, the velocities to peak and to decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient, and the amplitude of contraction, and the velocities of contraction and relaxation ($p < 0.05$). RT also prevented the increase in the expression of FLBt ($p < 0.05$), without changing the expression of SERCA2a, NCX and CAV1.2 ($p > 0.05$) in the LV. In conclusion, the employed RT prevents adverse histological remodeling caused by hypertension, promote benefits in the morphological properties, improves the mechanical properties and calcium reuptake into the sarcoplasmic reticulum protein expression, with no influence in the inflammatory, endothelial function and non-contractile biomarkers gene expression in the LV of spontaneously hypertensive rats.

Keywords: Physical exercise. Hypertension. Cardiac myocytes. Myocardial contraction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensionais.

β -actina – Beta-actina.

β -MCP – β -miosina de cadeia pesada.

CaCl₂ – Cloreto de cálcio.

AEC – Acoplamento excitação-contração

AT1 – Receptor de angiotensina II do tipo I.

AKT – Proteína quinase B.

BIOEX – Laboratório de Biologia do Exercício /DES-UFV.

[Ca²⁺]_i – Cálcio intracelular.

CA – Circunferência abdominal.

CA/CT – Relação circunferência abdominal pela circunferência torácica.

CaM – Calmodulina.

CaMKII – Proteína quinase 2 dependente de Ca²⁺/calmodulina.

CaV1.2 – Canal de cálcio do tipo L 1.2.

cDNA – DNA complementar.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

COL I – Colágeno tipo I.

COL III – Colágeno tipo III.

CT – Circunferência torácica.

DIVED – Dimensão interna do VE na diástole.

DIVES – Dimensão interna do VE na sístole.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

EGTA – Ácido tetracético etilenoglicol.

EPVED – Espessura da parede ventricular esquerda na diástole.

EPVES – Espessura da parede ventricular esquerda na sístole.

ESID – Espessura do septo interventricular na diástole.

ESIS – Espessura do septo interventricular na sístole.

ET-1 – Endotelina 1.

FCR – Frequência cardíaca de repouso.

FLB – Fosfolambam.

FLB_{ser16} – Fosfolambam fosforilada no resíduo da serina 16 (FLB_{ser16}).

FLB_{thr17} – Fosfolambam fosforilada no resíduo de treonina 17 (FLB_{thr17}).

FLBt – Fosfolambam total.

FNA – Fator natriurético atrial.

Fura-2AM – Fura-2 ácido aminopolicarboxílico.

H & E – Hematoxilina e eosina.

HS – Hipertenso sem treinamento.

HT – Hipertenso treinado.

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1.

IL-10 – Interleucina 10.

IMC – Índice de massa corporal.

MAPK – Proteína-quinase ativadas por mitógenos.

MEC – Matriz extracelular.

MC – Massa corporal.

MCor – Massa do coração.

MS – Massa do septo interventricular.

MMP 2 – Metaloproteinase de matriz do tipo 2.

MMP 9 – Metaloproteinase de matriz do tipo 9.

mTor – Proteína alvo de rapamicina.

MV – Massa dos ventrículos.

MVD – Massa do ventrículo direito.

MVE – Massa do ventrículo esquerdo.

MVE:Mcor – Razão entre as massas do ventrículo esquerdo e do coração.

MVE:MV – Razão entre as massas do VE e do ventrículo.

MVE:tíbia – Razão entre as massas do VE e o comprimento da tíbia.

NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico.

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas.

NCX – Canal trocador Na⁺/Ca²⁺.

NCX1 – Subunidade 1 do Canal trocador Na⁺/Ca²⁺.

NS – Normotenso sem treinamento.

NT – Normotenso treinado.

PA – Pressão arterial.

PAD – Pressão arterial diastólica.

PAM – Pressão arterial média.

PAS – Pressão arterial sistólica.

PKA – Proteína quinase A.

PMC – Peso máximo carregado.
PMCA – Ca²⁺-ATPase sarcolemal (PMCA).
qRT-PCR – Técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real.
RNAm – RNA mensageiro.
RyR2 – Subunidade 2 dos receptores de rianodina.
SERCA – Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático.
SERCA2A – Subunidade 2a da Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático.
SHR – Rato espontaneamente hipertenso.
TA – Treinamento físico aeróbio.
TR – Treinamento físico resistido.
Tac – Tamanho da amostra corrigido.
Ta – Tamanho da amostra.
TGFB – Fator de crescimento transformador.
TNF – Fator de necrose tumoral.
TR – Treinamento físico resistido.
UFV – Universidade Federal de Viçosa.
VC – Volume de carga.
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
VD – Ventrículo direito.
VE – Ventrículo esquerdo.
WKY – Wistar Kyoto.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representativo do processo de acoplamento excitação-contração.. .27
- Figura 2. Modelos de treinamento resistido para ratos. (A) Modelo de agachamento. 1, Colete de fixação; 2, Haste de madeira, 3, Anilhas de peso; 4, Plataforma metálica; 5, Aparelho de estímulo elétrico. (B) Modelo de subida em escadas..... 30
- Figura 3. Fluxo dos experimentos do estudo. BIOEX: Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da UFV. PA: Pressão arterial. FCR: Frequência cardíaca de repouso. PMC: Peso máximo carregado. 37
- Figura 4. Pletismógrafo utilizado para mensuração da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso..... 38
- Figura 5. Escada vertical e aparato de sobrecarga externa para a realização do treinamento resistido..... 39
- Figura 6. Protocolo do teste de Peso Máximo Carregado (PMC). MC: Massa Corporal. ID: intervalo de descanso..... 41
- Figura 7. Diagrama da sessão de treinamento físico resistido. PMC: Peso máximo carregado. ID: intervalo de descanso. 42
- Figura 8. Traçado representativo da contração celular. 50
- Figura 9. Imagem representativa da medida da largura (vermelho) e comprimento (preto) celular..... 51
- Figura 10. Traçado representativo do cálcio intracelular transiente. 53

Figura 11. (A) Progressão do volume da carga de treinamento físico resistido. (B) Peso máximo carregado absoluto antes e após o período de treinamento físico resistido. (C) Peso máximo carregado relativo antes e após o período de treinamento físico resistido. Dados são média \pm EPM. n = 15 animais por grupo. NS: normotenso sem treinamento. NT: normotenso treinado: HS: hipertenso sem treinamento. HT: hipertenso treinado. Anova Two-Way para medidas repetidas, seguida do teste post hoc de Tukey..... 57

Figura 12. Frequência cardíaca (A). Pressão arterial sistólica (B). Pressão arterial sistólica (C). Pressão arterial média (D) dos grupos experimentais antes (pré) e após (pós) o treinamento físico resistido. Dados são média \pm EPM. n = 14 animais em cada grupo. N NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. Anova Two-Way. 61

Figura 13. Largura, comprimento e volume celular de miócitos isolados do ventrículo esquerdo. (A) Comprimento celular. (B) Largura celular. (C) Razão comprimento/largura celular. (D) Volume celular. Os dados são média \pm EPM (60 a 65 células de 7 animais por grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way. 66

Figura 14. Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo, corado com H & E. Áreas circundadas em amarelo indicam cardiomiócitos. Barra = 20 μ m. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado..... 67

Figura 15. Área de secção transversa de miócitos do ventrículo esquerdo. Os dados são média \pm erro padrão da média (10 lâminas por animal de 8 animais por grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. ANOVA two way..... 68

Figura 16. Expressão relativa de mRNA de colágeno no ventrículo esquerdo. A) Colágeno tipo I. B) Colágeno tipo III. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way. 71

Figura 17. Expressão relativa de mRNA de biomarcadores inflamatórios no ventrículo esquerdo. A) Fator de necrose tumoral. B) Interleucina 10. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way..... 72

Figura 18. Expressão relativa de mRNA de biomarcadores da função endotelial no ventrículo esquerdo. (A) Fator de crescimento vascular endotelial. (B) endotelina 1. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way. 72

Figura 19. Cálcio intracelular transiente. A) Amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente; B) Velocidade até o pico de $[Ca^{2+}]_i$ transiente; C) Velocidade máxima de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ transiente. Dados são média \pm EPM de 60 células por grupo (n= 6 animais em cada grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey..... 74

Figura 20. Contratilidade Celular. A) Amplitude da contração. B) Velocidade de contração. C) Velocidade de relaxamento. Dados são média \pm EPM de 60 células por grupo (n= 7 animais em cada grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. 76

Figura 21. Expressão proteica do ventrículo esquerdo. A) Canal de cálcio do tipo L 1.2 (CaV1.2). B) Canal trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX1). C) Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático 2a (SERCA2a). D) Fosfolambam total (FLBt). E) Razão FLBt/SERCA2a. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. Anova Two-Way..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Progressão da familiarização à escada vertical.	40
Tabela 2. Sequência dos primers para a análise de reação em cadeia de polimerase em tempo real.	48
Tabela 3. Massa corporal, composição corporal e antropometria.	59
Tabela 4. Massa do coração, dos ventrículos e razões.....	63
Tabela 5. Dados da ecocardiografia dos animais normotensos e hipertensos.	65
Tabela 6. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo esquerdo.	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Hipertensão arterial	21
1.2. Hipertensão arterial e alterações teciduais no coração.....	23
1.3. Hipertensão arterial e alterações celulares do coração.....	25
1.4. Treinamento resistido, coração e hipertensão arterial.....	29
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Animais e desenho experimental	36
3.2. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Repouso.....	37
3.3. Protocolo de treinamento físico resistido.....	38
3.4. Teste de peso máximo carregado	40
3.5. Protocolo de treinamento físico resistido.....	41
3.6. Ecocardiografia	42
3.7. Medidas antropométricas	43
3.8. Eutanásia	44
3.9. Extração Lipídica	44
3.10. Massa do coração, dos ventrículos e suas razões	45
3.11. Análises histológicas e morfométricas do ventrículo esquerdo	45
3.12. Análise de expressão gênica de biomarcadores no ventrículo esquerdo	47
3.13. Avaliação da função contrátil dos miócitos isolados do ventrículo esquerdo	
48	
3.13.1. Isolamento dos miócitos do ventrículo esquerdo.....	49
3.13.2. Medida de contratilidade celular.....	50
3.13.3. Mensuração do comprimento, largura e volume celular.....	51
3.13.4. Medidas do cálcio intracelular transiente	52
3.14. Quantificação de proteínas do ventrículo esquerdo.....	53
3.15. Análises Estatísticas	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Antropometria e conteúdo de lipídio.....	58
4.2. Pressão arterial e frequência cardíaca de repouso.....	60

4.3.	Massa do coração, massa dos ventrículos e razões	62
4.4.	Ecocardiografia	64
4.6.	Expressão gênica de biomarcadores no ventrículo esquerdo	71
4.7.	Cálcio intracelular transiente.....	73
4.8.	Contratilidade Celular	75
4.9.	Expressão proteica no ventrículo esquerdo.....	77
5.	DISCUSSÃO	79
5.1.	Composição corporal e a antropometria	79
5.2.	Tolerância ao esforço físico.	79
5.3.	Massa cardíaca e dimensões de miócitos do ventrículo esquerdo	80
5.4.	Organização tecidual, estado inflamatório e indicadores de função endotelial no ventrículo esquerdo	81
5.5.	Função sistólica ventricular.....	82
5.6.	Cálcio intracelular, contratilidade celular e proteínas reguladoras de cálcio... 84	
5.7.	Pressão arterial e a frequência cardíaca de repouso	86
5.8.	Considerações finais.....	86
6.	CONCLUSÃO	88
7.	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE 1 - Composição das soluções para experimentos com cardiomiócitos isolados.....	102
	ANEXO 1- Atestado de aprovação na Comissão de Ética no Uso Animal-UFV.....	104

1. INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) é a pressão que o sangue exerce nas paredes internas dos vasos sanguíneos, representada pelo produto do débito (DC) e da resistência vascular periférica (RVP). O débito cardíaco é influenciado pela contratilidade e o relaxamento do miocárdio, pelo volume sanguíneo circulante, pelo retorno venoso e pela frequência cardíaca. A RVP, por sua vez é determinada por vários mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores como o sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina e a modulação endotelial. Além disso, a espessura da parede das artérias, também pode afetar a RVP, pois potencializa a vasoconstrição arterial devido ao espessamento de sua parede (FROHLICH, 1988; FROHLICH; APSTEIN; CHOBANIAN et al., 1992).

A regulação da PA exige controles a curto, médio e longo prazo com alto grau de complexidade, pois são influenciadas por ações integradas de sistemas como o cardiovascular, renal, neural e endócrino. Como exemplo, durante a realização de exercícios físicos, ocorre o aumento do débito cardíaco, para suprir as necessidades de irrigação sanguínea para a musculatura ativa, o que leva ao aumento da PA de maneira aguda (WILMORE; COSTILL; KENNEY, 2009). O aumento da ação do sistema nervoso simpático, do sistema renina angiotensina, são exemplos de distúrbios crônicos na regulação da PA e causam a perda do controle a longo prazo e ocorrência da hipertensão arterial (FROHLICH; APSTEIN; CHOBANIAN et al., 1992).

1.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica não transmissível, multifatorial, caracterizada pela elevação persistente da PA. Essa doença é considerada um problema de saúde pública por possuir alta prevalência em todo mundo, sendo que no Brasil a doença atinge 32,3% da população. Além disso eleva os custos socioeconômicos, pois em 2018, estimaram-se gastos de US\$ 523,7 milhões no SUS, com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTI et al., 2020).

A hipertensão arterial pode ser classificada de duas formas: 1) Quando o diagnóstico da doença é atribuído a causas genéticas com influência ambiental, ou não apresenta causas óbvias e explícitas ela é denominada essencial ou primária. 2) Já quando

há uma causa desencadeante para a hipertensão, como nefropatias e diabetes mellitus, esta é denominada secundária. A maior prevalência de diagnósticos, de 95 a 97% dos casos, é de hipertensão essencial (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTO et al., 2020).

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia da hipertensão o modelo experimental do rato espontaneamente hipertenso (SHR – Spontaneously Hypertensive Rat), desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963), é amplamente utilizado. Esse modelo surgiu a partir da sexta geração de cruzamento entre irmãos de animais da linhagem Wistar Kyoto que apresentaram PA elevada e sustentada. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial do homem (FAZAN-JÚNIOR; SILVA; SALGADO, 2001). A hipertensão nos SHRs apresenta uma evolução parecida com a humana e por volta da 5ª semana de vida, os animais já são classificados como hipertensos, apresentando PA elevada e sustentada por volta da 16ª semana, e um platô entre 20 e 28 semanas (KOKUBO; UEMURA; MATSUBARA et al., 2005; TRIPPODO; FROHLICH, 1981).

Para modelos animais, como o SHR, a classificação para o diagnóstico da hipertensão arterial é a medida de valores iguais ou superiores a de 150 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS) (OKAMOTO; AOKI, 1963). Já para humanos, a classificação da hipertensão arterial no Brasil segue o padrão postulado pela Sociedade Brasileira de Hipertensão, sendo a doença caracterizada quando os valores medidos são iguais ou superiores a 140 mmHg de PAS e /ou 90 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTO et al., 2020).

Cabe ressaltar que a Sociedade Americana do Coração, em uma diretriz recente, postulou valores menores para o diagnóstico da hipertensão arterial (PAS \geq 130 mmHg e/ou PAD \geq 80 mmHg) (WHELTON; CAREY; ARONOW et al., 2018). Essa recomendação é baseada na evidência que indivíduos quanto tratados de forma medicamentosa intensiva, ou seja, com o objetivo de atingir valores de PAS inferiores a 120 mmHg, podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares em comparação com indivíduos com tratamento de meta padrão, ou seja, valores inferiores a 140 mmHg (WRIGHT; WILLIAMSON; WHELTON, 2015). Contudo, as demais sociedades internacionais ainda não seguiram essa recomendação, devido à falta de evidências para tratamentos como esse para hipertensos leves, que apresentam valores entre 140/90 e 159/99 mmHg (SHEPPARD, 2019).

Frequentemente a hipertensão arterial está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins, vasos sanguíneos, ossos, etc.) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTI et al., 2020). No presente estudo trataremos da problemática do coração.

1.2. Hipertensão arterial e alterações teciduais no coração

O coração é um dos órgãos mais afetados pela hipertensão arterial e apresenta um remodelamento progressivo devido à doença. Os animais SHR com quatro semanas apresentam uma hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo (VE), onde há um aumento do índice de hipertrofia simultâneo a um valor normal da espessura relativa da parede do VE. Esse aumento pode exercer um papel compensatório e mantendo a função sistólica normal, o que não representa uma condição patológica (KOKUBO; UEMURA; MATSUBARA et al., 2005). A partir das seis semanas de idade, se instala uma hipertrofia concêntrica, induzida por sobrecarga de pressão, onde o índice de hipertrofia elevado está associado à espessura relativa de parede também elevada, o que caracteriza uma hipertrofia cardíaca patológica (KOKUBO; UEMURA; MATSUBARA et al., 2005; MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

Essa hipertrofia é gerada, em parte, pela sobrecarga mecânica de pressão que é sentida pelas células cardíacas e leva a uma sinalização intracelular, com aumento da ação da angiotensina II (ANG II), endotelina 1 (ET-1) e noradrenalina, ativando as vias da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e da Calcineurina/NFAT (MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

Outro fator que contribui para a hipertrofia cardíaca é o remodelamento da matriz extracelular (MEC). Esse remodelamento é mediado pelo aumento da ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o que leva ao aumento da síntese de ANG II e desencadeia uma série de eventos. Um deles é o aumento da expressão do fator de crescimento transformador (TGF β), uma citocina profibrótica que também que ativa os fibroblastos cardíacos, o que leva ao aumento da produção de colágeno dos tipos I e III ao redor dos miócitos cardíacos, e favorece a inflamação e a degradação da MEC. Além disso, o TGF β estimula a produção de ET1 que pode aumentar a produção de fibroblastos e consequentemente de colágeno. Outro evento induzido pela ANG II é o aumento da

expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-6 (IL-6), e de fatores de crescimento como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em fibroblastos cardíacos (CHINTALGATTU; NAIR; KATWA, 2003; MAKINO; HANEDA; BABAZONO et al., 2005; SATO; WATANABE; TANAKA et al., 2003).

Logo, além da hipertrofia, o remodelamento da MEC contribui para a reestruturação cardíaca patológica gerada pela hipertensão. A matriz é formada por uma trama glicoproteica que envolve e se relaciona com as células constitutivas do coração e controla o comportamento celular, oferecendo resistência e elasticidade tecidual. Além disso, é local de recebimento dos nutrientes advindos dos capilares e eliminação para os capilares linfáticos (WILSON; SPINALE, 2001).

Os principais componentes da matriz cardíaca são: 1) proteínas estruturais, como colágeno tipo I e tipo III (predominantes), elastina, fibrilina; 2) proteínas adesivas como colágeno IV e VI, laminina e fibronectina; 3) proteoglicanos (WILSON; SPINALE, 2001). Os colágenos tipos I e III são sintetizados por fibroblastos, as células mais prevalentes em todo o miocárdio. O colágeno I, promove resistência à tensão e estrutura ao interstício. Já o colágeno tipo III, é responsável por sustentação para o estroma e é importante para distensibilidade (PARRY; CRAIG, 1988.).

Devido à hipertensão, ocorre um excesso de deposição de colágeno (I e III) o que resulta em fibrose intersticial. Essa fibrose aumenta a rigidez do miocárdio (JALIL; DOERING; JANICKI et al., 1989) e induz à disfunção diastólica do VE, bem como a heterogeneidade elétrica do miocárdio, o que predispõe a arritmias ventriculares (MCLENACHAN; DARGIE, 1990). Kokubo et al., (2005) demonstraram que, em animais SHR, pode ocorrer uma disfunção sistólica a partir dos dois meses de idade, e uma disfunção diastólica a partir dos três meses.

Todo esse processo de remodelamento do coração frente à hipertensão arterial, iniciada no terceiro mês de vida dos animais SHR, é uma adaptação compensatória, aos eventos ocorridos nessa fase da doença (HASENFUSS, 1998). Por isso ela é chamada de fase compensada, e permite a manutenção da capacidade mecânica do coração (BADEER, 1964).

Ao longo do tempo, a espessura da parede ventricular aumenta ainda mais, podendo ocorrer a redução da câmara cardíaca, a reexpressão de genes fetais [ex: fator natriurético atrial (FNA), α -actina esquelética e a β -miosina de cadeia pesada (β -MCP)].

Além disso, o aumento progressivo do colágeno diminui a complacência ventricular, com presença de estresse oxidativo e apoptose. Todos esses eventos resultam em fibrose do tecido ventricular e enrijecimento do miocárdio com consequente disfunção mecânica e falha cardíaca, que ocorre na fase descompensada, ou de insuficiência cardíaca, por volta do 18º-24º mês de vida (LEVY; GARRISON; SAVAGE et al., 1990; MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

Essa série de alterações, em nível tecidual, do coração compromete a eficiência mecânica do miocárdio e se refletem, em nível celular, nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos.

1.3. Hipertensão arterial e alterações celulares do coração

As alterações morfológicas e gênicas ocorridas na estrutura do VE se refletem no acoplamento excitação-contração (AEC) dos cardiomiócitos. Esse acoplamento se dá inicialmente, com uma corrente despolarizante que atinge os túbulos transversos. Essa corrente leva à ativação dos canais trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e dos canais de Ca^{2+} dos tipos T e L, presentes na membrana celular.

A maior parte do Ca^{2+} que adentra a célula advém da abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L. Em condições não patológicas, os cardiomiócitos ventriculares adultos expressam somente a subunidade CaV1.2 (HARVEY; HELL, 2013). Essa abertura dos canais leva a um pequeno influxo de Ca^{2+} para a fenda diádica e para citosol, devido ao seu gradiente eletroquímico. O aumento de Ca^{2+} na fenda diádica faz com que se aumente a probabilidade de ligação aos receptores de rianodina, especificamente à sua subunidade 2 (RyR2), presente no retículo sarcoplasmático (RS) dos miócitos cardíacos. Cada junção entre o sarcolema (túbulos transversos e superfície) e o RS, possui cerca de 10-25 canais de Ca^{2+} tipo L e 100-200 canais de RyR2, constituindo locais ideais para o acoplamento e aumento do Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (BERS, 2008).

Os RyR2 são estabilizados pelas proteínas de ligação FK506 (FKBP12.6), calmodulina (CaM), proteína quinase A (PKA), proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII), e fosfatases 1 e 2A, que em situações não patológicas, encontram-se incorporadas aos RyR2. Essa estabilização previne a abertura espontânea dessa proteína, o que pode favorecer eventos arrítmicos, devido à liberação espontânea de Ca^{2+} , conhecida como sparks de Ca^{2+} (CHENG; LEDERER; CANNELL, 1993). A

ligação do Ca^{2+} aos RyR2 leva à liberação do Ca^{2+} do RS para o interior da célula, processo esse, conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} . Dessa forma ocorre um aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que, por sua vez, aumenta a probabilidade do Ca^{2+} se ligar à troponina C, ativando os miofilamentos contráteis e promovendo a sístole (BERS, 2014).

Na fase de relaxamento há a redução do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, até o nível basal por diferentes meios, como a Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA), a Ca^{2+} -ATPase sarcolemal (PMCA), o NCX e o uniporte mitocondrial de Ca^{2+} (BERS, 2001). Entre esses mecanismos de transporte, a SERCA e o NCX contribuem com um percentual maior da quantidade de Ca^{2+} retirado da célula, de 93 e 6%, respectivamente (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; BERS, 2014).

A subunidade da SERCA presente no coração é a do subtipo 2a (SERCA2a) (SITSEL; DE RAEYMAECKER; DRACHMANN et al., 2019), e sua atividade é regulada, principalmente, pela fosfolambam (FLB), um inibidor endógeno que ao se associar à SERCA2a, diminui o transporte de Ca^{2+} e a sua atividade de ATPase (BERS, 2001; MACLENNAN; KRANIAS, 2003). Contudo, a fosforilação da FLB, seja do resíduo de serina 16 ($\text{FLB}_{\text{ser16}}$), pela ação da PKA, ou no resíduo de treonina 17 ($\text{FLB}_{\text{thr17}}$), pela proteína quinase 2 dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), dissocia a FLB da SERCA2a (BASSANI; MATTIAZZI; BERS, 1995; KIRCHBERGER; TADA; KATZ, 1974). Essa dissociação reverte à inibição da FLB sobre a SERCA2a, provocando aumento da taxa de recaptção de Ca^{2+} para o RS e da velocidade de relaxamento celular (MATTIAZZI; MUNDINA-WEILENMANN; GUOXIANG et al., 2005; WEGENER; SIMMERMAN; LINDEMANN et al., 1989).

A NCX, especificamente o NCX1 (isoforma presente no coração de mamíferos), é uma proteína de que consiste em realizar a troca de uma molécula de Ca^{2+} por três moléculas de Na^+ através da membrana plasmática (REN; PHILIPSON, 2013). Apesar de atuar também no influxo de Ca^{2+} , a ação do NCX é mais reconhecida no efluxo de Ca^{2+} durante a fase de relaxamento celular (OTTOLIA; TORRES; BRIDGE et al., 2013). Já foi demonstrado que esse efluxo corresponde ao influxo de Ca^{2+} realizado pelo $\text{CaV}1.2$ (BRIDGE; SMOLLEY; SPITZER, 1990). Juntos, esses mecanismos contribuem para que o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ retorne ao nível basal, promovendo, com isso, a dissociação do Ca^{2+} ligado à cTnC e induzindo o relaxamento (BERS, 2008). Tanto o NCX, quanto os demais mecanismos do AEC estão ilustrados na Figura 1.

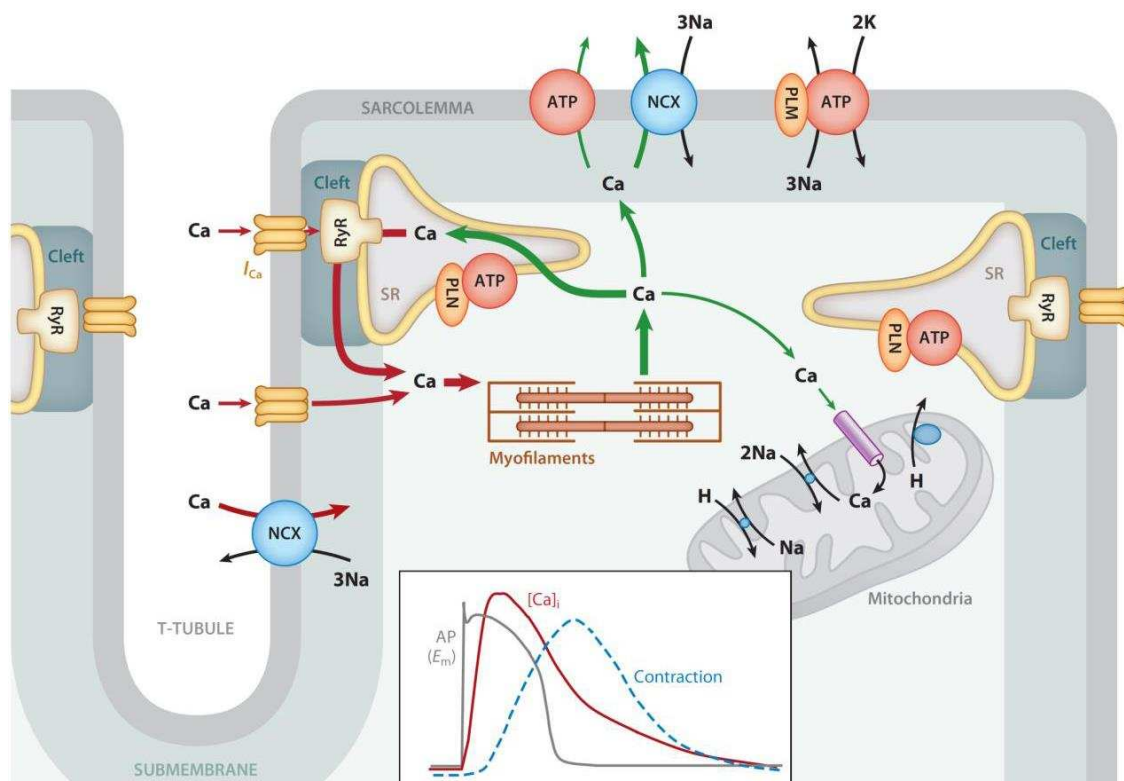


Figura 1. Esquema representativo do processo de acoplamento excitação-contração. As setas vermelhas representam o processo de entrada de Ca^{2+} no citosol, a partir do NCX, canais do tipo L e T, além dos $RyR2$ até a contração muscular. As setas verdes representam o recaptação de Ca^{2+} pelas proteínas SERCA2a/FLB, NCX e pela via mitocondrial. O quadro no meio do esquema representa de cinza o potencial de ação, de vermelho a concentração de Ca^{2+} ou transiente de Ca^{2+} e azul representa a contração muscular (BERS, 2014).

A hipertensão arterial exerce efeitos deletérios em todos os mecanismos do AEC demonstrados anteriormente. Sabe-se que há uma disfunção da atividade elétrica do coração devido à doença, o que prolonga o potencial de ação nos cardiomiócitos do pericárdio devido à diminuição na corrente repolarizante transitória de efluxo de potássio (I_{to}) (ROMAN-CAMPOS; CARNEIRO-JUNIOR; PRIMOLA-GOMES et al., 2012). Além disso, já foi demonstrado um aumento do tempo total até o pico de contração, do relaxamento celular e do transiente de Ca^{2+} em animais SHR (BROOKSBY; LEVI; JONES, 1992; CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2014).

Em nível molecular, a hipertensão pode afetar as proteínas que regulam o AEC, o que ajuda no entendimento dos efeitos da doença sobre o coração. Em animais SHR, os $CaV1.2$ apresentam um aumento no número de splicing alternativos, que podem estar associado ao remodelamento cardíaco desencadeado pela doença (TANG; LIAO; LI et

al., 2008). O aumento das variações de splicing, significa que diferentes exons de um mesmo pré-RNA podem atuar na geração de RNAs maduros diferentes, e por sua vez gerar proteínas distintas a partir de um gene único. Dessa forma, o splicing alternativo pode levar a um grande aumento na diversidade de proteínas, muitas vezes ligadas ao remodelamento adverso, no caso da hipertensão (LAREAU; GREEN; BHATNAGAR et al., 2004; TANG; LIAO; LI et al., 2008).

Com relação aos RyR2, sabe-se que o SHR apresenta aumento em sua expressão gênica, acompanhado de uma diminuição da FKBP12.6 (CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2014). Essa resposta pode levar ao aumento da liberação espontânea de Ca^{2+} para sarcoplasma, como por exemplo, as sparks de Ca^{2+} , o que por sua vez, pode levar ao surgimento de arritmias cardíacas. Além disso, a contração pode ser prejudicada por um desarranjo nos túbulos T causado pela hipertensão, de forma que os CaV1.2 estejam desalinhados com os RyR2, o que prejudica a liberação de Ca^{2+} do RS (KRZESIAK; COGNARD; SEBILLE et al., 2019).

Uma resposta causada pela hipertensão, que pode prejudicar o relaxamento celular, é o aumento da expressão proteica do NCX e a diminuição da FLBt e SERCA2a. Contudo, ainda não foram encontradas alterações nas razões $FLB_{ser16}/FLBt$ e $FLB_{thr17}/FLBt$ devido à doença (COLLINS; LOKA; DICARLO, 2005; GARCIARENA; PINILLA; NOLLY et al., 2009; KRZESIAK; COGNARD; SEBILLE et al., 2019).

O tratamento da hipertensão é essencialmente medicamentoso, todavia, alterações no estilo de vida, como a alimentação saudável e a prática de atividade física, são fortemente indicados como terapias de apoio (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTI et al., 2020). Assim, o treinamento físico tornou-se uma importante estratégia não medicamentosa na prevenção e controle da hipertensão (PESCATELLO; FRANKLIN; FAGARD et al., 2004; PESCATELLO; MACDONALD; ASH et al., 2015).

As adaptações benéficas sobre morfologia, função cardíaca e capacidade contrátil do miocárdio devido ao treinamento físico aeróbio (TA), especialmente o contínuo de intensidade leve a moderada, tanto em animais normotensos quanto em hipertensos, estão bem estabelecidos na literatura (CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2014; CARNEIRO JÚNIOR; PRÍMOLA-GOMES; QUINTÃO JÚNIOR et al., 2019; NATALI; WILSON; PECKHAM et al., 2002; ROMAN-CAMPOS; CARNEIRO-JUNIOR; PRIMOLA-GOMES et al., 2012). As adaptações

funcionais, estruturais e metabólicas no músculo cardíaco causadas pelo treinamento físico resistido (TR), porém, podem trazer benefícios a essa população, como o aumento da força muscular e redução da PA de repouso. Contudo, os efeitos do TR são menos estudados, se comparados ao TA (CORNELISSEN; SMART, 2013; FIDALGO; FARINATTI; BORGES et al., 2019; INDER; CARLSON; DIEBERG et al., 2016; MACDONALD; JOHNSON; HUEDO-MEDINA et al., 2016; MELO; BARAUNA; NEVES et al., 2015; NACI; SALCHER-KONRAD; DIAS et al., 2019; SHARMAN; LA GERCHE; COOMBES, 2015).

1.4. Treinamento resistido, coração e hipertensão arterial

O TR, também denominado de treinamento de força ou treinamento com pesos, é um tipo de exercício físico que implica uma ação muscular contra uma resistência. Esse pode ser dividido em TR dinâmico, com ações musculares concêntricas e excêntricas, e estático, com ação muscular isométrica (FLECK; KRAEMER, 2017).

O TR é capaz de levar ao aumento do tamanho e da força muscular, e possui efeitos diretos na prevenção primária de doenças crônicas. Mcleod et al. (2019), em uma recente revisão, evidenciam que os benefícios do TR são equivalentes, ou até superiores ao TA, e que deveriam ser a estratégia primária de ação na prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas. Logo, esse tem sido adotado como estratégia adjuvante de diversas doenças, como a osteoporose, a diabetes mellitus e a hipertensão (IKEDO; KIDO; ATO et al., 2019; NEVES; SOUZA; PASSOS et al., 2016; SOUZA; LINO; RUFFONI et al., 2017).

Para compreender melhor as respostas morfológicas, funcionais, celulares e moleculares dos efeitos do TR, a experimentação animal tem sido utilizada no estudo dos mais diversos sistemas corporais, como o muscular, o nervoso e o cardiovascular, sendo esse último o objeto de interesse do presente estudo (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; HORNBERGER; FARRAR, 2004; STRICKLAND; SMITH, 2016).

Os modelos de TR na experimentação animal podem ser divididos em duas categorias: *in situ* e *de corpo todo*. Nos modelos *in situ*, temos a estimulação mecânica, o estiramento crônico e a sobrecarga compensatória (ANTONIO; GONYEA, 1993; BAAR; ESSER, 1999; DENNY-BROWN, 1960; GOLDBERG, 1967). Em todos esses modelos é possível determinar um músculo específico a ser estimulado e utilizar o membro

contralateral como controle, contudo, possuem limitações quanto às respostas musculares como, por exemplo, o uso de anestesia, a realização de cirurgia e a validade limitada (STRICKLAND; SMITH, 2016).

Outros modelos se aproximam mais da realidade do TR e facilitam a transposição das respostas para humanos, chamados de modelo de corpo todo (STRICKLAND; SMITH, 2016). Esses modelos apresentam o desafio de fazer com o que o animal realize os movimentos de maneira voluntária. Em alguns experimentos pode-se observar o uso de comida como recompensa ao esforço ou estimulação elétrica, nesse caso não realizada no músculo alvo a ser realizado, mas na pata do animal como estímulo para iniciar o movimento, semelhante aos utilizados em esteiras rolantes (NICASTRO; ZANCHI; DA LUZ et al., 2012; TAMAKI; UCHIYAMA; NAKANO, 1992).

Dentre esses modelos temos a roda de corrida voluntária resistida, o agachamento, roda em suspensão, o salto vertical na água e a subida em escadas (CUNHA; TANNO; COSTA SAMPAIO MOURA et al., 2005; HORNBERGER; FARRAR, 2004; ISHIHARA; ROY; OHIRA et al., 1998; TAMAKI; UCHIYAMA; NAKANO, 1992). Os estudos de TR e doenças cardiovasculares, em sua maior parte, usam os modelos de agachamento e de subida em escadas, ilustrados na Figura 2.

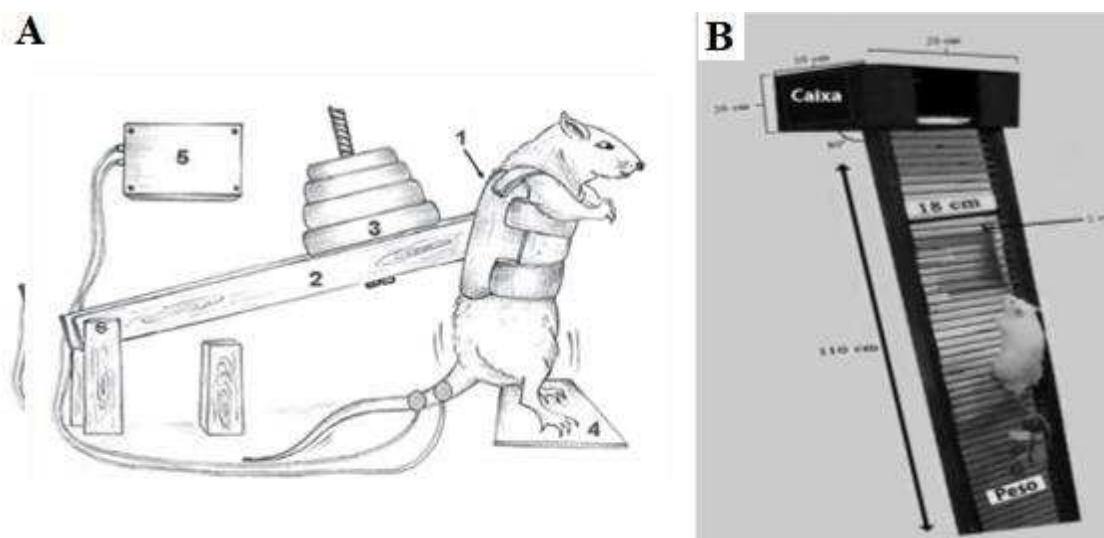


Figura 2. Modelos de treinamento resistido para ratos. (A) Modelo de agachamento. 1, Colete de fixação; 2, Haste de madeira, 3, Anilhas de peso; 4, Plataforma metálica; 5, Aparelho de estímulo elétrico. (B) Modelo de subida em escadas. Adaptado de Melo et al., (2011) e Neves et al., (2016).

O modelo de agachamento, proposto por Tamaki, Uchiyama e Nakano (1992), tem sido utilizado como um dos principais formas de TR visando compreender as adaptações cardiovasculares a esse tipo de treinamento. Esse modelo utiliza um aparato para simular um dos movimentos mais realizados nas academias de ginástica pelos seres humanos. Apesar de utilizado em diversos estudos e ter eficácia sobre o sistema cardiovascular comprovada (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; MELO; AMADEU; MAGALHÃES et al., 2011; MELO; BARAUNA; JÚNIOR et al., 2015; PINTER; PADILHA; DE OLIVEIRA et al., 2008), esse modelo de treinamento utiliza estimulação elétrica a cada repetição de agachamento, o que torna a realização do exercício forçada.

O modelo de treinamento de subida em escadas, inicialmente, também utilizava choque na cauda para estimular os animais a subirem a escada. Atualmente, sabe-se que é possível, por meio de um período de adaptação ao aparato, fazer com que o animal suba as escadas sem que seja necessário estímulo por choque, o que pode ser considerada uma vantagem em relação ao modelo de agachamento. Neste, o animal é posicionado na parte inferior de uma escada com 80° de inclinação, com altura entre 50 e 110 cm e sobrecarga externa anexada à sua cauda. O modelo foi preconizado por Hornberger e Farrar (2004), com intuito de proporcionar adaptações hipertróficas e aumento da força muscular, principalmente em músculos dos membros posteriores, em especial, aqueles com predomínio de fibras tipo II.

Com relação às adaptações causadas pelo TR no músculo cardíaco, alguns estudos demonstram que a hipertrofia excêntrica do VE pode ocorrer em atletas que praticam esse treinamento, como os fisiculturistas, mesmo porque, esses atletas também praticam o TA como parte do programa de treinamento. Entretanto, a maior parte dos estudos aponta que o TR pode promover hipertrofia cardíaca fisiológica concêntrica, inclusive em ratos (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; FAGARD, 1997; FERNANDES; BARAUNA; NEGRAO et al., 2015).

A hipertrofia cardíaca concêntrica causada pelo TR é induzida pela sobrecarga pressórica, ou seja, pelo aumento da pós-carga, que é caracterizado pelo elevado pico de tensão sistólica. Essa sobrecarga leva ao aumento na largura dos miócitos, pela adição de novos sarcômero em paralelo, e conseqüentemente ao aumento da espessura da parede do VE. Esse aumento, porém é acompanhado de uma manutenção no tamanho da cavidade

do VE tanto em humanos como em ratos (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; COLAN, 1997).

Os mecanismos envolvidos na hipertrofia causada pelo TR são a ativação de diferentes vias de sinalização AKT-mTor para síntese de proteínas sarcoméricas via receptor AT1 (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; MELO; AMADEU; MAGALHÃES et al., 2011; ZOU; AKAZAWA; QIN et al., 2004). Melo et al., (2017) demonstraram que a via do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF1), outra possível via de sinalização da hipertrofia muscular, não é responsável pela hipertrofia induzida pelo TR no coração de ratos.

Apesar de levar a uma hipertrofia concêntrica, assim como a causada pela hipertensão, não há disfunção cardíaca causada pelo TR, por isso é chamada de hipertrofia cardíaca concêntrica fisiológica. Essa resposta foi demonstrada em animais e humanos (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; BROWN; THOMPSON, 1987; PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020; VAN DEN BROEKE; FAGARD, 1988). Um estudo de Barauna et al., (2007) demonstrou que ratos Wistar submetidos ao protocolo de agachamento apresentaram aumento de 16% na massa do VE. Esse aumento ocorreu também no septo interventricular e na parede posterior do VE, sem reduzir seu volume diastólico final, diferentemente do que ocorre na hipertrofia cardíaca concêntrica patológica.

Alguns estudos investigaram o efeito do TR sobre as propriedades dos cardiomiócitos do VE. Melo et al., (2015) investigaram a morfologia de miócitos isolados do VE em ratos normotensos, utilizando o modelo de treinamento de agachamento. Nesse estudo foi demonstrado que o TR aumenta a largura e o volume celular, mas não altera o comprimento dos cardiomiócitos, o que condiz com a característica da hipertrofia concêntrica cardíaca, causada pela sobrecarga de pressão. Entretanto, não é sabido se essa resposta ocorre também em animais hipertensos.

Além das alterações nas dimensões celulares, Melo et al., (2015) também demonstraram uma diminuição do tempo para o pico de contração e tempo para o relaxamento celular em miócitos isolados do VE nos animais normotensos. Essa resposta veio acompanhada de um aumento na expressão proteica da SERCA2a e uma diminuição do miRNA-214 (contrarregulador da SERCA2a) (MELO; BARAUNA; JÚNIOR et al., 2015). Em outro estudo, dessa vez com ratos infartados, foi possível verificar que a prática de TR causou respostas semelhantes, com diminuição da SERCA2a, da FLB_{ser16}/FLB e

do NCX. O infarto induzido nos animais havia causado efeitos exatamente contrários (MELO; BARAUNA; NEVES et al., 2015). Todavia, os efeitos desse tipo de treinamento sobre a contratilidade celular e as proteínas que regulam o ciclo do Ca^{2+} dos miócitos do VE em animais hipertensos, ainda precisam ser elucidados.

Com relação aos efeitos do TR na hipertensão, sabe-se que tanto ações dinâmicas quanto estáticas podem reduzir a PAS e a PAD (CORNELISSEN; SMART, 2013; INDER; CARLSON; DIEBERG et al., 2016; MCLEOD; STOKES; PHILLIPS, 2019). Com relação ao estudo da hipertensão, tanto o TR de subida em escada (NEVES; SOUZA; PASSOS et al., 2016; PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020), quanto o modelo de agachamento (FARIA TDE; TARGUETA; ANGELI et al., 2010; FERNANDES; FARIA TDE; RIBEIRO JUNIOR et al., 2015) foram utilizados em estudos prévios.

Em estudos envolvendo o SHR, foram verificados efeitos benéficos tanto de forma aguda quanto crônica sobre o sistema cardiovascular. Com relação à primeira, Faria et al., (2010) demonstraram que o TR, com modelo de agachamento com moderada intensidade, foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico e o relaxamento dependente do endotélio, que estão associados à diminuição da PA pós-exercício. Já Fernandes et al., (2015) demonstraram que uma sessão de TR, com modelo de agachamento, aumentou a contratilidade miocárdica em ratos SHR, em conjunto com uma maior atividade do RS e aumento do influxo de Ca^{2+} do sarcolema. Além disso, houve um aumento funcional da atividade do RS, apesar de não haver alterações na expressão proteica de SERCA2a, FLBt e da FLB_{ser16}. Porém, os efeitos crônicos do TR sobre esses parâmetros em animais hipertensos, ainda precisam ser esclarecidos.

Estudos prévios demonstraram que diferentes protocolos de TR diminuíram, ou preveniram o aumento, da PAS (ARAUJO; SANTOS; SOUZA KDOS et al., 2013; NEVES; SOUZA; PASSOS et al., 2016; PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020), demonstrando uma correlação entre o aumento da força e a diminuição da PAS (GOMES; BORGES; ROSSI et al., 2017; PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020). É importante destacar que um aumento de 10 mmHg na PAS está associado a um aumento em 25% no risco de problemas cardíacos como o infarto do miocárdio e outros problemas como o acidente vascular cerebral (BOISSIERE; EDER; MACHET et al., 2008).

A diminuição da PA está associada à diminuição da atividade simpática e/ou aumento da sensibilidade barorreflexa. Gomes et al., (2017) demonstraram que a diminuição da pressão arterial média (PAM) e da sensibilidade barorreflexa em ratos submetidos ao treinamento de moderada intensidade de subida em escadas, durante oito semanas, cinco vezes por semana.

O estudo de Neves et al., (2016), também com o modelo de subida em escadas, avaliaram animais com hipertensão arterial grave, ou seja, com valores de PA sistólica maiores que 180 mmHg submetidos a dois protocolos de TR realizados por 12 semanas, com frequência semanal de três vezes. O primeiro, seguindo a orientação de Casilhas et al., (2012), utilizando a massa corporal do animal para determinar a intensidade das sessões, e o segundo utilizando o peso máximo carregado seguindo a orientação de Horneberger e Farrar (2004). Os autores demonstraram que ambos os protocolos preveniram o aumento da PAS, mas o segundo protocolo levou a ganhos de força maiores.

De acordo com Perrilhão et al., (2020), ratas hipertensas submetidas ao TR de subidas em escada, por 12 semanas, obtiveram melhora da função diastólica cardíaca, por meio de um maior tempo de relaxamento isovolumétrico, sem alterar a massa do coração e o volume de cardiomiócitos. Além disso, o TR preveniu o aumento do conteúdo de colágeno total em ratas hipertensas. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos do TR na função sistólica ventricular esquerda, na organização tecidual do VE, como por exemplo no conteúdo de colágenos do tipo I e III, bem como na expressão gênica de estruturas envolvidas nessa organização, no estado inflamatório e nos marcadores de função endotelial no VE.

Face o exposto, o efeito do TR sobre as propriedades morfológicas, contráteis, moleculares, gênicas e proteicas do tecido muscular cardíaco precisam ser mais bem compreendidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar efeitos do treinamento físico resistido sobre as propriedades histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do coração de ratos espontaneamente hipertensos.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do treinamento físico resistido sobre os seguintes parâmetros de ratos SHR:

- Tolerância ao esforço físico;
- Composição corporal e a antropometria;
- Pressão arterial e a frequência cardíaca de repouso;
- Massa cardíaca;
- Função sistólica ventricular esquerda;
- Dimensões de miócitos do ventrículo esquerdo;
- Organização tecidual do ventrículo esquerdo;
- Estado inflamatório do ventrículo esquerdo;
- Indicadores de função endotelial no ventrículo esquerdo;
- Cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- Contratilidade celular de miócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- Proteínas envolvidas na contração e relaxamento do ventrículo esquerdo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e desenho experimental

Ratos adultos da linhagem Wistar Kyoto e SHR foram utilizados no estudo. O tamanho amostral foi definido de acordo com a fórmula (CHARAN; KANTHARIA, 2013):

$$T_{ac} = \frac{T_a}{\left(1 - \left[\frac{\% \text{ atrito}}{100}\right]\right)}$$

Sendo:

T_{ac}: Tamanho da amostra corrigido

T_a: Tamanho da amostra

Atrito: percentual esperado de perda de animais no experimento

Assim,

$$T_{ac} = \frac{6 \text{ (tamanho da amostra representativa mínima estimada em estudos com animais)}}{(1 - [20 \text{ (porcentagem de atrito esperado)} / 100])}$$

Daí,

$$\begin{aligned} T_{ac} &= \frac{6}{0,8} = 7,5 \text{ (resultado encontrado)} \\ &= 8 \text{ animais por grupo (resultado arredondado)} \end{aligned}$$

Como os experimentos foram feitos com células isoladas e armazenamento de tecidos em formalina e congelados foi necessário duplicar o número de animais em cada grupo, uma vez que a coleta de células isoladas pode danificar os tecidos e impossibilitar análises morfológicas, de expressão gênica e proteica feita a partir da análise de tecidos armazenados em formalina e congelados. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, e os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX), situado no Departamento de Educação Física da UFV.

No BIOEX, os animais foram alojados em caixas de polietileno, com até 5 ratos por caixa e tiveram acesso à ração comercial e água ad libitum. A temperatura ambiente

foi mantida em 22 ± 2 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12/12h. O experimento teve duração de 10 semanas, contadas a partir da semana que os animais iniciaram o TR. Todos os animais foram pesados, por meio de balança digital, no 1º dia de cada semana de TR e no último dia do período experimental.

Os animais, com 15 semanas de idade, foram separados em 4 grupos, com 16 animais em cada grupo, conforme a seguir: normotenso sem treinamento (NS), normotenso treinado (NT), hipertenso sem treinamento (HS) e hipertenso treinado (HT).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFV) da UFV (Protocolo 01/2018, ANEXO 1) e foi conduzido de acordo com os princípios do Guia para o Cuidado no Uso de Animais de Laboratório (NEVES; ONG; RODRIGUES et al., 2013). Os procedimentos (Figura 3) foram acompanhados por um médico veterinário.

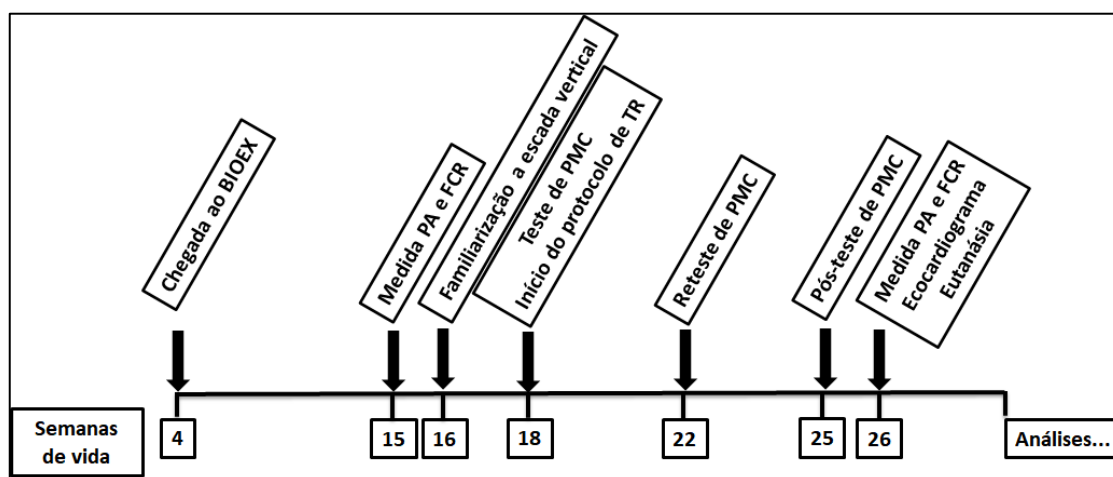


Figura 3. Fluxo dos experimentos do estudo. BIOEX: Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da UFV. PA: Pressão arterial. FCR: Frequência cardíaca de repouso. PMC: Peso máximo carregado.

3.2. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Repouso

As mensurações da PA e frequência cardíaca de repouso (FCR) foram realizadas por método não invasivo através de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo devidamente calibrado e apropriado para medidas em ratos (LE 5001, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). As medidas de todos os animais foram realizadas no início e quarenta e oito horas após o final do período experimental. Por um período de cinco dias antes da realização das medidas, todos os animais foram familiarizados ao

aparato de contenção e às condições utilizadas para as medidas da PA e da FCR, durante sessões diárias, sempre no mesmo horário do dia, em sala específica, ambiente calmo, com temperatura e luminosidade devidamente controladas, sem influência de nenhum agente externo.

Durante as medidas os animais foram posicionados no aparato de contenção e aquecidos de forma passiva a fim de atingir a vasodilatação da artéria caudal por meio de exposição à temperatura de 29-32°C durante 10 minutos. Em seguida, um manguito de pressão e um transdutor de pulso foram colocados a três centímetros da ponta da cauda (Figura 4). Após a captação do pulso, o manguito era insuflado para obtenção das medidas da PAS, PAD, PAM e da FCR.



Figura 4. Pletismógrafo utilizado para mensuração da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso.

3.3. Protocolo de treinamento físico resistido

O protocolo de Hornberger e Farrar (2004) foi adaptado para as necessidades e execução da pesquisa. Os ratos foram familiarizados por duas semanas com a prática de

TR que consistiu em subida de escada vertical (1,1 x 0,18m, 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, 80° de inclinação) com sobrecarga externa fixada na cauda (Figura 5).

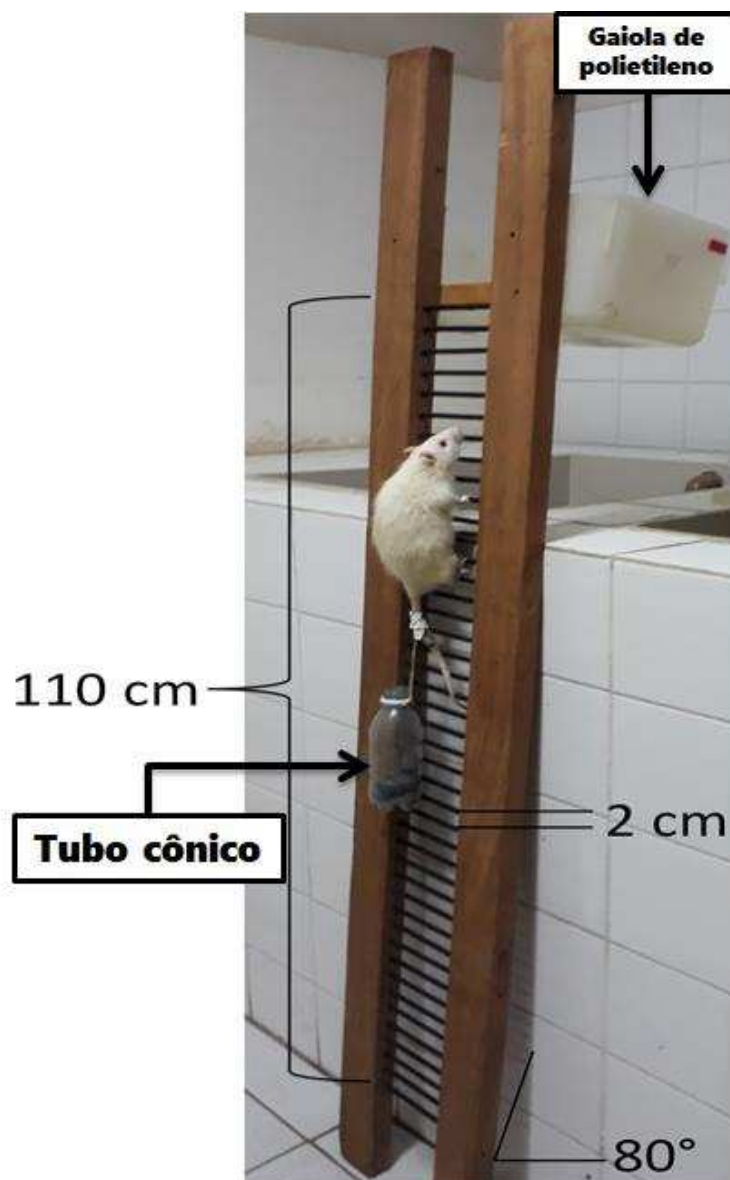


Figura 5. Escada vertical e aparato de sobrecarga externa para a realização do treinamento resistido.

A familiarização ocorreu por duas semanas, com frequência semanal de três vezes (Tabela 1). No primeiro dia, os animais foram incentivados a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo (pinçar dos dedos) para iniciar o movimento. No topo da escada, encontraram uma gaiola de polietileno (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 120 segundos (Figura 3). Ao chegarem à gaiola, os animais completavam uma série. Este

procedimento foi repetido até que os ratos voluntariamente subissem a escada três vezes consecutivas, sem o incentivo do estímulo na cauda, ao fim da primeira semana.

Na segunda semana de adaptação, os ratos escalaram voluntariamente a escada de duas a três séries, sem o incentivo do estímulo na cauda, com um aparato (tubo cônico) de 15 g, fixado à parte proximal da cauda, por meio de uma fita adesiva (1,5cm, 3M Tartan). Esse tubo foi usado posteriormente para aumentar a carga externa durante o período de TR, como explicado na seção 4.4. Todos os animais, inclusive os animais submetidos ao protocolo de TR, realizaram o período de familiarização.

Tabela 1. Progressão da familiarização à escada vertical.

Semana	Domingo	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira	Sábado
1	Descanso	1 série Sem aparato	Descanso	2 séries Sem aparato	Descanso	3 séries Sem aparato	Descanso
2	Descanso	2 séries Com aparato	Descanso	3 séries Com aparato	Descanso	3 séries Com aparato	Descanso

3.4. Teste de peso máximo carregado

Após 72 horas do fim do período de familiarização com a escada, foi realizado um teste de peso máximo carregado (PMC). Na escalada inicial foi aplicado 75% da massa corporal do animal, colocando-se peso dentro do aparato fixado à cauda animal. Como peso foi utilizado chumbada utilizado usualmente com isca para peixes. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, os animais descansaram por 120 segundos e em seguida uma sobrecarga adicional de 30 gramas foi adicionada. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga alcançasse um peso que não permitia mais que o rato conseguisse escalar. Esse foi o ponto utilizado para determinar o PMC obtido pelos animais. Ao final da quarta semana de TR esse teste foi realizado com o objetivo de reajustar a carga de TR; e ao final da oitava semana de TR para verificar o ganho de força dos animais (Figura 6). O peso máximo carregado foi utilizado como um índice de tolerância ao esforço físico.

Para verificar a influência da alteração da MC ao longo do tempo e entre as linhagens foi calculado o PCM relativo, dividindo-se o PMC absoluto pela MC de cada animal.

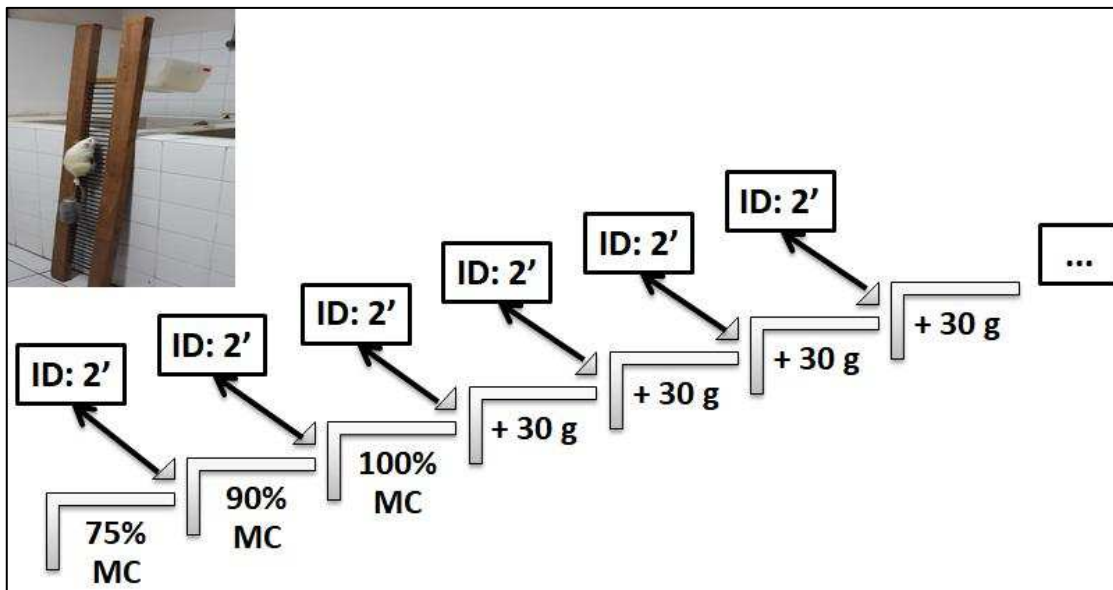


Figura 6. Protocolo do teste de Peso Máximo Carregado (PMC). MC: Massa Corporal. ID: intervalo de descanso.

3.5. Protocolo de treinamento físico resistido

A primeira sessão ocorreu 48 horas após o teste de PMC. O TR consistiu em escalar de quatro a nove vezes carregando progressivamente cargas mais pesadas. Durante as primeiras quatro escaladas, os ratos carregaram 50%, 75%, 90% e 100% do PMC. Durante cada escalada subsequente, 30 gramas foram adicionadas, até que o rato não conseguisse mais escalar (Figura 7). Este TR foi repetido três vezes por semana, durante oito semanas.

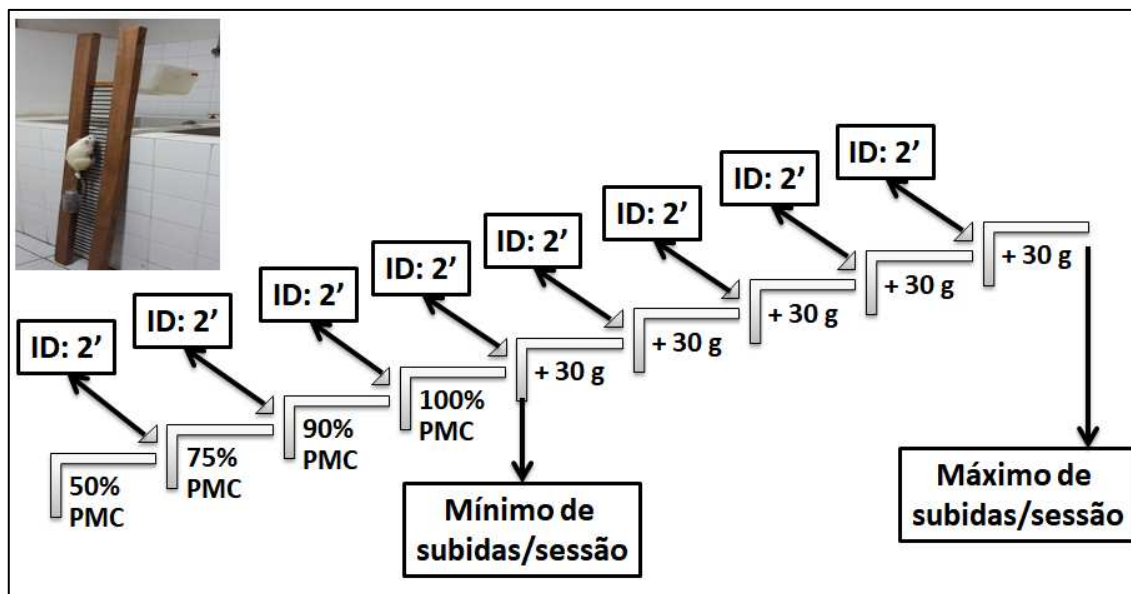


Figura 7. Diagrama da sessão de treinamento físico resistido. PMC: Peso máximo carregado. ID: intervalo de descanso.

Durante todo o período de TR o volume de carga total semanal foi determinado pela fórmula proposta por Tibana et al., (TIBANA; VIEIRA; TAJRA et al., 2013):

$$VC = \text{número de séries} \times \text{número de subidas por série} \times \text{sobrecarga (g)}$$

Sendo:

VC: volume de carga

3.6. Ecocardiografia

Para o exame, os animais foram avaliados 72 hs após a última sessão de treino dos animais exercitados, sendo seus controles não treinados avaliados no mesmo período. Para tal, cada animal foi anestesiado utilizando-se isoflurano a 3% em oxigênio 100% em fluxo constante de um litro por minuto para indução, por um período aproximado de 3 minutos em caixa de contenção. Para a manutenção da anestesia o isoflurano foi mantido a 1,5% através de cone nasal pequeno (adaptado para ratos) durante um período de 10 a 12 minutos para a realização da ecocardiografia.

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por uma mesma médica veterinária, com experiência prévia nesse tipo de procedimento, conforme descrito

anteriormente (LAVORATO; DEL CARLO; DA CUNHA et al., 2016). O exame incluiu estudos bidimensionais (2D) com taxa de amostragem rápida (frame rate) de 120 fps e modo-M, usando um sistema de ultrassom (MyLabTM30 – Esaote, Genoa, Itália) com transdutor (phasedarray) de 11,0 MHz de frequência nominal. As imagens foram obtidas enquanto os animais permanecerem em decúbito lateral, sob efeito de anestesia. Os ecocardiogramas transtorácicos 2D e modo-M foram obtidos com velocidade de varredura de 200 mm/s e ajustada de acordo com a frequência cardíaca. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para análise posterior. Cada parâmetro foi mensurado em três ciclos cardíacos distintos e a média das medidas foi utilizada para as análises estatísticas (SAHN; DEMARIA; KISSLO et al., 1978).

Os parâmetros ecocardiográficos analisados foram a espessura do septo interventricular na diástole (ESID) e na sístole (ESIS), a dimensão interna do VE na diástole (DIVED) e na sístole (DIVES), a espessura da parede ventricular esquerda na diástole (EPVED) e na sístole (EPVES), como parâmetros morfológicos do VE. Além disso, foram mensuradas a fração de ejeção e a fração de encurtamento, para a medida da função sistólica ventricular esquerda. As análises das imagens foram realizadas de forma aleatória e com o observador cego quanto aos grupos experimentais.

3.7. Medidas antropométricas

Imediatamente após o procedimento da ecocardiografia, com os animais ainda sob efeito da anestesia e em decúbito ventral foram realizadas as medidas antropométricas, utilizando uma fita métrica. As circunferências foram feitas entres os pares de patas dos animais, sendo a circunferência torácica (CT) coletada imediatamente anterior a pata dianteira e a circunferência abdominal (CA) foi coletada imediatamente próxima a pata traseira. Posteriormente, foi calculada a relação CA/CT (cm). O comprimento naso-anal (cm) também foi obtido (NOVELLI; DINIZ; GALHARDI et al., 2007). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado por meio da seguinte fórmula (NOVELLI; DINIZ; GALHARDI et al., 2007)

$$\text{IMC (g/cm}^2\text{)} = \text{MC (g)} / (\text{comprimento naso-anal (cm)}^2)$$

Sendo:

IMC: índice massa corporal.

MC: massa corporal.

3.8. Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por decapitação, 24 hs após a realização do ecocardiograma, sem utilização de anestesia prévia, por meio de guilhotina própria para uso de roedores (Insight EB 271), com lâmina periodicamente amolada e a limpeza realizada após a morte de cada animal. Foi utilizado um cone plástico para contenção física do animal para reduzir o estresse do manuseio, melhorar o posicionamento do animal e reduzir a possibilidade de injúria no operador (MINISTÉRIO CIÊNCIA, 2018).

Este método foi utilizado porque está relacionado com a menor percepção da dor do animal comparado a outras formas como o deslocamento cervical e métodos inalatórios como uso de gás carbônico e drogas anestésicas (MINISTÉRIO CIÊNCIA, 2018). Ademais, sabe-se que o uso dessas drogas pode contaminar o material biológico, causar depressão miocárdica, alterar a frequência cardíaca e respiratória, além de possuir ação miorrelaxante, o que pode comprometer os resultados das análises histomorfométricas e de cardiomiócitos isolados do presente estudo (FISH; BROWN; DANNEMAN et al., 2008; FLECKNELL, 2015).

3.9. Extração Lipídica

A quantidade total de lipídios foi avaliada diretamente pelo método de extração de Soxhlet (NIELSEN, 2010). As carcaças dos animais utilizadas para as medidas de massa do coração, massa dos ventrículos e suas razões foram armazenadas em refrigerador (5 °C) até serem utilizados.

Posteriormente, foram secadas em estufa (Nevoni, Nv 1.6) com circulação contínua de ar por 24 horas com temperatura constante de 105 °C. Após a secagem, as carcaças foram trituradas por meio de pistilo e graal e posteriormente armazenadas em um cartucho com papel filtro qualitativo (gramatura: 80 g/m²). Os cartuchos foram inseridos no extrator Soxhlet, onde a gordura foi extraída usando um solvente orgânico

(éter etílico). O éter foi aquecido e volatilizado e depois condensado acima da amostra. Após a condensação, o éter gotejou sobre o cartucho, promovendo a extração de lipídios. Todo o processo ocorreu repetidamente em pequenos ciclos de 15 a 20 minutos até completar 8 horas de extração. Após a extração, foi possível calcular o conteúdo de lipídio dos animais (g), pela diferença entre o peso dos cartuchos pré e pós-extração. Com este valor e o da massa corporal (g), o percentual de gordura dos animais foi calculado aplicando uma regra de três simples.

3.10. Massa do coração, dos ventrículos e suas razões

Após 24 horas do exame ecocardiográfico, oito ratos de cada grupo foram pesados e sacrificados. Os seus corações foram removidos e pesados (MCor); posteriormente os ventrículos foram separados dos átrios e pesados (massa dos ventrículos: MV), e em seguida o VE foi separado do ventrículo direito (VD) e do septo interventricular, e a massa do VE (MVE), do VD (MVD) e do septo (MS) foram medidas em balança de precisão (Gehaka –Brasil, modelo AG 200). Dessa forma foi possível calcular as razões entre a massas do ventrículo e do coração (MV:Mcor) e entre as massas do VE e do coração (MVE:Mcor). Por fim, a tibia direita foi removida e medida por meio de paquímetro, o que possibilitou a medida da razão entre a massa do VE e o comprimento da tibia (MVE:tibia). Essas razões foram utilizadas como índices de hipertrofia ventricular.

3.11. Análises histológicas e morfométricas do ventrículo esquerdo

As análises histológicas e morfométricas do VE foram realizadas conforme descrito previamente (BOZI; MALDONADO; BALDO et al., 2013). Em suma, os fragmentos do VE foram submetidos ao processamento histológico de rotina (desidratação, diafanização e infiltração) e embebidos em resina. As amostras foram desidratadas seguindo a série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto), sendo que os banhos foram de 30 min em cada solução, para inclusão em glicol metacrilato (Historesina, Leica®). Na sequência, o material passou por infiltração em historesina usada, por 24 h, e em historesina nova por 2 h, quando foi emblocado em resina com polimerizador.

Em seguida, foram feitos cortes histológicos, de 5 μm de espessura utilizando-se navalhas de vidro em um micrótomo (Leica, RM2155). Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, as seções foram avaliadas em semi-séries, usando um de cada cinquenta seções. Foram montadas duas lâminas histológicas por animal, contendo oito cortes cada. Posteriormente, os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H & E) ou com picosirius red seguidos por desidratação e diafanização e as lâminas foram montadas.

Os cortes histológicos corados com H & E foram usados para análise da morfologia do VE. As lâminas foram visualizadas e as imagens capturadas usando-se uma câmera digital (Olympus DP 73; Tóquio, Japão) acoplada em microscópio de luz (Olympus BX 53; Tóquio, Japão), por meio do aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tóquio, Japão). Posteriormente, foram examinadas na orientação transversal (aumento de 40x), onde para cada animal, foram analisadas 54 células usando-se o software Image - Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). As medidas constaram da área de secção transversa (AST) dos miócitos, dos percentuais de citoplasma, de núcleo, de vasos sanguíneos e de MEC, usando-se o software Image J (National Institutes of Health, EUA). Foram analisadas seis imagens aleatórias de cada animal. Os parâmetros avaliados foram determinados usando-se a técnica morfométrica, onde uma grade com 266 interseções foi sobreposta às imagens, as estruturas de interesse foram contadas e os dados foram expressos em porcentagem.

As lâminas coradas por picosirius red foram utilizadas para quantificar as fibras de colágeno tipo I e tipo III. As lâminas foram observadas em microscópio com luz polarizada (Olympus BX 53; Tokio, Japan). Dez imagens do VE foram capturadas, com aumento de 20x, usando-se uma câmera digital (Olympus DP 73; Tokio, Japan) e o aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tokio, Japan). As imagens foram analisadas usando-se o software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Foram analisadas seis imagens aleatórias de cada animal, na orientação transversal. Da mesma forma, os parâmetros avaliados foram determinados usando-se a técnica morfométrica, onde uma grade com 266 interseções foi sobreposta às imagens e as estruturas de interesse foram contadas. Nestas análises, utilizou-se a ferramenta “intensity range selection” para determinar as cores de interesse para as medições, após calibração. As fibras espessas, que sob luz polarizada manifestavam coloração laranja-vermelha, foram consideradas colágeno tipo I, enquanto a coloração azul-verde foi

considerada colágeno tipo III (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978). A média da área ocupada pelo colágeno foi dividida pela média da área total da imagem e os resultados calculados em porcentagem das fibras por área total.

A partir dos resultados do percentual de colágenos do tipo I e III, foi possível calcular a razão III:I, como índice de rigidez do miocárdio (JUGDUTT, 2003).

3.12. Análise de expressão gênica de biomarcadores no ventrículo esquerdo

As amostras dos VE (50 mg) foram homogeneizadas para isolar o RNA utilizando trizol (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). A pureza do RNA (260/280nm) e as concentrações (ng/mL) foram determinadas na espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e a integridade foi avaliada eletroforicamente por gel de agarose 1%, marcado com Nancy 520 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi realizada a quantificação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos genes beta-actina (β -actina), TNF, interleucina 10 (IL-10), ET-1, VEGF, colágeno tipo 1 (COL I) e colágeno tipo 3 (COL III).

A transcrição reversa (cDNA) foi realizada com 2 μ g de RNA total adicionado aos seguintes reagentes: oligo dT (0.5 μ g), RiboLockTM RNase inhibitor (20U), 1mM de dNTP Mix, RevertAidTM Reverse Transcriptase (200U), totalizando uma solução com volume final de 20 μ l (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Em seguida, foi incubada por 60 minutos à 42°C mais 10 minutos à 70°C, finalizando a transcrição reversa. A expressão gênica foi analisada por qRT-PCR, utilizando-se primers (Thermo Fisher Scientific, EUA) desenhados (Tabela 2) e Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher Scientific, EUA). A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foram feitas pelo sistema de detecção de sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 2. Sequência dos primers para a análise de reação em cadeia de polimerase em tempo real.

	Forward	Reverse
β -actina	ACCACAGGCATTGTTCTGGA	TAAGGTAGTCAGTGAGGTCC
COL IA1	AGAGAGCATGACCGATGGA	GAGGTTGCC AGT CTG TTG G
COL IIIA1	AAGGTCCACGAGGTGACAA	AGGGCCTGGACTACCAACT
TNF	TGGGCTACGGGCTTGTCCTC	GGGGGCCACCACGCTCTTC
IL-10	GAAGGACCAGCTGGACAACAT	CCTGGGGCATCACTTCTACC
VEGF-A	GTA CCT CCA CCA TGC CAA GT	GCA TTA GGG GCA CAC AGG AC
ET1	CGGGGCTCTGTAGTCAATGTG	CCA TGC AGA AAG GCG TAA AAG

Os resultados foram expressos usando-se o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e gene de interesse, com Ct gene – Ct gene normalizador. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse (DDCt) foi realizado por subtração da média do DCt do grupo controle para o correspondente DCt de cada amostra dos demais grupos, seguindo de $2(-DDCt)$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para fins representativos, os valores do grupo NS foram arbitrariamente definidos como 1. Nas correlações entre os resultados de expressão gênica e outras variáveis, utilizando os valores de $2(-DDCt)$, para que assim seja excluído a correção pelo grupo controle (HS).

O TNF (pró-inflamatório) e a IL-10 (anti-inflamatória) foram avaliados como biomarcadores inflamatórios no VE. O ET-1 (constricção) e o VEGF (relaxamento) foram analisados como os biomarcadores de função endotelial no VE (MOREIRA-GONCALVES; FERREIRA; FONSECA et al., 2015). As expressões do colágeno tipos I e III, foram medidas para verificar a expressão de biomarcadores de tecidos não contráteis. A β -actina foi utilizada como normalizador para todas as análises.

3.13. Avaliação da função contrátil dos miócitos isolados do ventrículo esquerdo

A função contrátil foi realizada em miócitos isolados do VE de oito animais de cada grupo, diferentes dos animais utilizados para a medida da massa do coração, ventrículo e suas razões, para não interferir na confiabilidade de ambas as medidas.

3.13.1. Isolamento dos miócitos do ventrículo esquerdo

Para o isolamento de cardiomiócitos, foi utilizado o método descrito anteriormente (RODRIGUES; PRÍMOLA-GOMES; SOARES et al., 2018). Após a eutanásia, o coração foi rapidamente removido por meio de toracotomia e lavado em solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 (Solução A, APÊNDICE) para a remoção do excesso de sangue. A seguir, o coração foi canulado em um sistema de perfusão (Langendorff adaptado) e perfundido com a solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 (Solução A, APÊNDICE 1), até que todos os vasos coronarianos estivessem completamente limpos. A perfusão foi, então, trocada por uma solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (Solução B, APÊNDICE 1), por 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os cardiomiócitos e a quelatação de Ca^{2+} . Após, o coração foi perfundido com uma solução enzimática contendo colagenase tipo II (Worthington, EUA), protease e CaCl_2 (Solução C, APÊNDICE 1), durante 5 a 10 minutos, para digestão da matriz extracelular. As soluções utilizadas foram oxigenadas (O_2 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de aproximadamente 36 °C.

Após a perfusão, os ventrículos direito e esquerdo foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka–Brasil, modelo AG 200). O VD foi removido e o VE isolado do septo interventricular. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram removidos manualmente do VE.

Em seguida, o VE foi colocado em frasco contendo 5 ml da solução enzimática (Solução C, APÊNDICE 1). Os frascos foram agitados moderadamente entre 5 a 10 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37 °C, sendo o conteúdo oxigenado (O_2 100% – White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo do frasco foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos na solução de isolamento, contendo 750 μM de CaCl_2 (Solução A, APÊNDICE 1). Esse processo de agitação do VE com solução enzimática, filtragem, centrifugação e suspensão em solução foi repetido de 2 a 3 vezes. Os cardiomiócitos isolados foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5 °C) até serem utilizados. As análises descritas a seguir foram realizados em até 3 horas após o isolamento.

3.13.2. Medida de contratilidade celular

As contrações dos miócitos isolados do VE foram medidas usando-se a técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos em um sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA), montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse –TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA) (Carneiro-Junior et al., 2014). Os cardiomiócitos acomodados em uma câmara experimental, banhados com solução Tyrode (ver APÊNDICE 1) em temperatura ambiente entre 30 e 35 °C e estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 V, duração de 5 ms) por um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA), utilizando-se um par de eletrodos de aço acoplado à câmara experimental. Cada frequência de estimulação foi realizada por 15 a 20 segundos, para que as células alcancem um estado estacionário de contração, sem contrações e oscilações espontâneas. Utilizou-se para mensuração das contrações somente os cardiomiócitos que estavam com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas.

A partir dos registros obtidos foi analisada a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a velocidade de contração e de relaxamento, por meio do programa IonWizard 6.3 (Ionoptix, EUA) (Figura 8). Para análise de cada frequência foram utilizadas seis curvas consecutivas de contração celular por célula.

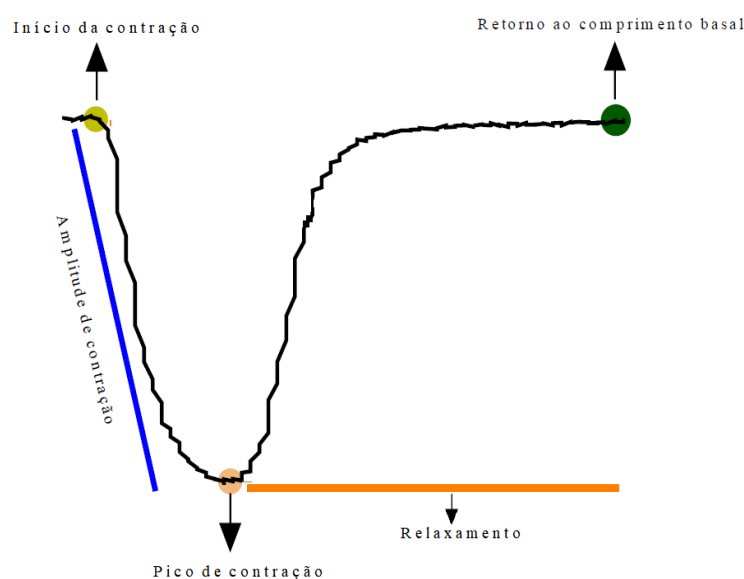


Figura 8. Traçado representativo da contração celular.

3.13.3. Mensuração do comprimento, largura e volume celular

Para análise das dimensões dos miócitos isolados do VE, foram utilizadas 60 células por grupo. Resumidamente, os miócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental e banhados com solução Tyrode (ver APÊNDICE 1) à temperatura ambiente (~30 a 35 °C). As imagens das células foram capturadas por uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) e visualizadas em um monitor de um microcomputador, com aumento de 400x, usando-se lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Para tal, utilizou-se um programa de captação de imagens (MVision 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, conforme ilustração abaixo (Figura 9).

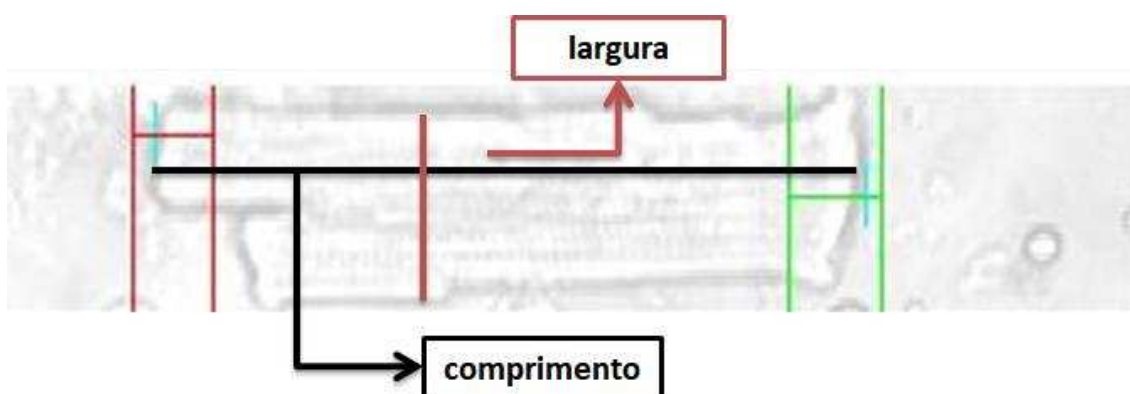


Figura 9. Imagem representativa da medida da largura (vermelho) e comprimento (preto) celular.

Para a realização das medições do comprimento e da largura dos cardiomiócitos, utilizou-se uma régua graduada. Somente foram escolhidas para as medições, as células que estavam em boas condições, com as bordas (direita/esquerda e superior/inferior) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentar contrações voluntárias. O volume celular, dado em picolitros, foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al., (1996):

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

3.13.4. Medidas do cálcio intracelular transiente

As medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transiente em miócitos isolados do VE foram feitas utilizando-se um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Os miócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} , permeável à membrana plasmática, Fura-2 ácido aminopolicarboxílico (Fura-2AM, ThermoFisher, Waltham, EUA). Esse marcador foi preparado em uma solução estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (50 μl de DMSO em 50 μg de Fura-2 AM). Adicionou-se 5 μl dessa solução em 2 ml de meio celular (Células suspensas na solução A, APÊNDICE 1) contidos em tubo Falcon, envolvido em folha de papel alumínio. A solução foi suavemente agitada em superfície plana por 10 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 segundos (3.000 rpm), removeu-se o sobrenadante e os cardiomiócitos foram novamente suspensos em 4 ml de solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 (Solução A, APÊNDICE 1). Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram colocados em repouso em um refrigerador (5° C) por 30 min.

Após o tempo no refrigerador, o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transiente foi medido utilizando-se um sistema de excitação dupla que detecta a fluorescência excitada por luz UV com comprimento de 340 e 380 nm (Ionoptix – EUA). Os miócitos isolados do VE incubados com Fura-2 foram acomodados em uma câmara experimental, banhados com solução Tyrode (ver APÊNDICE 1) em temperatura ambiente entre 30 e 35 °C e estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 V, duração de 5 ms) por um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA), utilizando-se um par de eletrodos de aço acoplado à câmara experimental. Cada frequência de estimulação foi realizada por 15 a 20 segundos, para que as células alcancem um estado estacionário de contração, sem contrações e oscilações espontâneas. Utilizou-se para mensuração das contrações somente os cardiomiócitos que estavam com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas. A emissão de fluorescência foi detectada entre 340 e 380 nm, por um tubo fotomultiplicador. A fluorescência registrada foi a razão entre as excitações de 340 e 380

nm (razão 340/380), usando-se o Software IonWizard 6.3 (Ionoptix, EUA). Todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado em uma sala escura.

Os parâmetros analisados foram a amplitude, a velocidade até o pico (velocidade compreendida desde a fluorescência basal até atingir à fluorescência máxima) e a velocidade de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ transiente (velocidade compreendida desde a fluorescência máxima até o retorno à fluorescência basal), conforme ilustrado na Figura 10. Para análise de cada frequência foram utilizadas seis curvas consecutivas de contração celular por célula.

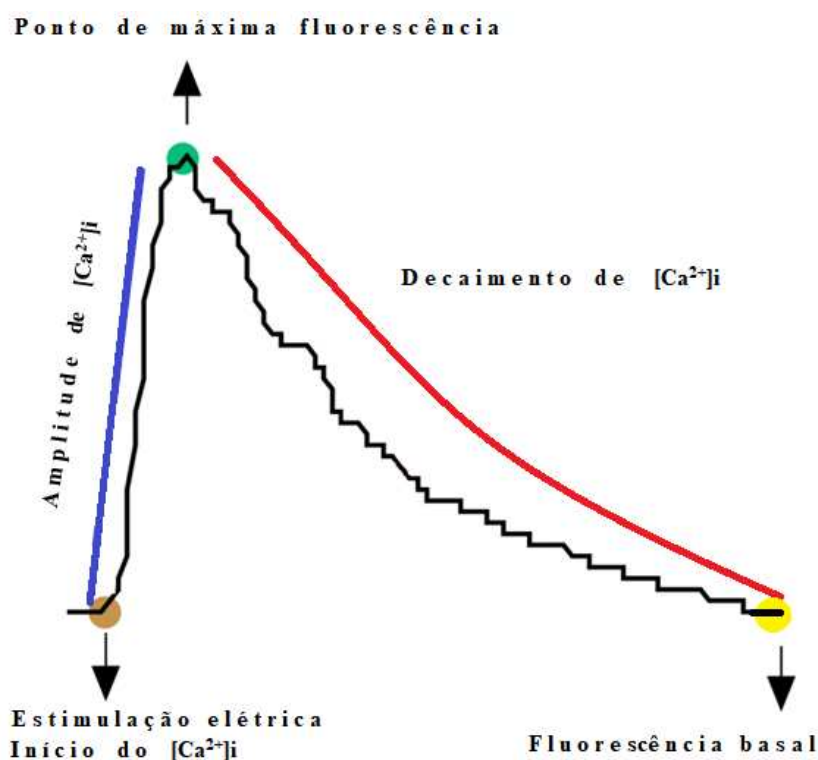


Figura 10. Traçado representativo do cálcio intracelular transiente.

3.14. Quantificação de proteínas do ventrículo esquerdo

Para a quantificação das proteínas de CaV1.2, do NCX1, da SERCA2a e da FLBt do VE, foram utilizadas amostras de seis animais para cada grupo. As amostras foram submetidas à extração de proteínas totais, onde foram homogeneizados mecanicamente na presença do tampão de lise (tampão RIPA (MERCK, EUA) enriquecido com inibidores de proteases (P2714; Sigma-Aldrich, EUA) e fosfatases (S6508; Sigma-

Aldrich, EUA). A quantificação das proteínas totais presentes em cada amostra foi feita utilizando o método de Lowry, conforme descrito anteriormente (LOWRY; ROSEBROUGH; FARR et al., 1951).

Em seguida, 70µg de proteínas foram separados por SDS/PAGE e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P; EMD Millipore, EUA), previamente sensibilizada. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (Ponceau S; AMRESCO, EUA), a fim de confirmar a eficácia da transferência. Foi realizado o bloqueio da membrana com leite em pó (5%) (Molico; Nestlé, Suíça) diluído em PBS-Tween 0,3% (Tween 20; AMRESCO, EUA) por 1 hora e, então, incubada overnight com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween 0,3%) com os seguintes anticorpos: anti-GAPDH (1:1000; sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), anti-CaV1.2 (1:200; sc-16229R, Santa Cruz Biotechnology), anti-NCX1 (1:500; sc-32881, Santa Cruz Biotechnology), anti-SERCA2A (1: 200, sc-8094, Santa Cruz Biotechnology) e anti-PLB total (1:2000; sc-393990, Santa Cruz Biotechnology)

Após incubação com o anticorpo primário, 3 lavagens de 5 minutos com PBS-Tween foram realizadas e os respectivos anticorpos secundários (também diluído em solução de 5% de leite em pó em PBS-Tween) adicionados. Após 1 horas de incubação, a membrana passou novamente por 3 lavagens com PBS-Tween e foi revelada por detecção quimioluminescente (Immobilon Forte Western HRP; MERCK) (ImageQuant LAS 4000; General Electric, EUA). As análises foram feitas através do software ImageJ e os níveis de proteína foram expressos como proporção das densidades ópticas. O GAPDH foi utilizado como normalizador para todas as análises.

3.15. Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software SigmaPlot[®], versão 12.3 (Systat Software, San Jose, CA). Inicialmente foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov, quando apropriado. Usou-se o teste t pareado para comparar a massa corporal inicial e final em cada grupo. As comparações de VC, PMC absoluto e relativo, FCR, PAS, PAD e PAM antes e após o período de TR foram realizadas por meio de ANOVA two way com medidas repetidas, seguida de teste post hoc de Tukey. As comparações entre os grupos dos valores de PMC, das massas do

coração e suas razões, assim como dos dados da ecocardiografia, da largura, comprimento e volume celular, do $[Ca^{2+}]_i$ e da contração celular, da análise da composição corporal, das análises histológicas, da expressão gênica do VE, e da expressão proteica do VE foram feitas usando ANOVA two way, seguida de teste post hoc de Tukey. Para obter o tamanho do efeito, foi calculado o índice d de Cohen para grupos emparelhados, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Cohen's } d = \frac{M1 - M2}{\sqrt{[d1^2 + d2^2/2]}}$$

Sendo:

M1: média do grupo tratamento.

M2: média do grupo controle.

d1: desvio-padrão do grupo tratamento.

d1: desvio-padrão do grupo controle.

Os valores de referência do tamanho do efeito foram: 0 a 0,19 = insignificante, 0,20 a 0,49 = pequeno, 0,50 a 0,79 = médio, 0,80 a 1,29 = grande; e >1,30 = muito grande (COHEN, 1988; ROSENTHAL, 1996). Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão e adotou-se o nível de significância estatística de 5%. Os números de animais, corações e miócitos usados foram apresentados nas figuras e tabelas.

4. RESULTADOS

A figura 11 apresenta o VC e os resultados dos testes de PMC. Durante o período de TR, o VC aumentou progressiva e significativamente, a partir da segunda semana, em ambos os grupos treinados, em comparação à semana 1 (Figura 11A; $p < 0,05$), porém, sem diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

Com relação ao PMC absoluto, não houve diferença entre os grupos antes do início do protocolo de TR (Figura 11B; $p > 0,05$). Após o período de TR, houve efeito do fator treinamento ($p = 0,007$), independente do fator hipertensão, onde os grupos treinados ($640,17 \pm 15,31$ g) obtiveram maior PMC que os grupos sem treinamento ($374,03 \pm 19,61$ g). Contudo, não houve efeito do fator hipertensão ($p > 0,05$), independente do fator TR, e não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

Com relação ao PMC relativo, não houve diferença entre os grupos antes do início do protocolo de TR (Figura 11C; $p > 0,05$). Após o período de TR, houve efeito do fator TR ($p = 0,007$), independente do fator hipertensão, pois os animais treinados ($1,97 \pm 0,07$ g/g) obtiveram maior PMC que os grupos sem treinamento ($1,08 \pm 0,06$ g/g). Porém, não houve efeito do fator hipertensão ($p > 0,05$), independente do fator TR. Também foi possível observar uma interação entre os fatores ($p < 0,001$), pois os animais grupo HT apresentaram maior PMC relativo que os grupos NT e HS, no momento pós-treinamento resistido (Figura 11C; tamanho do efeito: 1,6).

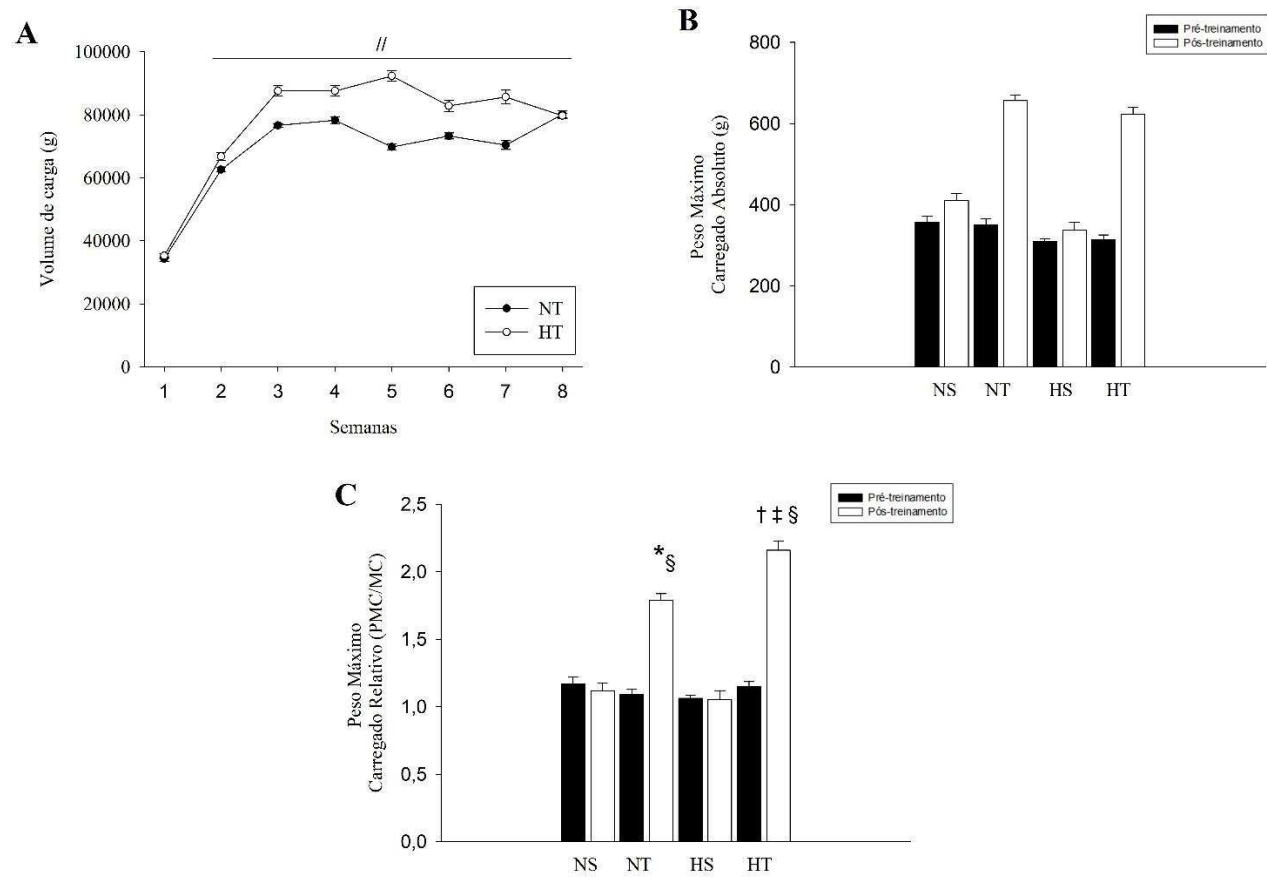


Figura 11. (A) Progressão do volume da carga de treinamento físico resistido. (B) Peso máximo carregado absoluto antes e após o período de treinamento físico resistido. (C) Peso máximo carregado relativo antes e após o período de treinamento físico resistido. Dados são média \pm EPM. $n = 15$ animais por grupo. NS: normotenso sem treinamento. NT: normotenso treinado: HS: hipertenso sem treinamento. HT: hipertenso treinado. Anova Two-Way para medidas repetidas, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT; § diferente respectivo pré-treinamento; // diferente respectiva semana 1 ($p < 0,05$).

4.1. Antropometria e conteúdo de lipídio.

A tabela 3 mostra os dados de MC, composição corporal e antropometria dos animais experimentais. O efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, foi demonstrado em quatro variáveis, pois os animais hipertensos apresentaram menor MC inicial ($288,00 \pm 7,69$ g) e final ($313,14 \pm 7,38$ g), CA ($13,67 \pm 0,17$ cm), CT ($14,98 \pm 0,27$ cm) e relação CA/CT ($0,91 \pm 0,01$ cm), quando comparado aos normotensos (MC inicial: $311,56 \pm 5,97$ g; MC final: $344,56 \pm 8,49$ g; CA: $17,75 \pm 0,38$ cm; CT: $16,00 \pm 0,38$ cm; relação CA/CT: $1,12 \pm 0,03$ cm).

Houve efeito do TR, independente do fator doença ($p < 0,05$), pois os animais treinados apresentaram menor MC final ($318,80 \pm 9,39$ g), IMC ($0,60 \pm 0,01$ g/cm²) e CT ($14,93 \pm 0,29$ cm) que os animais sem treinamento (MC final: $341,00 \pm 7,56$ g; IMC: $0,63 \pm 0,01$ g/cm²; CT: $16,12 \pm 0,36$ cm).

Adicionalmente, houve interação entre os fatores para MC inicial e final, uma vez que os animais HT apresentaram menor MC, em comparação aos grupos NT e HS (Tabela 3; $p < 0,05$).

Tabela 3. Massa corporal, composição corporal e antropometria.

	NS	NT	HS	HT	p fator hipertensão	TE fator hipertensão	p fator treinamento	TE fator treinamento	Interação entre fatores	TE interação entre fatores
MC inicial, g	317,63 ± 5,29	305,50 ± 10,22	293,57 ± 11,60*	282,43 ± 11,38 ^{†‡}	<0,001	-1,59	0,409	0,45	0,006	-1,18
MC final, g	357,00 ± 6,55	332,13 ± 14,23	322,71 ± 11,13*	303,57 ± 9,92 ^{†‡}	<0,001	-4,41	0,005	-0,27	0,05	-2,6
IMC (g/cm ²)	0,66 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,054	-1,07	0,039	-1,11	0,199	-0,40
CA (cm)	17,80 ± 0,62	17,70 ± 0,44	14,03 ± 0,26	13,31 ± 0,14	<0,001	-2,82	0,354	-0,07	0,483	-1,28
CT (cm)	16,51 ± 0,57	15,49 ± 0,43	15,67 ± 0,39	14,29 ± 0,19	0,027	-0,62	0,010	-0,71	0,682	-1,78
Relação CA/CT (cm)	1,09 ± 0,06	1,14 ± 0,02	0,90 ± 0,01	0,93 ± 0,01	<0,001	-1,54	0,216	0,42	0,802	1,24
Conteúdo de Lipídio (mg)	41,70 ± 4,86	33,71 ± 4,26	34,10 ± 3,80	36,44 ± 5,41	0,548	-0,63	0,604	0,62	0,275	0,19
% de gordura	11,68 ± 1,37	10,09 ± 1,07	10,70 ± 1,36	11,99 ± 1,79	0,748	-0,26	0,916	0,46	0,314	0,31

Dados são apresentados como média ± EPM de quinze a dezesseis animais de cada grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. TE: Tamanho do efeito. MC, massa corporal; CA, circunferência abdominal. CT, circunferência torácica. IMC, índice de massa corporal. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT (p < 0,05).

4.2. Pressão arterial e frequência cardíaca de repouso.

Quanto à PA, houve efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, pois os animais hipertensos apresentaram maior PAS (pré: $168,79 \pm 4,02$ mmHg; pós: $174,39 \pm 2,80$ mmHg), PAD (pré: $118,96 \pm 3,66$ mmHg; pós: $121,43 \pm 3,85$ mmHg) e PAM (pré: $135,54 \pm 3,11$ mmHg; pós: $139,39 \pm 2,78$ mmHg) que os animais normotensos [PAS (pré: $130,89 \pm 2,00$ mmHg; pós: $127,32 \pm 2,24$ mmHg); PAD (pré: $88,04 \pm 2,96$ mmHg; pós: $90,46 \pm 3,22$ mmHg) e PAM (pré: $102,39 \pm 2,26$ mmHg; pós: $103,29 \pm 2,74$ mmHg)], tanto no momento pré, quanto no pós-treinamento físico resistido (Figuras 12B, 12C e 12D, respectivamente).

Não foi observado efeito do fator hipertensão ou do fator TR, independentes um do outro, e não houve interação entre os fatores para a FCR, tanto no momento pré quanto no momento pós-treinamento físico resistido (Figura 12A; $p > 0,05$). Também, não foram observadas diferenças entre os grupos para os momentos pré e pós-treinamento físico resistido. Todavia, não foi observado efeito do fator TR sobre a PAS, a PAD e PAM (Figuras 12B, 12C e 12D; $p > 0,05$), independente do fator hipertensão, bem como não houve interação entre os fatores sobre esses parâmetros, tanto no momento pré quanto no pós-treinamento físico resistido.

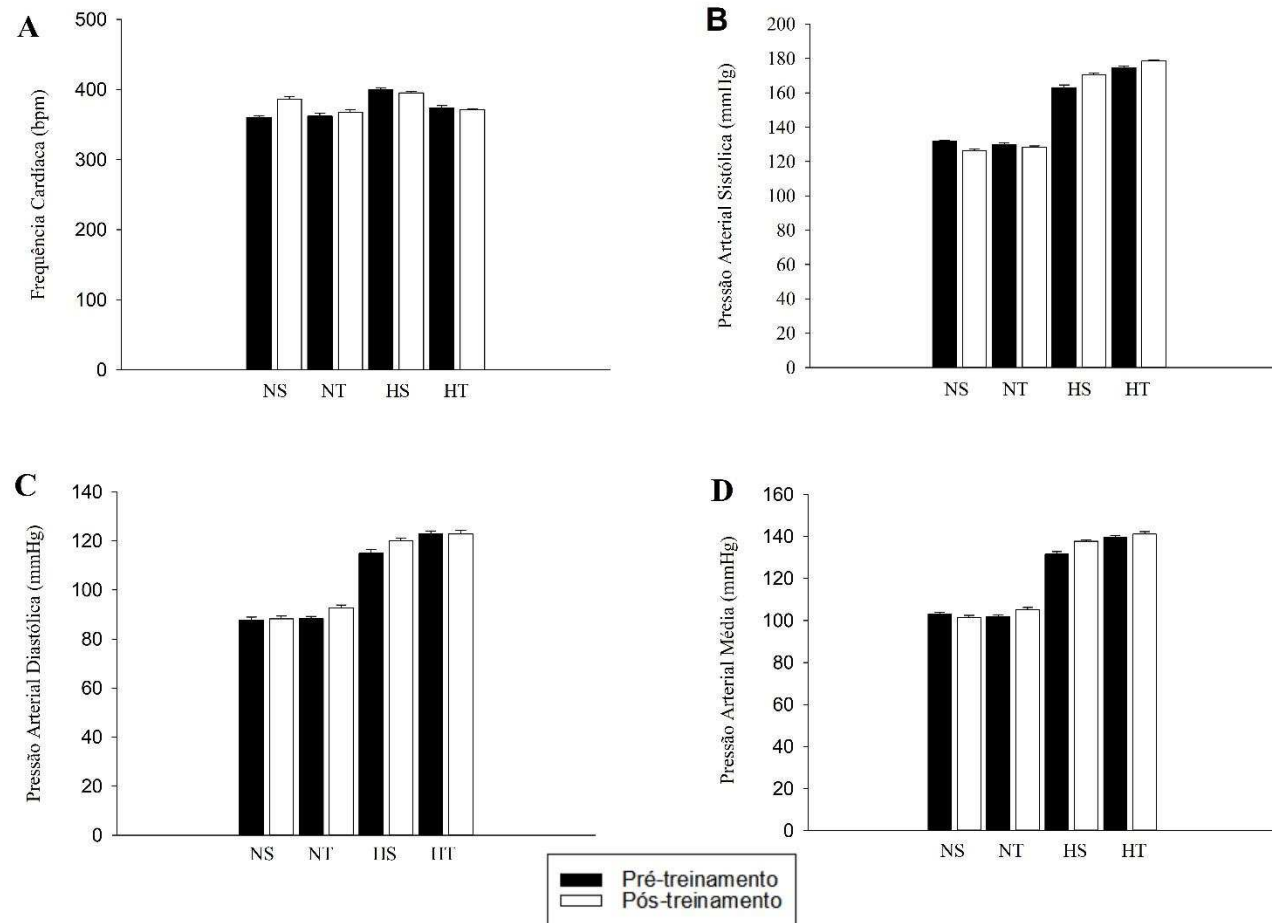


Figura 12. Frequência cardíaca (A). Pressão arterial sistólica (B). Pressão arterial diastólica (C). Pressão arterial média (D) dos grupos experimentais antes (pré) e após (pós) o treinamento físico resistido. Dados são média \pm EPM. $n = 14$ animais em cada grupo. N NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. Anova Two-Way.

4.3. Massa do coração, massa dos ventrículos e razões

A tabela 4 mostra a MCor, a MV e suas razões. Houve efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, na MV, MVD e MV:MCor, pois os animais hipertensos apresentaram menores valores de MV ($1,14 \pm 0,03$ g), e maiores valores de MVD ($0,20 \pm 0,02$ g) e MV:MCor ($3,85 \pm 0,15$ g), em relação aos normotensos (MV: $1,15 \pm 0,06$ g; MVD: $0,23 \pm 0,01$ g; e MV:MCor: $3,00 \pm 0,04$ g).

Quanto ao TR, foi observado seu efeito, independente do fator hipertensão, para a MCor e a MVD ($p < 0,05$). Os animais treinados apresentaram maiores valores de MCor ($1,36 \pm 0,02$ g) e menores valores de MVD ($0,24 \pm 0,01$ g), em relação aos sem treinamento (MCor: $1,29 \pm 0,01$ g; MVD: $0,18 \pm 0,01$ g).

Adicionalmente, foi demonstrada interação ($p < 0,05$) entre os fatores para duas variáveis: MVE e MVE:Mcor. Os animais do grupo HT apresentaram maiores MVE e MVE:MCor, em relação aos grupos NT e HS. Cabe ressaltar uma tendência de interação entre os fatores para a variável MVD, com uma maior MVD no grupo HT em relação ao grupo HS, com tamanho do efeito muito grande.

Tabela 4. Massa do coração, dos ventrículos e razões.

	NS	NT	HS	HT	p fator hipertensão	TE fator hipertensão	p fator treinamento	TE fator treinamento	Interação entre fatores	TE interação entre fatores
Mcor, g	1,31 ± 0,02	1,33 ± 0,03	1,28 ± 0,02	1,40 ± 0,03	0,471	-0,60	0,045	0,37	0,092	1,62
MV, g	1,15 ± 0,02	1,16 ± 0,03	1,06 ± 0,01*	1,20 ± 0,05†	0,037	-2,01	0,354	0,25	0,071	1,49
MVD, g	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,14 ± 0,01*	0,26 ± 0,02†	0,022	-3,10	0,010	-0,28	0,001	2,48
MS, g	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,350	1,82	0,467	1,06	0,113	-0,81
MVE, g	0,70 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,83 ± 0,04‡	0,713	-2,07	0,004	-0,32	<0,001	2,81
MV: Mcor, g	2,96 ± 0,06	3,04 ± 0,06	3,31 ± 0,04	4,32 ± 0,15	0,010	-1,7	0,219	-0,15	0,253	2,22
MVE: Mcor, g	0,538 ± 0,06	0,524 ± 0,04	0,477 ± 0,03	0,587 ± 0,016‡	0,720	-2,31	0,050	-0,05	<0,001	0,77
MVE: tíbia, g/cm	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,016 ± 0,000	0,021 ± 0,001	0,386	-2,50	0,001	0,44	0,24	1,77

Dados são apresentados como média ± EPM de oito animais de cada grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. TE, Tamanho do efeito. MC, massa corporal; MCor, massa do coração; MV, massa dos ventrículos; MVE, massa do ventrículo direito; MS: Massa do septo interventricular; MVE, massa do ventrículo esquerdo. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT (p < 0,05).

4.4. Ecocardiografia

Os dados da ecocardiográfica estão apresentadas na tabela 5. Foi observado efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, foi demonstrado para ESIS, fração de ejeção, fração de encurtamento e DIVES, pois os animais hipertensos apresentaram menores valores de ESIS: ($2,06 \pm 0,09$ mm), de fração de ejeção: ($63,75 \pm 1,40$ %) e de fração de encurtamento: ($30,44 \pm 0,96\%$), além de maiores valores do DIVES ($5,02 \pm 0,15$ mm), comparados aos normotensos (ESIS: ($2,49 \pm 0,11$ mm); fração de ejeção: ($80,88 \pm 1,47$ %); fração de encurtamento: ($44,94 \pm 1,50$ %); e DIVES: ($3,75 \pm 0,14$ mm).

Não houve efeito do fator TR ($p > 0,05$), independente do fator hipertensão, sobre nenhum destes parâmetros avaliados. Todavia, houve interação entre os fatores, pois o grupo HT apresentou menor valor de fração de ejeção que o grupo NT, e maior valor dessa fração, em comparação ao HS.

Tabela 5. Dados da ecocardiografia dos animais normotensos e hipertensos.

	NS	NT	HS	HT	p fator hipertensão	TE fator hipertensão	p fator treinamento	TE fator treinamento	Interação entre fatores	TE interação entre fatores
ESId (mm)	2,20 ± 0,14	2,18 ± 0,15	2,24 ± 0,16	2,05 ± 0,13	0,764	0,09	0,468	-0,06	0,578	-0,46
ESIs (mm)	2,56 ± 0,33	2,41 ± 0,19	2,11 ± 0,17	2,00 ± 0,08	0,006	-1,10	0,370	-0,34	0,898	0,30
DIVEd (mm)	6,73 ± 0,24	6,91 ± 0,36	7,46 ± 0,19	7,00 ± 0,21	0,597	1,22	0,120	0,22	0,217	-0,83
DIVEs (mm)	3,73 ± 0,21	3,78 ± 0,20	5,31 ± 0,16	4,73 ± 0,21	<0,001	3,44	0,180	0,09	0,114	-1,13
EPVEd (mm)	2,41 ± 0,14	2,25 ± 0,15	2,48 ± 0,22	2,03 ± 0,12	0,621	0,14	0,700	-0,51	0,384	0,91
EPVEs (mm)	3,25 ± 0,22	3,13 ± 0,17	2,98 ± 0,17	2,76 ± 0,17	0,090	-0,5	0,368	-0,23	0,814	-0,44
Fração de Ejeção (%)	80,38 ± 2,4	81,38 ± 1,85	60,88 ± 1,75*	66,63 ± 1,72†‡	<0,001	-3,28	0,095	0,16	0,047	1,17
Fração de Encurtamento (%)	44,63 ± 2,49	45,25 ± 1,85	28,75 ± 1,13	32,13 ± 1,36	<0,001	-2,91	0,272	0,10	0,447	0,96

Dados são média ± EPM de oito animais em cada grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. TE, Tamanho do efeito. ESId, Espessura do septo interventricular na diástole. ESIs, Espessura do septo interventricular na sístole. DIVEd, Dimensão interna do VE na diástole. DIVEs, Dimensão interna do VE na sístole. EPVEd, Espessura da parede ventricular esquerda na diástole. EPVEs, Espessura da parede ventricular esquerda na sístole. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey.* diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT (p < 0,05).

4.5. Dimensões dos miócitos do ventrículo esquerdo

4.5.1. Largura, comprimento e volume celular

Os dados das dimensões dos miócitos isolados do VE estão apresentados na figura 13. Houve efeito do fator hipertensão, independente do fator TR, para largura celular (Fig. 13B; $p = 0,025$; tamanho do efeito: 0,38) e razão comprimento:largura celular (Fig. 13C; $p = 0,025$; tamanho do efeito: -0,27), pois os animais hipertensos apresentaram maior largura celular ($25,02 \pm 0,57 \mu\text{m}$) e menor razão comprimento:largura celular ($4,50 \pm 0,13 \mu\text{m}$), em comparação aos normotensos (largura celular: $23,48 \pm 0,51 \mu\text{m}$; razão comprimento:largura celular: $4,88 \pm 0,14 \mu\text{m}$). Entretanto, não foi observado esse efeito no comprimento (Fig. 13A; $p = 0,09$) e no volume celular (Fig. 13D; $p = 0,427$).

Não houve efeito do TR, independente do fator hipertensão, e não houve interação entre os fatores para estas dimensões celulares analisadas ($p > 0,05$).

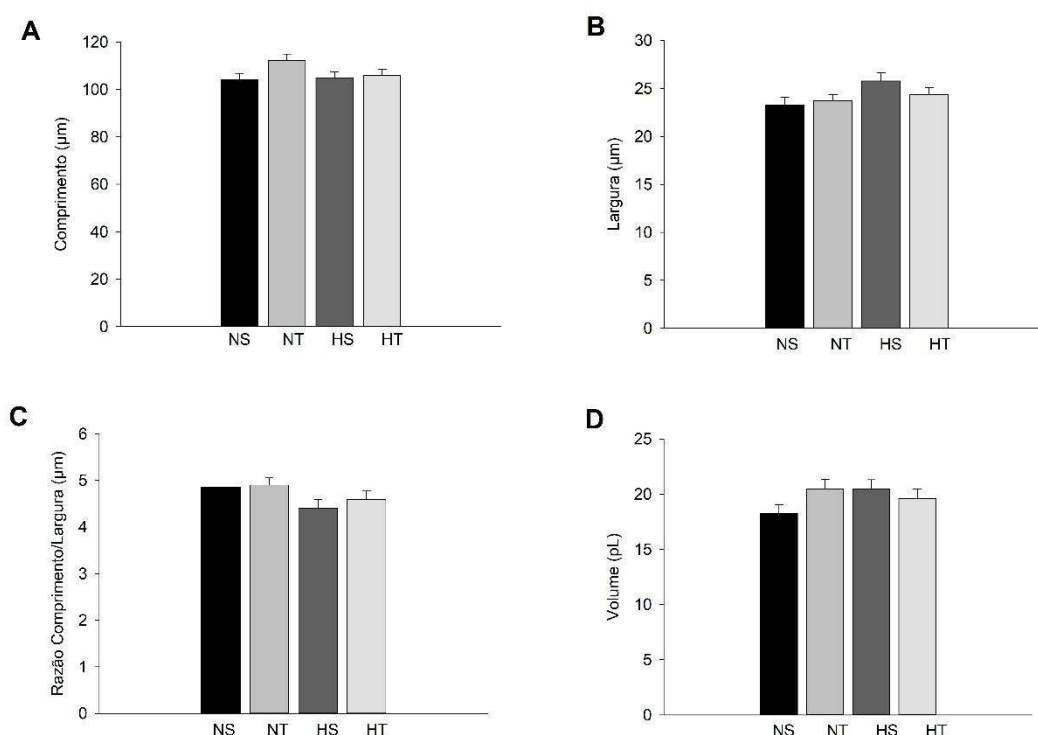


Figura 13. Largura, comprimento e volume celular de miócitos isolados do ventrículo esquerdo. (A) Comprimento celular. (B) Largura celular. (C) Razão comprimento/largura celular. (D) Volume celular. Os dados são média \pm EPM (60 a 65 células de 7 animais por grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way.

4.5.2. Área de secção transversa

A figura 14 apresenta fotomicrografias representativas de cortes histológicos do VE, com orientação transversal.

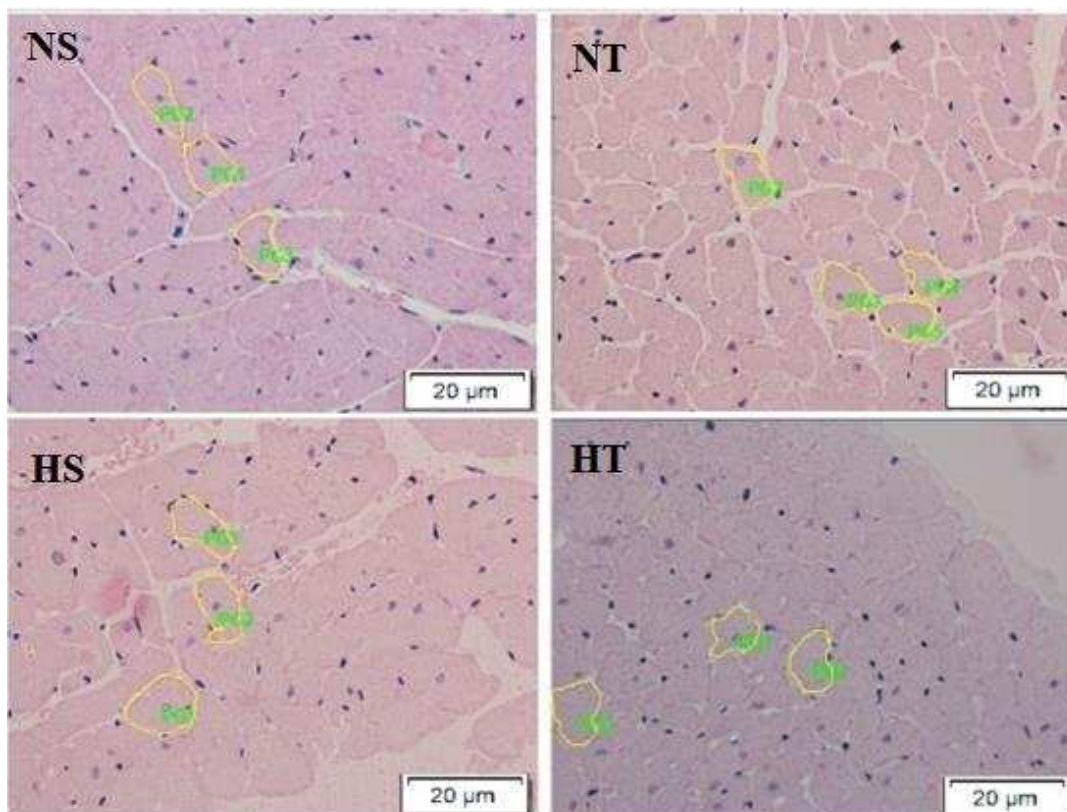


Figura 14. Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo, corado com H & E. Áreas circundadas em amarelo indicam cardiomiócitos. Barra = 20 µm. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado.

A figura 15 demonstra os valores da AST apresentados pelos grupos experimentais. Houve efeito do fator hipertensão sobre a AST, independente do fator TR, pois os animais hipertensos apresentaram maior AST ($600,83 \pm 9,28 \mu\text{m}^2$) que os animais normotensos ($547,83 \pm 7,88 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$; tamanho do efeito = 0,79).

Houve efeito do fator TR sobre a AST, independente do fator hipertensão, pois os animais treinados apresentaram maior AST ($576,29 \pm 8,60 \mu\text{m}^2$), comparados aos animais

sem treinamento ($571,78 \pm 8,93 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$; tamanho do efeito = 0,46). Porém, não foi demonstrada a interação entre os fatores TR e doença ($p < 0,05$).

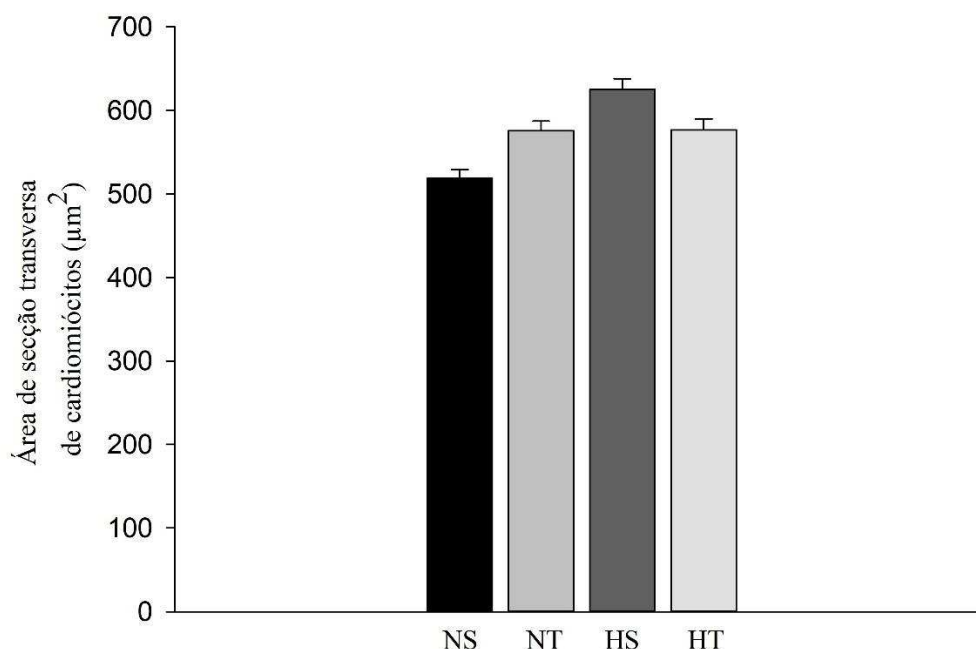


Figura 15. Área de secção transversa de miócitos do ventrículo esquerdo. Os dados são média \pm erro padrão da média (10 lâminas por animal de 8 animais por grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. ANOVA two way.

4.5.3. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo esquerdo

Os parâmetros histomorfométricos avaliados no VE estão apresentados na tabela 6. Houve efeito do fator doença ($p < 0,05$), independente do fator TR, para as fibras de colágeno, onde os animais hipertensos apresentaram menor percentual de colágeno tipo III ($0,64 \pm 0,09\%$) e razão III:I ($0,48 \pm 0,12\%$) que os normotensos (percentual de colágeno tipo III: $0,79 \pm 0,10\%$; e razão colágeno III:I: $0,67 \pm 0,11\%$).

Houve efeito do fator TR, independente da hipertensão, para o percentual de núcleos e de colágeno tipo I ($p < 0,05$), pois os animais treinados apresentaram menor percentual de núcleos ($4,57 \pm 0,22\%$) e de colágeno tipo I ($0,84 \pm 0,08\%$) que os sem treinamento (% de núcleos: $5,06 \pm 0,24\%$; % de colágeno tipo I: $1,33 \pm 0,14\%$).

Adicionalmente, houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois os animais HT apresentaram menores MEC e colágeno tipo I, mas maiores percentuais de colágeno tipo III e razão III:I, comparados aos dos grupos HS e NT. Cabe ressaltar também que os animais HT apresentaram menores percentuais de núcleo comparados aos do grupo HS .

Tabela 6. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo esquerdo.

	NS	NT	HS	HT	p fator hipertensão	TE fator hipertensão	p fator treinamento	TE fator treinamento	Interação entre fatores	TE interação entre fatores
Citoplasma (%)	85,42 ± 0,54	86,21 ± 0,54	85,46 ± 0,70	87,51 ± 0,72	0,395	0,00	0,075	0,15	0,425	2,05
Núcleo (%)	4,55 ± 0,20	4,68 ± 0,19	5,58 ± 0,26*	4,46 ± 0,24†	0,070	0,30	0,026	0,13	0,006	-1,12
Matriz Extracelular (%)	6,55 ± 0,81	7,03 ± 0,48	7,66 ± 0,65	5,47 ± 0,56†‡	0,732	0,21	0,181	0,48	0,039	-2,19
Vasos sanguíneos (%)	0,10 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,11	0,07 ± 0,07	0,654	-0,70	0,823	-0,06	0,264	0,04
Colágeno Tipo I (%)	1,31 ± 0,18	0,94 ± 0,13	1,33 ± 0,24	0,74 ± 0,09†	0,558	0,01	0,004	-0,37	0,015	-0,58
Colágeno Tipo III (%)	0,93 ± 0,14	0,67 ± 0,15	0,48 ± 0,13*	0,79 ± 0,12†‡	0,02	-0,53	0,814	-0,27	0,036	0,31
Colágeno Total (%)	2,24 ± 0,25	1,61 ± 0,24	1,81 ± 0,27	1,54 ± 0,16	0,269	-0,22	0,051	0,64	0,429	-0,27
Razão III:I (%)	0,71 ± 0,16	0,67 ± 0,18	0,15 ± 0,06*	0,83 ± 0,23†	0,019	0,83	0,059	-0,04	0,035	0,68

Os dados são média ± EPM (seis lâminas por animal de seis animais por grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. TE: Tamanho do efeito. Razão III:I: Razão entre os colágenos do tipo III e do tipo I. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT (p < 0,05).

4.6. Expressão gênica de biomarcadores no ventrículo esquerdo

A figura 16 apresenta os valores da expressão gênica dos biomarcadores de tecidos não contráteis (colágeno dos tipos I e III) no VE. Não foram observados efeitos da hipertensão ($p > 0,05$), independente do fator TR, na expressão gênica de colágeno tipo I (Figura 16A) e de colágeno tipo III (Figura 16B).

Não houve efeito do fator TR ($p > 0,05$), independente da doença, na expressão gênica de colágeno tipo I e de colágeno tipo III. Ademais, não houve interação entre os fatores doença e TR ($p > 0,05$) nestes parâmetros.

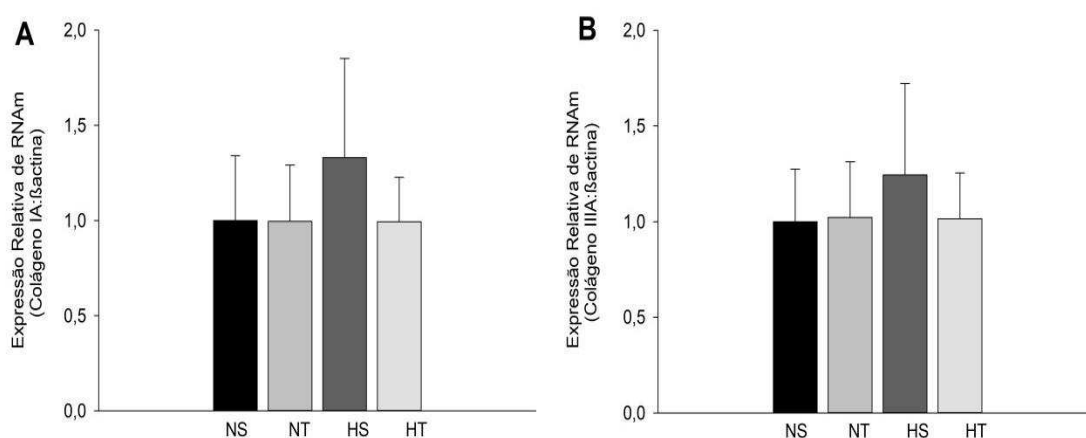


Figura 16. Expressão relativa de mRNA de colágeno no ventrículo esquerdo. A) Colágeno tipo I. B) Colágeno tipo III. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way.

A figura 17 apresenta os valores da expressão gênica dos biomarcadores inflamatórios no VE. Não houve efeito da hipertensão ($p < 0,05$), independentes do fator TR, na expressão gênica do TNF- α (Figura 17A) e da IL-10 (Figura 17B).

Da mesma forma, não foi observado efeito do fator TR, independente do fator hipertensão na expressão gênica do TNF- α e da IL-10. Adicionalmente, não houve interação entre os fatores doença e TR para a expressão gênica destes biomarcadores.

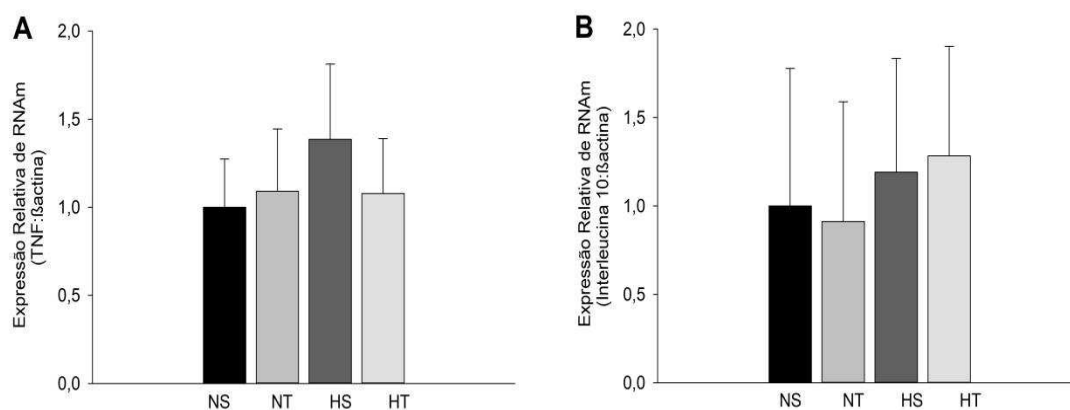


Figura 17. Expressão relativa de mRNA de biomarcadores inflamatórios no ventrículo esquerdo. A) Fator de necrose tumoral. B) Interleucina 10. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way.

A figura 18 apresenta os valores da expressão gênica dos biomarcadores da função endotelial no VE. Não houve efeito da doença ($p < 0,05$), independente do fator TR, na expressão gênica do VEGF (Figura 18A) e da ET-1 (Figura 18B).

Não foi observado efeito do fator TR ($p < 0,05$), independente do fator doença, na expressão gênica do VEGF e da ET-1. Ademais, não houve interação entre os fatores doença e TR ($p < 0,05$) na expressão destes biomarcadores.

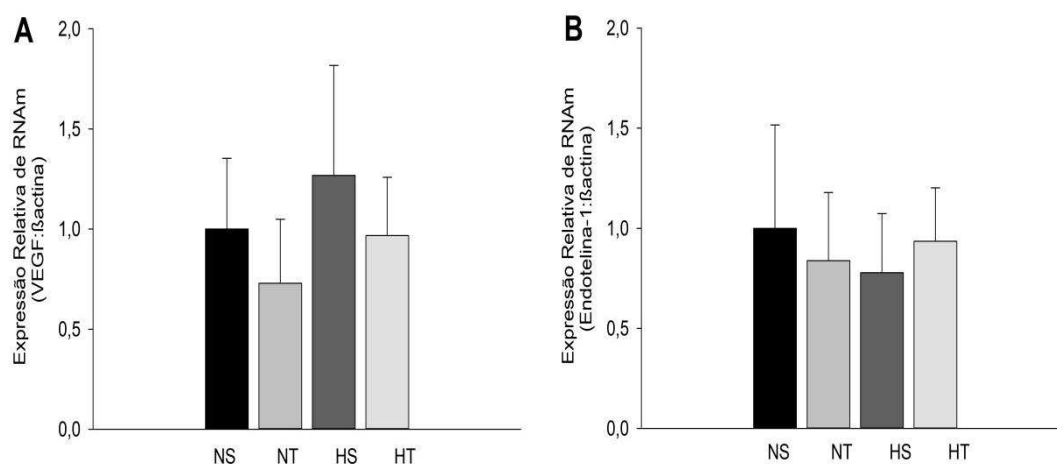


Figura 18. Expressão relativa de mRNA de biomarcadores da função endotelial no ventrículo esquerdo. (A) Fator de crescimento vascular endotelial. (B) endotelina 1. Os dados são média \pm EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way.

4.7. Cálcio intracelular transiente

Os parâmetros do $[Ca^{2+}]_i$ transiente em miócitos isolados de VE são mostrados na Figura 19. O efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, foi demonstrado, pois a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente (Figura 19A; Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,43; 3 Hz: 0,71; 5 Hz: 0,35; e 7 Hz: 0,66), e a velocidade até o pico (Figura 19B, Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,41; 3 Hz: 0,63; 5 Hz: 0,33; e 7 Hz: 0,45), em todas as frequências analisadas, foi maior nos animais hipertensos que nos normotensos.

Houve efeito do fator TR sobre esses parâmetros ($p < 0,05$), independente do fator hipertensão, pois os animais treinados apresentaram maior amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente (Figura 19A; Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,20; e 7 Hz: 0,48) e maior velocidade até o pico do $[Ca^{2+}]_i$ transiente (Figura 19B; Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,10; e 7 Hz: 0,40), comparados aos animais sem treinamento.

Adicionalmente, houve interação entre os fatores ($p < 0,05$) nos três parâmetros, em todas as frequências analisadas, com maior amplitude (Figura 19A, $p < 0,05$; Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,72; 3 Hz: 0,57; 5 Hz: 0,76; 7 Hz: 0,88), velocidade até o pico (Figura 19B, $p < 0,05$; Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,31; 3 Hz: 0,25; 5 Hz: 0,71; 7 Hz: 0,75) e velocidade de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ transiente (Figura 19C, $p < 0,05$; Tamanho do efeito: 1 Hz: 1,51; 3 Hz: 1,11; 5 Hz: 1,18; 7 Hz: 1,28) no grupo HT, em comparação aos grupos HS e NT.

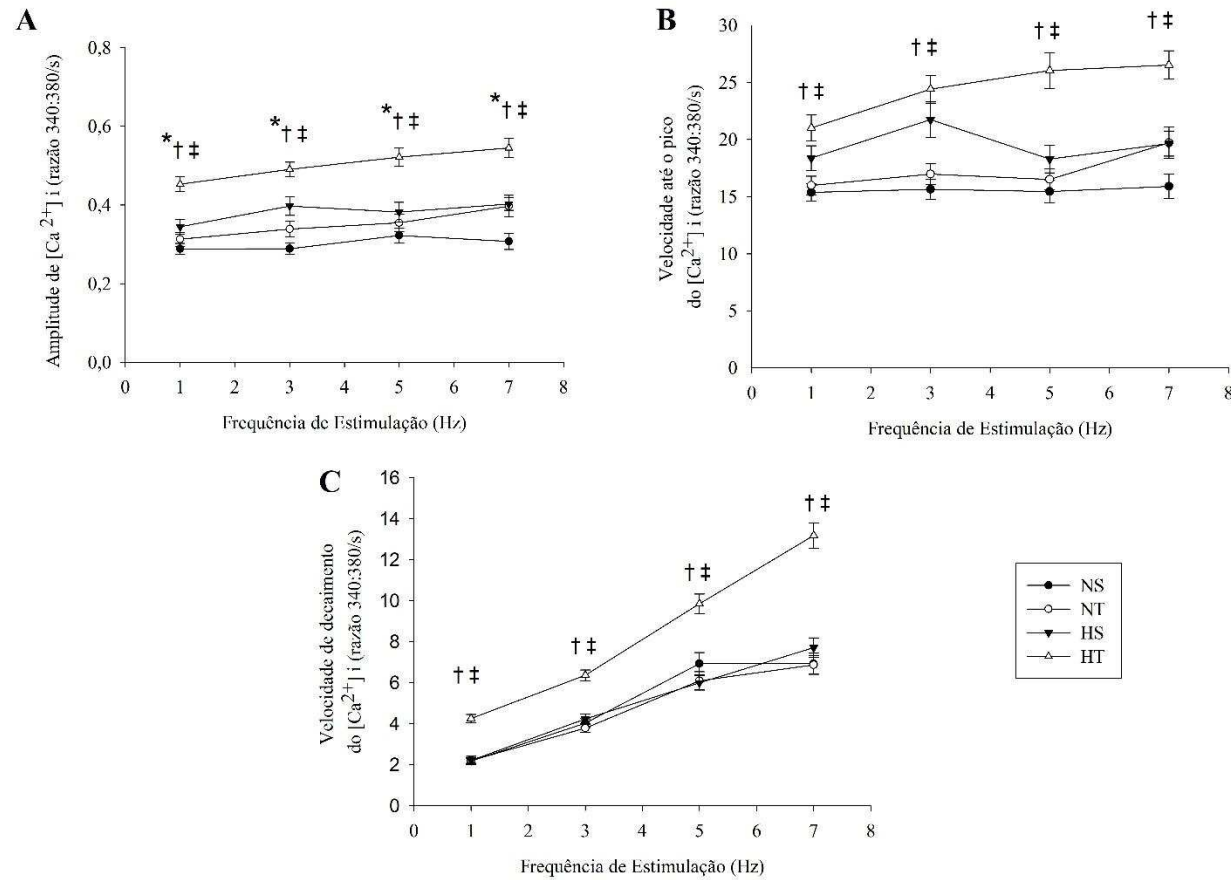


Figura 19. Cálcio intracelular transiente. A) Amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente; B) Velocidade até o pico de $[Ca^{2+}]_i$ transiente; C) Velocidade máxima de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ transiente. Dados são média \pm EPM de 60 células por grupo (n= 6 animais em cada grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT (p < 0,05).

4.8. Contratilidade Celular

Os parâmetros da contração dos miócitos isolados de VE são mostrados na Figura 20. Foi observado efeito do fator hipertensão ($p < 0,05$), independente do fator TR, pois a amplitude de contração, em todas as frequências analisadas (Figura 20A, Tamanho do efeito: 1 Hz: 1,14; 3 Hz: 0,89; 5 Hz: 0,69; e 7 Hz: 0,64), a velocidade de contração na frequência de 1 Hz (Figura 20B, Tamanho do efeito: 0,89) e a velocidade de relaxamento na frequência de 1 Hz (Figura 20C, Tamanho do efeito: 0,40) foram maiores nos animais hipertensos que nos normotensos.

O efeito do fator TR ($p < 0,05$), independente do fator doença, foi demonstrado nos três parâmetros em todas as frequências analisadas, com maior amplitude (Figura 20A. Tamanho do efeito: 1 Hz: 1,16; 3 Hz: 0,80; 5 Hz: 0,76; e 7 Hz: 0,74), velocidade de contração (Figura 20B. Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,83; 3 Hz: 0,54; 5 Hz: 0,82; 7 Hz: 0,67) e velocidade de relaxamento celular (Figura 20C. Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,69; 3 Hz: 0,61; 5 Hz: 0,80; 7 Hz: 0,58) nos miócitos dos animais treinados, comparados aos dos animais sem treinamento.

Houve, também, interação entre os fatores doença e TR ($p < 0,05$), pois as velocidades de contração (Figura 20B. Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,68; 3 Hz: 1,04; 5 Hz: 0,88; e 7 Hz: 0,91) e de relaxamento celular (Figura 20C. Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,62; 3 Hz: 0,97; 5 Hz: 0,81; e 7 Hz: 0,57) foram maiores no grupo HT, em comparação aos grupos HS e NT. Cabe ressaltar que a amplitude (Figura 20A. Tamanho do efeito: 1 Hz: 0,62; 3 Hz: 0,97; 5 Hz: 0,81; e 7 Hz: 0,57) foi maior no grupo HT, em comparação ao grupo HS.

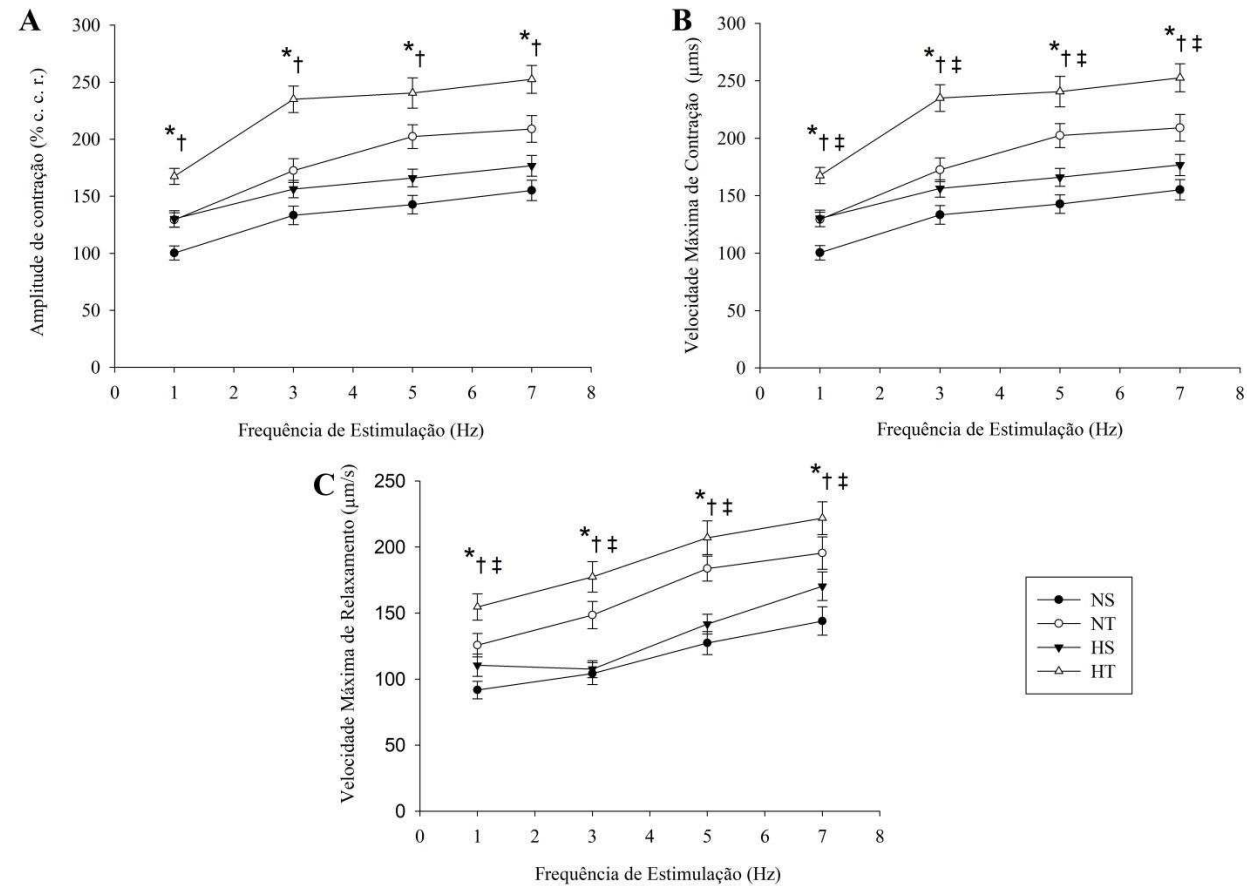


Figura 20. Contratilidade Celular. A) Amplitude da contração. B) Velocidade de contração. C) Velocidade de relaxamento. Dados são média \pm EPM de 60 células por grupo (n= 7 animais em cada grupo). NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso com treinamento. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso com treinamento. Anova Two-Way, seguida do teste post hoc de Tukey. * diferente NS; † diferente HS; ‡ diferente NT ($p < 0,05$).

4.9. Expressão proteica no ventrículo esquerdo

A figura 21 apresenta os valores da expressão proteica do VE. Houve efeito da hipertensão ($p < 0,05$; tamanho de efeito: 0,15), independente do fator TR, pois a expressão de FLBt no foi menor nos animais hipertensos ($0,91 \pm 0,03$) que nos normotensos ($0,95 \pm 0,05$) (Figura 21D). Contudo, esse efeito do fator doença não foi observado ($p > 0,05$) nas demais proteínas analisadas: CAV1.2 (Figura 21A), NCX1 (Figura 21B), SERCA2a (Figura 21C) e razão FLBt/SERCA2a (Figura 21E).

Entretanto, não foi observado efeito do TR ($p < 0,05$), independente do fator hipertensão, em nenhuma das proteínas analisadas: CAV1.2, NCX1, SERCA2a, FLBt e razão FLBt/SERCA2a. Também não houve interação entre os fatores doença e TR ($p > 0,05$) para as proteínas analisadas.

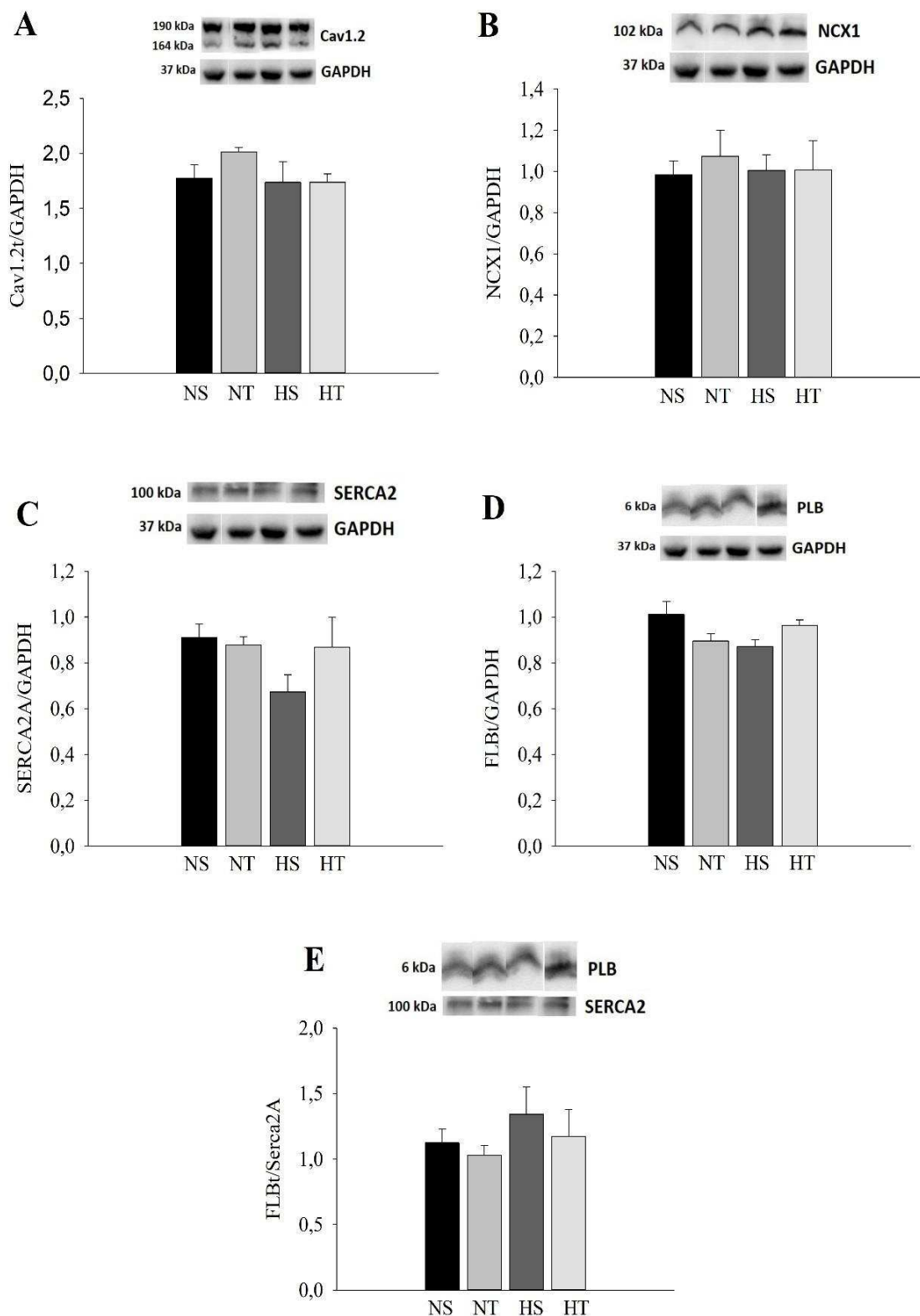


Figura 21. Expressão proteica do ventrículo esquerdo. A) Canal de cálcio do tipo L 1.2 (CaV1.2). B) Canal trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX1). C) Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático 2a (SERCA2a). D) Fosfolambam total (FLBt). E) Razão FLBt/SERCA2a. Os dados são média ± EPM de seis animais por grupo. NS, normotenso sem treinamento. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sem treinamento. HT, hipertenso treinado. Anova Two-Way.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo geral investigar os efeitos do treinamento físico resistido sobre propriedades histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do coração de ratos espontaneamente hipertensos. Em resumo, apesar do TR aplicado não ter diminuído a PA e a FCR, nem ter alterado a composição corporal nos animais SHR, alguns efeitos benéficos foram observados: a) aumento da tolerância ao esforço físico; b) aumento da massa do coração e dos ventrículos; c) melhora da organização tecidual do VE, ao diminuir o percentual de matriz extracelular e mitigar o aumento da AST, da largura, do percentual de núcleo e dos percentuais de colágeno tipo I e III; d) minimização da redução da função sistólica cardíaca, por meio da melhora das frações de ejeção e de encurtamento; e) aumento da amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente e da velocidade com que transita na contração e relaxamento celular e melhora da contração e o relaxamento celular de miócitos isolados do VE ao amenizar a diminuição da expressão proteica de FLBt, porém, sem alterar outras proteínas (SERCA2a, NCX e CAV1.2) envolvidas no AEC.

5.1. Composição corporal e a antropometria

Os animais SHR apresentaram menor massa corporal que os normotensos, independente de terem sido submetidos ou não ao TR, sem apresentar diferenças no conteúdo de lipídio e percentual de gordura. Este resultado difere dos de estudos prévios, que observaram uma redução do tecido adiposo em animais hipertensos devido ao TR (GOMES; BORGES; ROSSI et al., 2017; NEVES; SOUZA; PASSOS et al., 2016). O TR foi capaz de diminuir ainda mais a massa corporal, sem alterar os parâmetros antropométricos e de composição corporal nos animais hipertensos. Sabe-se que tanto a hipertensão quanto o TR podem aumentar a expressão de genes no músculo esquelético, relacionados ao catabolismo lipídico, como as metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) (GOMES; BORGES; ROSSI et al., 2017; SOUZA; LEITE; DE SOUZA LINO et al., 2014), o que pode impactar diretamente na redução da massa corporal. Contudo, essa medida não foi realizada no presente estudo.

5.2. Tolerância ao esforço físico.

O TR aplicado aumentou a tolerância ao esforço físico nos animais hipertensos e normotensos. Ademais, os animais SHR conseguiram carregar um maior peso máximo relativo, em comparação aos normotensos, pois conseguiram suportar uma mesma carga externa absoluta com uma massa corporal inferior. Esse aumento da capacidade de tolerar esforço físico difere do encontrado em animais SHR submetidos ao TA, pois há evidências que animais hipertensos jovens, com 16 semanas de vida, apresentam uma menor capacidade de exercício aeróbio, comparados aos normotensos (CAMPOS; DRUMMOND; RODRIGUES et al., 2020). Todavia, os dados do presente estudo corroboram os resultados de Perilhão et al., (2020) com animais submetidos ao TR.

Os mecanismos responsáveis por essa resposta em animais SHR ainda são bem conhecidos, mas o aumento de catecolaminas circulantes devido à hiperatividade simpática, apresentadas por animais SHR (CONSOLIM-COLOMBO; IRIGOYEN; KRIEGER, 2005), pode ter contribuído para o aumento da capacidade de exercício nos animais hipertensos.

Adicionalmente, é concebível que o aumento de força muscular tenha contribuído para o ganho na tolerância ao esforço físico observado neste estudo. Tal aumento de força muscular tem, provavelmente, maior contribuição das adaptações neuromusculares ao exercício, pois sabe-se que nas primeiras semanas de treinamento essas são mais importantes para o aumento da força em comparação à hipertrofia muscular (DUNCAN; WILLIAMS; LYNCH, 1998; KRAEMER; FLECK; EVANS, 1996). Todavia, a quantidade de massa muscular esquelética não foi medida no presente estudo. Destaca-se que o aumento de força muscular é importante para indivíduos hipertensos, pois isso reduz a sobrecarga cardiovascular durante as atividades diárias e tem sido associada à proteção contra todas as causas de mortalidade (ARTERO; LEE; RUIZ et al., 2011; VESCOVI; FERNHALL, 2000).

5.3. Massa cardíaca e dimensões de miócitos do ventrículo esquerdo

No presente estudo, os animais hipertensos sem treinamento não apresentaram aumento em índices clássicos de hipertrofia cardíaca, tais como as razões MVE:MCor e MVE:tíbia. Porém, os animais SHR apresentaram aumento da DIVES, da AST e da largura dos miócitos do VE, além da redução da razão comprimento/largura dos miócitos. Estas alterações celulares são sugestivas de hipertrofia concêntrica da parede do VE causada pela hipertensão (NADRUZ, 2015). Essas alterações na largura e AST celular

estão associadas ao aumento em paralelo das fibras musculares, advindas de remodelamento da parede ventricular.

O programa de TR levou ao aumento da massa cardíaca e das razões usadas como índice de hipertrofia ventricular. Essa resposta é esperada, e foi demonstrada em um estudo prévio pelo aumento nas dimensões cardíacas em resposta a 12 semanas de TR em animais SHR (PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020).

Mais importante, observou-se no presente estudo que, apesar desse aumento na massa cardíaca, o TR aplicado preveniu o aumento das dimensões celulares (largura e AST celular) e a diminuição da razão comprimento/largura dos miócitos. Apesar de estudos prévios (BARAUNA; ROSA; IRIGOYEN et al., 2007; MELO; BARAUNA; JÚNIOR et al., 2015) com modelo de TR diferente do presente estudo (ex. agachamento), demonstrarem acontecer aumentos na largura e no volume de cardiomiócitos, assim como no septo interventricular e na parede do VE, em ratos normotensos, esse resultado não foi apresentado nos animais aqui avaliados. Assim, os resultados do presente estudo indicam que o TR aplicado preveniu o progresso de hipertrofia cardíaca nos animais hipertensos, normalmente associada à hipertrofia patológica, com o avanço da idade.

5.4. Organização tecidual, estado inflamatório e indicadores de função endotelial no ventrículo esquerdo

Observou-se que a hipertensão promoveu diminuição do conteúdo de colágeno do tipo III nos animais (grupo HS). Essa redução foi um resultado inesperado, uma vez que um estudo prévio demonstrou que o fenótipo dos colágenos tipos I e III não se alterou em animais SHR, nos primeiros 6 meses de progressão da hipertrofia cardíaca (YANG; KANDASWAMY; YOUNG et al., 1997). Entretanto, esses mesmos autores demonstraram que ocorre um platô do colágeno tipo III nos animais SHR com 10 meses de vida.

Destaca-se que o colágeno do tipo III prevalece ao redor dos cardiomiócitos no endomísio, podem formar fibras mais finas, mais flexíveis e com maior interação com os proteoglicanos. Como esses fatores afetam as propriedades mecânicas do coração (DE SOUZA, 2002), a diminuição desse tipo de colágeno pode representar um prejuízo a contração cardíaca. Desta forma, a redução do colágeno tipo III pode ter contribuído para a menor capacidade contrátil e função sistólica ventricular esquerda, apresentada pelos

animais hipertensos sem treinamento do presente estudo (ex. redução das frações de ejeção e de encurtamento).

Observou-se no presente estudo, também, uma diminuição da razão entre colágenos tipo III e I nos animais hipertensos sem treinamento. A diminuição dessa proporção indica que o tecido tornou-se mais rígido e/ou menos extensível (JUGDUTT, 2003). Esta rigidez aumentada pode estar associada à redução da fração de encurtamento e fração de ejeção observadas nestes animais.

Com relação ao TR, este promoveu redução do percentual do colágeno do tipo I nos animais hipertensos. Este tipo de colágeno está relacionado com a instalação do processo de fibrose cardíaca e leva a alterações de propriedades elásticas do coração, com prejuízos à capacidade contrátil (SHAHBAZ et al., 2010). Um estudo recente (PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020) demonstrou que o TR preveniu o aumento do colágeno total de ratas hipertensas. O conteúdo total de colágeno está associado ao deslizamento nos miócitos durante as contrações, regulação da apoptose, resistência a deformações e manutenção do alinhamento de estruturas, além de regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento das fibras cardíacas, sendo um importante modulador da função da sistólica e diastólica (KWAK, 2013).

Observou-se, também, que o TR aplicado evitou a diminuição da razão dos colágenos III:I nos animais hipertensos, o que indica manutenção do tecido cardíaco mais extensível (JUGDUTT, 2003). Adicionalmente, o TR também foi capaz de diminuir o percentual de MEC nos animais hipertensos. Isso indica uma diminuição da fibrose cardíaca nesses animais. Há evidências de que o treinamento aeróbio pode reduzir a expressão das MMP2 e metaloproteinases de matriz 9 (MMP 9) no coração de animais SHR (PAGAN; DAMATTO; GOMES et al., 2019). Essas proteínas são responsáveis por manter a integridade da MEC ao regular o conteúdo de colágeno (KWAK, 2013). Porém, essa medida não foi realizada no presente estudo.

Desta forma, estas alterações estruturais no tecido do VE podem auxiliar na explicação dos efeitos positivos do TR em prevenir a redução na fração de ejeção observadas nestes animais hipertensos treinados.

5.5. Função sistólica ventricular

No presente estudo, observou-se que a hipertensão espontânea reduziu a função sistólica do VE nos animais hipertensos (ex. redução das frações de ejeção e de encurtamento). Possivelmente, o remodelamento adverso contribuiu para esta diminuição, como já foi demonstrado em estudos prévios (HUANG; YAN; RUI et al., 2016; SANTOS; SHAH, 2014). Há evidências de que não só a função sistólica, mas também a diastólica, pode ser diminuída em animais SHR com seis meses de idade (KOKUBO; UEMURA; MATSUBARA et al., 2005; PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020).

A redução da fração de ejeção nos animais do grupo HS, observada no presente estudo, pode ter ocorrido devido à perda de tecido contrátil, hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos e fibrose reparativa, contribuindo para a diminuição da extensibilidade cardíaca causada pela doença (NADRUZ, 2015). De fato, foi observado que os animais do grupo HS apresentaram redução de colágeno tipo III e da razão entre colágenos tipo III e I, indicando que o tecido do VE se menos extensível.

A menor fração de encurtamento observada nos animais hipertensos sem treinamento, indica ter havido alterações na composição da MEC, certificada pelas reduções de colágeno tipo III e da razão entre colágenos tipo III e I nestes animais, que pode ter levado a uma diminuição da extensibilidade do VE e, logo, redução da fração de encurtamento. Como a MEC não interfere na medidas de função contrátil de miócitos isolados, o aumento da amplitude de contração celular e do $[Ca^{2+}]_i$ transiente nestes animais hipertensos sem treinamento (veja abaixo) sugere um mecanismo compensatório para atenuar a sobrecarga cardíaca provocada pela doença. Um processo semelhante foi observado em animais infartados (LAVORATO; DEL CARLO; DA CUNHA et al., 2016).

Entretanto, apesar dos animais SHR sem treinamento apresentarem menor função sistólica, em comparação aos normotensos, não é possível afirmar que esses apresentavam insuficiência cardíaca. A ausência de normativas dessa medida em ratos dificultam essa análise. Atualmente, sabe-se que a insuficiência cardíaca acontece em animais SHR a partir do 18º mês de vida (MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

O TR, por sua vez, atenuou os prejuízos causados pela doença na função sistólica ventricular ao prevenir a diminuição da fração de ejeção. Esse efeito do TR pode ter ocorrido em função das alterações estruturais observadas no VE, em nível tecidual, como a prevenção do aumento da AST e da largura celular, a diminuição do percentual de MEC e a prevenção de alterações do percentual de colágenos tipos I e III, apresentados no

presente estudo. Cabe ressaltar que um estudo prévio, usando o mesmo modelo de TR, demonstrou prevenção da diminuição da função diastólica em ratos SHR (PERILHAO; KRAUSE NETO; DA SILVA et al., 2020), o que em conjunto com os resultados do presente estudo, demonstra resultados relevantes para a manutenção da função cardíaca devido ao TR.

5.6. Cálcio intracelular, contratilidade celular e proteínas reguladoras de cálcio

No presente estudo, observou-se o aumento da amplitude e da velocidade até o pico do $[Ca^{2+}]_i$ transiente em miócitos isolados do VE dos animais hipertensos sem treinamento. O aumento na amplitude é característico da fase compensada da doença, aos seis meses de idade, nesses animais, conforme demonstrado em estudos prévios (BROOKSBY; LEVI; JONES, 1992; MCCROSSAN; BILLETER; WHITE, 2004; ROMAN-CAMPOS; CARNEIRO-JUNIOR; PRIMOLA-GOMES et al., 2012). Tal aumento na amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente pode ser causado, basicamente, por maior conteúdo de Ca^{2+} do RS e eficiência dos mecanismos de liberação de Ca^{2+} do RS, recaptção de Ca^{2+} para o RS e extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular; ou por deficiência dos mecanismos de recaptção de Ca^{2+} para o RS e extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular (BERS, 2001).

Ainda nos animais hipertensos sem treinamento, foi possível observar uma diminuição da expressão de FLBt, resposta encontrada também em estudo prévio (COLLINS; LOKA; DICARLO, 2005). A FLB é uma proteína transmembrana reguladora da atividade da SERCA2a e para exercer essa função ela deve estar fosforilada. Apesar dessa medida não ter sido realizada no presente estudo, reduções na expressão de FLBt podem resultar em redução na recaptção de Ca^{2+} para o RS, causando aumento de Ca^{2+} no citosol, bem como podem levar ao aumento da Ca^{2+} no RS causando uma sobrecarga e aumentando a chance de arritmias ventriculares, devido ao aumento de liberações espontâneas de Ca^{2+} (JI; LALLI; BABU et al., 2000). Além da FLB, outras proteínas como a sarcolipina, a DWORF e a regulina (ANDERSON; MAKAREWICH; ANDERSON et al., 2016; NELSON; MAKAREWICH; ANDERSON et al., 2016; VANGHELuwe; SCHUERMANS; ZADOR et al., 2005) também regulam a atividade da SERCA2a. Entretanto, não foram observadas, nestes animais hipertensos sem treinamento, alterações em outras proteínas reguladoras de Ca^{2+} , que poderiam influenciar a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente, como SERCA2a, NCX e CAV1.2.

Quanto ao aumento da velocidade até o pico do $[Ca^{2+}]_i$ transiente, é possível que, nesta fase compensada da hipertensão possa ter havido uma melhora na liberação de cálcio do RS, pelo aumento dos RyR2. Apesar de não ter sido analisada neste estudo, há evidência de que, nesta fase, que o animal SHR apresenta aumento na expressão gênica dos RyR2, acompanhado de uma diminuição da FKBP12.6 (CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2014).

Estas alterações no $[Ca^{2+}]_i$ transiente refletiram em aumento na amplitude da contração dos miócitos do VE de animais hipertensos sem treinamento. Apesar destes resultados serem divergentes dos de outros estudos com animais SHR (BROOKSBY; LEVI; JONES, 1992; CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2014), a maior disponibilidade de Ca^{2+} no citosol pode proporcionar maior força contrátil (BERS, 2002). Todavia, houve aumento na velocidade de contração dos animais HS apenas na frequência de 1 Hz, com tamanho do efeito pequeno.

Adicionalmente, a hipertensão aumentou a velocidade de relaxamento dos cardiomiócitos, nessa mesma frequência (também com tamanho do efeito pequeno). Como mencionado acima, a velocidade de relaxamento celular depende da redução do $[Ca^{2+}]_i$, principalmente pela SERCA2a e NCX (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; BERS, 2014). Porém, no presente estudo, a expressão de FLBt, proteína reguladora da atividade da SERCA2a, estava reduzida nestes animais hipertensos sem treinamento e a SERCA2a e o NCX não estavam alteradas. É concebível que outras alterações relativas à velocidade de remoção do $[Ca^{2+}]_i$ tenham ocorrido em resposta à hipertensão, o que demanda mais investigações.

Mais importante, o TR aplicado causou aumento na amplitude e na velocidade até o pico do $[Ca^{2+}]_i$ transiente, o que refletiu no aumento da amplitude e velocidade de contração dos miócitos isolados do VE de animais hipertensos. Adaptações similares foram reportadas em ratos SHR submetidos ao TA (CARNEIRO-JÚNIOR; QUINTÃO-JÚNIOR; DRUMMOND et al., 2013; RODRIGUES; PRÍMOLA-GOMES; SOARES et al., 2018). O aumento da amplitude de contração pode ser explicado pelo aumento da amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ transiente observada nestes animais, enquanto o aumento da velocidade de contração está associado à velocidade de liberação de Ca^{2+} do RS. É possível que o TR tenha melhorado a atividade do RS e aumentado o influxo de cálcio do sarcolema, conforme relatado por Fernandes et al., (2015) usando um modelo de TR com agachamento em ratos SHR. Com este mesmo modelo, outros estudos (MELO; BARAUNA; JÚNIOR et al., 2015; MELO; BARAUNA; NEVES et al., 2015) relataram

maior expressão de SERCA2a, e menor expressão miRNA-214, gene regulador antagônico da SERCA2a, em resposta ao TR em ratos normotensos e infartados, respectivamente. Todavia, no presente estudo, a expressão proteica de SERCA2a, NCX e CAV1.2 não foram alteradas pelo TR aplicado. Desta forma, futuros estudos são necessários a fim de investigar outros possíveis mecanismos.

Adicionalmente, o TR aplicado aumentou as velocidades de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ transiente e de relaxamento celular nos animais hipertensos. Sabe-se que a velocidade de relaxamento celular depende da velocidade de redução do $[Ca^{2+}]_i$, principalmente pela SERCA2a e NCX (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; BERS, 2014). Porém, no presente estudo, a expressão de FLBt, proteína reguladora da atividade da SERCA2a, estava reduzida nestes animais hipertensos sem treinamento e a SERCA2a e o NCX não estavam alteradas. É concebível que outras alterações relativas à velocidade de remoção do $[Ca^{2+}]_i$ tenham ocorrido em resposta à hipertensão, porém, outros estudos são necessários.

Ressalta-se que respostas como a diminuição do percentual de MEC e prevenção das alterações do percentual de colágenos tipos I e III no VE dos animais treinados podem ter influenciado o AEC, uma vez que a diminuição da fração de encurtamento foi prevenida, enquanto que a velocidade para o pico do $[Ca^{2+}]_i$ transiente e a velocidade de contração celular foram aumentadas pelo TR.

5.7. Pressão arterial e a frequência cardíaca de repouso

No presente estudo, foi observada a prevenção do aumento da PA, uma vez que não houve diferença entre os animais hipertensos treinados e não treinados. Esse fato já havia sido observado em estudos prévios com diferentes protocolos de TR (ARAUJO; SANTOS; SOUZA KDOS et al., 2013; NEVES; SOUZA; PASSOS et al., 2016). Cabe ressaltar que a diminuição da PA devido de TR no estudo de Perilhão et al., (2020) ocorreu do a partir da 8ª semana de treinamento. Logo, a duração do TR pode ter sido um fator importante. Por outro lado, é importante destacar que um aumento de 10 mmHg na PAS está associado a um aumento em 25% no risco de problemas cardíacos como o infarto do miocárdio e outros problemas como o acidente vascular cerebral (BOISSIERE; EDER; MACHET et al., 2008).

5.8. Considerações finais

Os resultados aqui apresentados indicam uma melhor capacidade contrátil cardíaca em resposta às demandas mais altas (ex. durante o exercício físico) causadas pelo TR aplicado. Até o momento, esse é o primeiro estudo que a demonstrar esses efeitos do TR em animais SHR. Estes resultados são de relevância clínica, pois demonstraram o TR foi capaz de prevenir diversas alterações adversas causadas pela hipertensão. Assim, o TR pode ser uma ferramenta eficaz como tratamento adjuvante da hipertensão.

Por fim, seria interessante, em futuros estudos, investigar os efeitos do TR sobre o conteúdo proteico dos animais SHR, bem como as sparks de Ca^{2+} e a expressão proteica dos RyR2 e FKBP12.6, além de proteínas ligadas à hipertrofia cardíaca patológica (ex: razão α/β MHC) e proteínas reguladoras da MEC (ex: MMP-2 e MMP9).

6. CONCLUSÃO

O TR aplicado preveniu o remodelamento adverso, promoveu benefícios nas propriedades morfológicas, melhorou as propriedades mecânicas e a expressão proteica relativa à recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático, sem afetar a expressão gênica de biomarcadores inflamatórios, de função endotelial e de tecidos não contráteis no VE de ratos espontaneamente hipertensos.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. M.; MAKAREWICH, C. A.; ANDERSON, K. M.; SHELTON, J. M. et al. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. **Sci Signal**, 9, n. 457, p. ra119, 2016.

ANTONIO, J.; GONYEA, W. J. Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. **J Appl Physiol** (1985), 74, n. 4, p. 1893-1898, 1993.

ARAÚJO, A. J.; SANTOS, A. C.; SOUZA KDOS, S.; AIRES, M. B. et al. Resistance training controls arterial blood pressure in rats with L-NAME- induced hypertension. **Arq Bras Cardiol**, 100, n. 4, p. 339-346, 2013.

ARTERO, E. G.; LEE, D. C.; RUIZ, J. R.; SUI, X. et al. A prospective study of muscular strength and all-cause mortality in men with hypertension. **J Am Coll Cardiol**, 57, n. 18, p. 1831-1837, 2011.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70S6 correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 276, n. 1, p. C120-C127, 1999.

BADEER, H. S. Biological Significance of Cardiac Hypertrophy. **Am J Cardiol**, 14, p. 133-138, 1964.

BARAUNA, V. G.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; DE OLIVEIRA, E. M. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. **Clin Med Res**, 5, n. 2, p. 114-120, 2007.

BARROSO, W. K. S.; RODRIGUES, C. I. S.; BORTOLOTTI, L. A.; GOMES, M. A. M. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 00, n. 00, p. 00-00, 2020.

BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **J Physiol**, 476, n. 2, p. 279-293, 1994.

BASSANI, R. A.; MATTIAZZI, A.; BERS, D. M. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 268, n. 2, p. H703-H712, 1995.

BERS, D. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.

BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu Rev Physiol**, 70, p. 23-49, 2008.

BERS, D. M. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. **Annu Rev Physiol**, 76, p. 107-127, 2014.

BOISSIERE, J.; EDER, V.; MACHET, M.-C.; COURTEIX, D. et al. Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, 104, n. 2, p. 321-327, 2008.

BOZI, L. H.; MALDONADO, I. R.; BALDO, M. P.; SILVA, M. F. et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. **Clinics (Sao Paulo)**, 68, n. 4, p. 549-556, 2013.

BRIDGE, J.; SMOLLEY; SPITZER, K. The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and I_{Na-Ca} in cardiac myocytes. **Science**, 248, n. 4953, p. 376-378, 1990.

BROOKSBY, P.; LEVI, A. J.; JONES, J. V. Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. **J Hypertens**, 10, n. 6, p. 521-527, 1992.

BROWN, S. P.; THOMPSON, W. R. Standardization indices of cardiac hypertrophy in weight lifters. **J Sports Sci**, 5, n. 2, p. 147-153, 1987.

CAMPOS, H. O.; DRUMMOND, L. R.; RODRIGUES, Q. T.; LIMA, P. M. et al. Exercise capacity in different stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **J Sports Med Phys Fitness**, 60, n. 5, p. 800-805, 2020.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A.; QUINTÃO-JÚNIOR, J. F.; DRUMMOND, L. R.; LAVORATO, V. N. et al. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 47, p. 960-965, 2014.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A.; QUINTÃO-JÚNIOR, J. F.; DRUMMOND, L. R.; LAVORATO, V. N. et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 57, p. 119-128, 2013.

CARNEIRO JÚNIOR, M. A.; PRÍMOLA-GOMES, T. N.; QUINTÃO JÚNIOR, J. F.; DRUMMOND, L. R. et al. LOW-INTENSITY ENDURANCE TRAINING AND RIGHT VENTRICULAR MYOCYTES OF HYPERTENSIVE RATS. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 25, p. 196-201, 2019.

CASSILHAS, R. C.; LEE, K. S.; VENANCIO, D. P.; OLIVEIRA, M. G. et al. Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory. **Braz J Med Biol Res**, 45, n. 12, p. 1215-1220, 2012.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, 4, n. 4, p. 303-306, Oct-Dec 2013.

CHENG, H.; LEDERER, W. J.; CANNELL, M. B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. **Science**, 262, n. 5134, p. 740-744, 1993.

CHINTALGATTU, V.; NAIR, D. M.; KATWA, L. C. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. **J Mol Cell Cardiol**, 35, n. 3, p. 277-286, 2003.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates., 1988.

COLAN, S. D. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. **Cardiol Clin**, 15, n. 3, p. 355-372, Aug 1997.

COLLINS, H. L.; LOKA, A. M.; DICARLO, S. E. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 288, n. 2, p. H532-H540, 2005.

CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M.; KRIEGER, E. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica. **Rev Soc Brasil Hipertens**, 8, p. 11-13, 2005.

CORNELISSEN, V. A.; SMART, N. A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J Am Heart Assoc**, 2, n. 1, p. e004473, 2013.

CUNHA, T. S.; TANNO, A. P.; COSTA SAMPAIO MOURA, M. J.; MARCONDES, F. K. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. **Life Sci**, 77, n. 9, p. 1030-1043, 2005.

DE SOUZA, R. R. Aging of myocardial collagen. **Biogerontology**, 3, n. 6, p. 325-335, 2002.

DENNY-BROWN, D. Experimental studies pertaining to hypertrophy, regeneration and degeneration. In: R. D. ADAMS, L. M. E. A. A. M. S. (Ed.). **Proceedings of association for research in nervous and mental disease** Baltimore: Williams and Wilkins 1960..

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A.; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, 77, n. 4, p. 372-378, 1998.

FAGARD, R. H. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. **Cardiol Clin**, 15, n. 3, p. 397-412, 1997.

FARIA TDE, O.; TARGUETA, G. P.; ANGELI, J. K.; ALMEIDA, E. A. et al. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Appl Physiol**, 110, n. 2, p. 359-366, 2010.

FAZAN-JÚNIOR, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial **Rev Bras Hipertens**, 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

FERNANDES, A. A.; FARIA TDE, O.; RIBEIRO JUNIOR, R. F.; COSTA, G. P. et al. A single resistance exercise session improves myocardial contractility in spontaneously hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, 48, n. 9, p. 813-821, 2015.

FERNANDES, T.; BARAUNA, V. G.; NEGRAO, C. E.; PHILLIPS, M. I. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 309, n. 4, p. H543-552, 2015.

FIDALGO, A. S. F.; FARINATTI, P.; BORGES, J. P.; DE PAULA, T. et al. Institutional Guidelines for Resistance Exercise Training in Cardiovascular Disease: A Systematic Review. **Sports Med**, 49, n. 3, p. 463-475, 2019.

FISH, E. R.; BROWN, M. J.; DANNEMAN, P. J.; KARAS, A. Z. **Anaesthesia and Analgesia for Laboratory Animals**. Oxford: Elsevier, 2008.

FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. **Fundamentos do Treinamento de Força Muscular**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 4ed. Elsevier, 2015.

FROHLICH, E. D. The first Irvine H. Page lecture. The mosaic of hypertension: past, present and future. **J Hypertens Suppl**, 6, n. 4, p. S2-11, 1988.

FROHLICH, E. D.; APSTEIN, C.; CHOBANIAN, A. V.; DEVEREUX, R. B. et al. The heart in hypertension. **N Engl J Med**, 327, n. 14, p. 998-1008, 1992.

GARCIARENA, C. D.; PINILLA, O. A.; NOLLY, M. B.; LAGUENS, R. P. et al. Endurance Training in the Spontaneously Hypertensive Rat. **Hypertension**, 53, n. 4, p. 708-714, 2009.

GOLDBERG, A. L. Work-induced growth of skeletal muscle in normal and hypophysectomized rats. **Am J Physiol**, 213, n. 5, p. 1193-1198, 1967.

GOMES, M. F. P.; BORGES, M. E.; ROSSI, V. D. A.; MOURA, E. D. O. C. D. et al. The Effect of Physical Resistance Training on Baroreflex Sensitivity of Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 108, p. 539-545, 2017.

HARVEY, R. D.; HELL, J. W. CaV1.2 signaling complexes in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 58, p. 143-152, 2013.

HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. **Cardiovasc Res**, 39, n. 1, p. 60-76, 1998.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, 29, n. 1, p. 16-31, 2004.

HUANG, J.; YAN, Z. N.; RUI, Y. F.; FAN, L. et al. Left Ventricular Systolic Function Changes in Primary Hypertension Patients Detected by the Strain of Different Myocardium Layers. **Medicine (Baltimore)**, 95, n. 2, p. e2440, 2016.

IKEDO, A.; KIDO, K.; ATO, S.; SATO, K. et al. The effects of resistance training on bone mineral density and bone quality in type 2 diabetic rats. **Physiol Rep**, 7, n. 6, p. e14046, 2019.

INDER, J. D.; CARLSON, D. J.; DIEBERG, G.; MCFARLANE, J. R. et al. Isometric exercise training for blood pressure management: a systematic review and meta-analysis to optimize benefit. **Hypertens Res**, 39, n. 2, p. 88-94, 2016.

ISHIHARA, A.; ROY, R. R.; OHIRA, Y.; IBATA, Y. et al. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **J Appl Physiol** (1985), 84, n. 6, p. 2183-2189, 1998.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R. et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circulation Research**, 64, n. 6, p. 1041-1050, 1989.

JI, Y.; LALLI, M. J.; BABU, G. J.; XU, Y. et al. Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function. **J Biol Chem**, 275, n. 48, p. 38073-38080, 2000.

JUGDUTT, B. I. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, 3, n. 1, p. 1-30, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

KIRCHBERGER, M. A.; TADA, M.; KATZ, A. M. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, 249, n. 19, p. 6166-6173, 1974.

KOKUBO, M.; UEMURA, A.; MATSUBARA, T.; MUROHARA, T. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. **Hypertens Res**, 28, n. 7, p. 601-609, 2005.

KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; EVANS, W. J. Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation. **Exerc Sport Sci Rev**, 24, p. 363-397, 1996.

KRZESIAK, A.; COGNARD, C.; SEBILLE, S.; CARRÉ, G. et al. High-intensity intermittent training is as effective as moderate continuous training, and not deleterious, in cardiomyocyte remodeling of hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, 126, n. 4, p. 903-915, 2019.

KWAK, H. B. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. **J Exerc Rehabil**, 9, n. 3, p. 338-347, 2013.

LAREAU, L. F.; GREEN, R. E.; BHATNAGAR, R. S.; BRENNER, S. E. The evolving roles of alternative splicing. **Curr Opin Struct Biol**, 14, n. 3, p. 273-282, 2004.

LAVORATO, V. N.; DEL CARLO, R. J.; DA CUNHA, D. N.; OKANO, B. S. et al. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. **J Mol Cell Cardiol**, 90, p. 111-119, 2016.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B. et al. Prognostic Implications of Echocardiographically Determined Left Ventricular Mass in the Framingham Heart Study. **New England Journal of Medicine**, 322, n. 22, p. 1561-1566, 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, n. 1, p. 265-275, Nov 1951.

MACDONALD, H. V.; JOHNSON, B. T.; HUEDO-MEDINA, T. B.; LIVINGSTON, J. et al. Dynamic Resistance Training as Stand-Alone Antihypertensive Lifestyle Therapy: A Meta-Analysis. **Journal of the American Heart Association**, 5, n. 10, p. e003231, 2016.

MACLENNAN, D. H.; KRANIAS, E. G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4, n. 7, p. 566-577, Jul 2003.

MAKINO, H.; HANEDA, M.; BABAZONO, T.; MORIYA, T. et al. The telmisartan renoprotective study from incipient nephropathy to overt nephropathy--rationale, study design, treatment plan and baseline characteristics of the incipient to overt: angiotensin II receptor blocker, telmisartan, Investigation on Type 2 Diabetic Nephropathy (INNOVATION) Study. **J Int Med Res**, 33, n. 6, p. 677-686, 2005.

MATTIAZZI, A.; MUNDINA-WEILENMANN, C.; GUOXIANG, C.; VITTONI, L. et al. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. **Cardiovasc Res**, 68, n. 3, p. 366-375, 2005.

MCCROSSAN, Z. A.; BILLETER, R.; WHITE, E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. **Cardiovasc Res**, 63, n. 2, p. 283-292, 2004.

MCLLENACHAN, J. M.; DARGIE, H. J. Ventricular Arrhythmias in Hypertensive Left Ventricular Hypertrophy: Relationship to Coronary Artery Disease, Left Ventricular

Dysfunction, and Myocardial Fibrosis. **American Journal of Hypertension**, 3, n. 10_Pt_1, p. 735-740, 1990.

MCLEOD, J. C.; STOKES, T.; PHILLIPS, S. M. Resistance Exercise Training as a Primary Countermeasure to Age-Related Chronic Disease. **Frontiers in Physiology**, 10, n. 645, 2019.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 34, n. 4, p. 255-262, 2007.

MELO, S. F. S.; AMADEU, M. A.; MAGALHÃES, F. D. C.; FERNANDES, T. et al. Exercício de força ativa a via AKT/mTor pelo receptor de angiotensina II tipo I no músculo cardíaco de ratos. **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte**, 25, p. 8, 2011.

MELO, S. F. S.; BARAUNA, V. G.; FERNANDES, T.; CARMO, E. C. et al. Cardiac AT(1) receptor-dependent and IGF1 receptor-independent signaling is activated by a single bout of resistance exercise. **Physiol Res**, 66, n. 6, p. 1061-1065, 2017.

MELO, S. F. S.; BARAUNA, V. G.; JÚNIOR, M. A. C.; BOZI, L. H. M. et al. Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214. **International journal of molecular sciences**, 16, n. 4, p. 6855-6867, 2015.

MELO, S. F. S.; BARAUNA, V. G.; NEVES, V. J.; FERNANDES, T. et al. Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca²⁺ handling after myocardial infarction. **BMC cardiovascular disorders**, 15, p. 166-166, 2015.

MINISTÉRIO CIÊNCIA, T. E. I. **Diretrizes da prática de Eutanásia**. Brasília, DF: 2018.

MOREIRA-GONCALVES, D.; FERREIRA, R.; FONSECA, H.; PADRAO, A. I. et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. **Basic Res Cardiol**, 110, n. 6, p. 57, 2015.

NACI, H.; SALCHER-KONRAD, M.; DIAS, S.; BLUM, M. R. et al. How does exercise treatment compare with antihypertensive medications? A network meta-analysis of 391 randomised controlled trials assessing exercise and medication effects on systolic blood pressure. **British Journal of Sports Medicine**, 53, n. 14, p. 859-869, 2019.

NADRUZ, W. Myocardial remodeling in hypertension. **J Hum Hypertens**, 29, n. 1, p. 1-6, 2015.

NATALI, A. J.; WILSON, L. A.; PECKHAM, M.; TURNER, D. L. et al. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. **J Physiol**, 541, n. Pt 3, p. 863-875, 2002.

NELSON, B. R.; MAKAREWICH, C. A.; ANDERSON, D. M.; WINDERS, B. R. et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. **Science (New York, N.Y.)**, 351, n. 6270, p. 271-275, 2016.

NEVES, R. V.; SOUZA, M. K.; PASSOS, C. S.; BACURAU, R. F. et al. Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension. **Arq Bras Cardiol**, 106, n. 3, p. 201-209, 2016.

NEVES, S. M. P.; ONG, F. M. P.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A. et al. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: IdQ, editor, 2013.

NICASTRO, H.; ZANCHI, N. E.; DA LUZ, C. R.; CHAVES, D. F. S. et al. An Experimental Model for Resistance Exercise in Rodents. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012, p. 457065, 2012.

NIELSEN, S. S. **Food analysis laboratory manual**. West Lafayette: Springer, 2010.

NOVELLI, E. L.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, 27, p. 282-293, 1963.

OTTOLIA, M.; TORRES, N.; BRIDGE, J. H.; PHILIPSON, K. D. et al. Na/Ca exchange and contraction of the heart. **J Mol Cell Cardiol**, 61, p. 28-33, 2013.

PAGAN, L. U.; DAMATTO, R. L.; GOMES, M. J.; LIMA, A. R. R. et al. Low-intensity aerobic exercise improves cardiac remodelling of adult spontaneously hypertensive rats. **J Cell Mol Med**, 23, n. 9, p. 6504-6507, 2019.

PARRY, D.; CRAIG, A. **Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue**. Roca-Raton: CRC Press: 1988.

PERILHAO, M. S.; KRAUSE NETO, W.; DA SILVA, A. A.; ALVES, L. L. S. et al. Linear periodization of strength training in blocks attenuates hypertension and diastolic dysfunction with normalization of myocardial collagen content in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, 38, n. 1, p. 73-81, 2020.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W. B. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, 36, n. 3, p. 533-553, 2004.

PESCATELLO, L. S.; MACDONALD, H. V.; ASH, G. I.; LAMBERTI, L. M. et al. Assessing the Existing Professional Exercise Recommendations for Hypertension: A Review and Recommendations for Future Research Priorities. **Mayo Clin Proc**, 90, n. 6, p. 801-812, 2015.

PINTER, R. D. C. C. E.; PADILHA, A. S.; DE OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D. V. et al. Cardiovascular adaptive responses in rats submitted to moderate resistance training. **European Journal of Applied Physiology**, 103, n. 5, p. 605-613, 2008.

REN, X.; PHILIPSON, K. D. The topology of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX1. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 57, p. 68-71, 2013.

RODRIGUES, J. A.; PRÍMOLA-GOMES, T. N.; SOARES, L. L.; LEAL, T. F. et al. Physical Exercise and Regulation of Intracellular Calcium in Cardiomyocytes of Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 111, p. 172-179, 2018.

ROMAN-CAMPOS, D.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; SILVA, K. A. et al. Chronic exercise partially restores the transmural heterogeneity of action potential duration in left ventricular myocytes of spontaneous hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 39, n. 2, p. 155-157, 2012.

ROSENTHAL, J. A. Qualitative Descriptors of Strength of Association and Effect Size. **Journal of Social Service Research**, 21, n. 4, p. 37-59, 1996.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, 58, n. 6, p. 1072-1083, 1978.

SANTOS, M.; SHAH, A. M. Alterations in cardiac structure and function in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, 16, n. 5, p. 428, 2014.

SATO, H.; WATANABE, A.; TANAKA, T.; KOITABASHI, N. et al. Regulation of the human tumor necrosis factor-alpha promoter by angiotensin II and

lipopolysaccharide in cardiac fibroblasts: different cis-acting promoter sequences and transcriptional factors. **J Mol Cell Cardiol**, 35, n. 10, p. 1197-1205, 2003.

SATOH, H.; DELBRIDGE, L. M.; BLATTER, L. A.; BERS, D. M. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. **Biophys J**, 70, n. 3, p. 1494-1504, 1996.

SHARMAN, J. E.; LA GERCHE, A.; COOMBES, J. S. Exercise and cardiovascular risk in patients with hypertension. **Am J Hypertens**, 28, n. 2, p. 147-158, 2015.

SHEPPARD, J. P. Should exercise be considered as an alternative to drug treatment in patients with low-risk mild hypertension? **British Journal of Sports Medicine**, 53, n. 14, p. 848-849, 2019.

SITSEL, A.; DE RAEYMAECKER, J.; DRACHMANN, N. D.; DERUA, R. et al. Structures of the heart specific SERCA2a Ca(2+)-ATPase. **The EMBO journal**, 38, n. 5, p. e100020, 2019.

SOUZA, M. V. C.; LEITE, R. D.; DE SOUZA LINO, A. D.; DE CÁSSIA MARQUETI, R. et al. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. **Clinics**, 69, p. 265-270, 2014.

SOUZA, M. V. C.; LINO, A. D. S.; RUFFONI, L. G. D.; DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training and hormone replacement increase MMP-2 activity, quality and quantity of bone in ovariectomized rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, 23, 2017.

STRICKLAND, J. C.; SMITH, M. A. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. **Journal of neuroscience methods**, 273, p. 191-200, 2016.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Med Sci Sports Exerc**, 24, n. 8, p. 881-886, 1992.

TANG, Z. Z.; LIAO, P.; LI, G.; JIANG, F. L. et al. Differential splicing patterns of L-type calcium channel Cav1.2 subunit in hearts of Spontaneously Hypertensive Rats and Wistar Kyoto Rats. **Biochim Biophys Acta**, 1783, n. 1, p. 118-130, 2008.

TIBANA, R. A.; VIEIRA, D. C.; TAJRA, V.; BOTTARO, M. et al. Effects of rest interval length on Smith machine bench press performance and perceived exertion in trained men. **Percept Mot Skills**, 117, n. 3, p. 682-695, 2013.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**, 48, n. 3, p. 309-319, 1981.

VAN DEN BROEKE, C.; FAGARD, R. Left ventricular structure and function, assessed by imaging and Doppler echocardiography, in athletes engaged in throwing events. **Int J Sports Med**, 9, n. 6, p. 407-411, 1988.

VANGHELUWE, P.; SCHUERMANS, M.; ZADOR, E.; WAELKENS, E. et al. Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. **Biochem J**, 389, n. Pt 1, p. 151-159, 2005.

VESCOVI, J.; FERNHALL, B. Cardiac Rehabilitation and Resistance Training: Are They Compatible? **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 14, n. 3, p. 350-358, 2000.

WEGENER, A. D.; SIMMERMAN, H. K.; LINDEMANN, J. P.; JONES, L. R. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. **J Biol Chem**, 264, n. 19, p. 11468-11474, 1989.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY, D. E. et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Hypertension**, 71, n. 6, p. e13-e115, 2018.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L.; KENNEY, W. L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. São Paulo: Manole, 2009.

WILSON, E. M.; SPINALE, F. G. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. **Annals of Medicine**, 33, n. 9, p. 623-634, 2001.

WRIGHT, J. T.; WILLIAMSON, J. D.; WHELTON, P. K. E. A. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. **New England Journal of Medicine**, 373, n. 22, p. 2103-2116, 2015.

YANG, C. M.; KANDASWAMY, V.; YOUNG, D.; SEN, S. Changes in collagen phenotypes during progression and regression of cardiac hypertrophy. **Cardiovasc Res**, 36, n. 2, p. 236-245, Nov 1997.

ZOU, Y.; AKAZAWA, H.; QIN, Y.; SANO, M. et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. **Nature Cell Biology**, 6, n. 6, p. 499-506, 2004.

APÊNDICE 1 - Composição das soluções para experimentos com cardiomiócitos isolados

As soluções usadas para o isolamento dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram feitas usando-se uma solução básica com água ultrapura (Milli-Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/L; MgCl₂ (10) – 1,4 mL/L; NaH₂PO₄ (0,33) – 0,055 g/L; KCl (5,4) – 0,4 g/L; ácido etanosulfônico – hidroxietil piperazina (HEPES) (10) – 1,19 g/L, taurina (20) – 2,5 g/L; creatina (10) – 1,31 g/L; glicose (10) – 1,8 g/L. Esta solução foi equilibrada para um pH de 7,4 com NaOH (5) e mantida em temperatura ambiente.

Solução A:

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

Solução B:

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

Solução C:

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 0,030g de collagenase e 0,003g de protease em 30 mL da solução básica.

Solução Tyrode

Durante as análises de contratilidade celular e cálcio intracelular transiente, os miócitos do VE foram banhados com solução Tyrode contendo (em mM): NaCl (137), KCl (5,4), NaH₂PO₄ (0,33), MgCl₂ (0,5), HEPES (5), glicose (5,6) e CaCl₂ (1,8), pH 7,4 equilibrado com NaOH (5).

Para preparar a solução Tyrode, foram usadas uma solução estoque (10x), CaCl₂, glicose e água ultrapura (Milli-Q), conforme descrito abaixo.

Solução estoque (1 Litro):

NaCl (80 g); HEPES (11,915 g); NaH_2PO_4 (0,515 g); MgCl_2 (5 mL); KCl (4,025 g);

Para fazer um litro de solução Tyrode, foram adicionados 100 mL da solução estoque, 1 g de glicose e 1,8 mL de CaCl_2 em de água ultrapura (Milli-Q), até completar 1 litro. Esta solução foi equilibrada para um pH de 7,4 com NaOH e mantida em temperatura ambiente.

ANEXO 1- Atestado de aprovação na Comissão de Ética no Uso Animal-UFV

Protocolo 01/2018

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 01/2018, intitulado **“Propriedades morfológicas, cardíacas, mecânicas, moleculares e gênicas de cardiomiócitos isolados e músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos jovens e velhos submetidos ao treinamento resistido”**, coordenado pelo professor Antônio José Natali do Departamento de Educação Física, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 26/04/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 01/2018, named **“Morphological, cardiac, mechanical, molecular and genetic properties of isolated cardiomyocytes and skeletal muscle of young and old spontaneously hypertensive rats submitted to resistance training”**, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on April 26, 2018 valid for 12 months.


Prof. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV