



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Adriana Junqueira

**Efeitos do Exercício Físico Associado à N-Acetilcisteína na
Remodelação Cardíaca de Ratos Espontaneamente
Hipertensos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Titular Dr. Katashi Okoshi
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli

**Botucatu
2019**

Adriana Junqueira

Efeitos do Exercício Físico Associado à N-Acetilcisteína na Remodelação Cardíaca de Ratos Espontaneamente Hipertensos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Titular Dr. *Katashi Okoshi*
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. *Francis Lopes Pacagnelli*

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Junqueira, Adriana.

Efeitos do exercício físico associado à N-acetilcisteína na remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos : exercício e N-Acetilcisteína na remodelação cardíaca / Adriana Junqueira. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Katashi Okoshi
Coorientador: Francis Lopes Pacagnelli
Capes: 40101100

1. Estresse oxidativo. 2. Hipertensão. 3. Exercícios físicos. 4. Remodelação ventricular. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exercício físico; Hipertensão arterial; MAPK; N-acetilcisteína.

Epígrafe

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.”

Santo Agostinho

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Garcia e Maria Helena, às minhas irmãs, Andréa e Ana Paula, por serem meu apoio em todas as conquistas da minha vida.

Agradecimento

À Deus, por direcionar e cuidar dos meus caminhos desde sempre, me ajudando a alcançar os objetivos que Ele mesmo traçou e escolheu para minha vida!

À minha família que longe ou perto nunca faltou palavras de incentivo e que acreditaram em mim mesmo quando eu mesma não acreditava. Pai e mãe, muito obrigada pela educação, por me ensinarem que o grande valor da vida está no SER e não no TER.

Em especial à minha avó, Antonia (*in memoriam*), por toda alegria, carinho e afeto.

À minha melhor amiga, Juliana Marcela, que muitas vezes se arriscou comigo pelas estradas entre Presidente Prudente e Botucatu, por esta longa jornada, seu apoio e ajuda foram muito valiosos!

Aos amigos que fiz em Botucatu, em especial à equipe do Dr. Katashi e Dra. Marina Okoshi pela ajuda em toda minha trajetória desde o biotério (David, Thierres, Eder, Felipe, Guilherme, Marcelo, Ricardo e Dijon) ao laboratório (Aline, Luana e Mariana), assim como, meus alunos de graduação Murillo e Érrison, pela colaboração e empenho na construção deste trabalho.

Ao professor Katashi Okoshi, pela ajuda técnica no ecocardiograma, como também, por toda dedicação e colaboração neste trabalho, contribuindo muito na minha formação acadêmica e pessoal.

À profa. Marina Okoshi pela dedicação, e contribuição neste trabalho.

À Profa. Ana Angelica Henrique Fernandes, pela análise das enzimas antioxidantes.

Ao Prof. Silvio Assis de Oliveira Júnior, pelas análises estatísticas realizadas.

À minha coorientadora Dra. Francis Lopes Pacagnelli pelas valiosas sugestões em momentos cruciais.

À minha banca de qualificação Dr. Marcelo Diarcadia Mariano Cezar e Dra. Luana Urbano Pagan pelos apontamentos proferidos, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, da Seção de Pós-Graduação, em especial Ana Mengue, e da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), meus agradecimentos por toda ajuda e amizade.

À UNOESTE, aos meus colegas de trabalho e aos Coordenadores da Fisioterapia e da Educação Física que sempre se colocaram à disposição em me ajudar na cobertura das minhas funções trabalhistas!

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos que fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso, muito obrigada!

Sumário

Resumo	01
Abstract	04
Introdução	07
Objetivos	13
Material e Métodos	15
Resultados	29
Discussão	43
Conclusão	51
Referências	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Adaptação e protocolo de exercício físico resistido	19
Tabela 2. Protocolo de exercício físico aeróbio	19
Tabela 3. Capacidade física aeróbia, carga máxima para exercício resistido e magnitude da variação (%) entre momentos inicial e final	30
Tabela 4. Pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final e variação (%) entre os dois momentos	31
Tabela 5. Análise ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração.....	32
Tabela 6. Variação (%) das medidas ecocardiográficas das variáveis estruturais do coração (inicial vs. final).....	33
Tabela 7. Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma	34
Tabela 8. Variação (%) da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma (inicial vs. final).....	35
Tabela 9. Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma.....	35
Tabela 10. Variação (%) da função diastólica do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma (inicial vs. final)	36
Tabela 11. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais	37
Tabela 12. Diâmetro do miócito e fração colágena intersticial do miocárdio do ventrículo esquerdo.....	38
Tabela 13. Avaliação da expressão gênica de subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase por RT-PCR em tempo real.....	41
Tabela 14. Expressão miocárdica de proteínas MAPK.....	41
Tabela 15. Expressão miocárdica de proteínas NF-kB e IκB.....	42

Lista de Figuras

Figura 1 – Escada vertical para treinamento de força em ratos	17
Figura 2 – Corte histológico do miocárdio do ventrículo esquerdo	38
Figura 3 – Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio	39
Figura 4 – Concentração de hidroperóxido de lipídeo (LOOH) no miocárdio	40

Lista de Abreviaturas

A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral
AE: átrio esquerdo
ANOVA: análise de variância
AO: diâmetro da aorta
CAT: catalase
CFM: capacidade funcional máxima
CM: carga máxima
CTL: SHR sem tratamento
DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DNA: ácido desoxirribonucleico
DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral
EDPP: espessura diastólica da parede posterior
ERO: espécies reativas de oxigênio
Esp. Rel. VE: espessura relativa do ventrículo esquerdo
EXE: SHR exercitado
EXENAC: SHR exercitado e suplementado com NAC
FC: frequência cardíaca
FCI: fração colágena intersticial
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH-Px: glutathiona peroxidase
HAS: hipertensão arterial sistêmica
HE: hematoxilina-eosina
IC: insuficiência cardíaca
IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MVE: massa do ventrículo esquerdo
NAC: N-acetilcisteína, SHR suplementado com NAC
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-kB: factor nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
Nox: subunidades catalíticas da NADPH

Onda A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio transmitral

Onda E: pico de velocidade de fluxo de enchimento inicial transmitral

Onda S: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral

PA: pressão arterial

PAS: pressão arterial sistólica

PC: peso corporal

RNA: ácido ribonucleico

S' media: média das velocidades máximas de deslocamento sistólico das paredes lateral e septal do anel mitral

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SOD: superóxido dismutase

Tei: índice de performance miocárdica

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico

VD: ventrículo direito

VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior

VE: ventrículo esquerdo

Δ: variação em %

% Enc. Endo: % de encurtamento endocárdico

Resumo

A hipertensão arterial está associada à alta morbidade e mortalidade pelas alterações estruturais e funcionais de órgãos alvo e às alterações metabólicas, com elevado risco de eventos cardiovasculares. A sobrecarga de pressão e o estresse oxidativo têm papel importante na remodelação cardíaca. A hipertensão arterial é um fator de risco modificável para as doenças cardiovasculares, onde os fármacos e o exercício físico regular são capazes de reduzir os níveis pressóricos de indivíduos hipertensos. **Objetivo:** Investigar os efeitos do exercício físico resistido combinado ao aeróbico associado à N-acetilcisteína na remodelação cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Métodos:** Os SHR foram divididos nos grupos sedentário (CTL, n=12), submetido ao exercício combinado (EXE, n=13), sedentário submetido à N-acetilcisteína (NAC, n=13), e ratos submetidos ao exercício combinado e à N-acetilcisteína (EXENAC, n=14). Os ratos dos grupos exercício combinado foram treinados três vezes por semana, durante dois meses, em esteira e escada. Os ratos suplementados receberam NAC durante dois meses, na ração. Testes de capacidade física aeróbica e resistido, avaliação da pressão arterial sistólica e o ecocardiograma foram realizados antes e após os protocolos de tratamento. As seguintes análises foram realizadas: morfometria, histomorfometria, estresse oxidativo, expressão gênica do complexo enzimático NADPH oxidase por RT-PCR real time e expressão de proteínas oxidadas por Western blot. Análise estatística: Para a análise entre os grupos foram realizadas a ANOVA para esquema de dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (distribuição normal) ou o teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn (distribuição não normal). Para o estudo de variação de medidas entre momentos inicial e final, foi utilizada a ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls. Nível de significância de 5%. **Resultados:** Os ratos dos grupos submetidos aos protocolos de exercícios físico combinado apresentaram maior capacidade física aeróbica e de carga máxima que os animais controle após o período de treinamento. A variação (aumento) do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE) indexado pelo peso corporal foi maior nos grupos EXE e NAC vs. CTL, e no grupo EXENAC a variação desse índice foi menor que nos grupos EXE e NAC. Ficou evidenciado que o exercício físico e a NAC, isoladamente, melhorou a função diastólica do VE de acordo com as variáveis E' média, E/E' média e A' média. A função sistólica (VEPP) foi melhor no grupo

EXENAC vs. EXE. A NAC teve ação importante na redução da peroxidação lipídica e, quando esteve associada ao exercício combinado, seu efeito foi ainda mais evidente. A catalase foi maior no grupo EXE (vs CTL) que diminuiu quando se associou a NAC. Em relação ao complexo enzimático da NADPH oxidase, observou-se aumento na expressão da p22 phox e da Nox2 no grupo EXE em comparação ao grupo CTL, sugerindo ativação da via sinalizadora do processo de remodelação cardíaca. A melhora de alguns parâmetros estruturais e funcionais cardíacas observada no grupo EXENAC pode estar associada à redução da expressão da p-JNK e da p-IkB e atenuação do marcador da peroxidação lipídica. **Conclusão:** O exercício físico aeróbico combinado ao resistido associado à N-acetilcisteína em ratos espontaneamente hipertensos atenua a remodelação cardíaca, que está associada a diminuição do marcador de estresse oxidativo e da expressão proteica da p-JNK e p-IkB.

Palavras chave: Exercício físico, hipertensão arterial, estresse oxidativo, N-acetilcisteína, MAPK, NF-kB.

Abstract

Arterial hypertension is associated with high morbidity and mortality due to structural and functional alterations of target organs and metabolic alterations, with a high risk of cardiovascular events. Pressure overload and oxidative stress play an important role on cardiac remodeling. Arterial hypertension is a modifiable risk factor for cardiovascular disease, and medicines and regular exercise reduce blood pressure in hypertensive individuals. **Objective:** To investigate the effects of resistance exercise combined with aerobic exercise associated with N-acetylcysteine on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** SHR were divided into sedentary (CTL, n=12), combined exercise (EXE, n=13), N-acetylcysteine sedentary (NAC, n=13), and rats submitted to combined exercise and N-acetylcysteine (EXENAC, n=14). The rats of the combined exercise groups were trained three times a week for two months on a treadmill and ladder. Supplemented rats received NAC for two months in their rat chow. Aerobic and resistance physical capacity tests, systolic blood pressure measurements, and echocardiography were performed before and after treatment protocols. The following analysis were performed: morphometry, histomorphometry, oxidative stress, gene expression of NADPH oxidase enzyme complex by real time RT-PCR and Western blot oxidized protein expression. Statistical analysis: Comparison between groups were performed by two-way ANOVA, complemented with Bonferroni test (normal distribution), or Kruskal-Wallis complemented with Dunn test (non-normal distribution). The two-way ANOVA complemented with Student-Newman-Keuls test was used to compare initial and final data. The results were discussed at a significance level of 5%. **Results:** The rats of groups submitted to combined exercise protocols presented higher aerobic capacity and maximum load than the control animals. The variation (increase) in left ventricular (LV) diastolic diameter indexed by body weight was greater in EXE and NAC groups vs. CTL. In EXENAC group the increase of this index was smaller than in EXE and NAC groups. It was observed that physical exercise or NAC alone improves LV diastolic function according to the parameters E' average, E/E' average, and A' average. Systolic function (posterior wall shortening velocity index) was better in EXENAC vs. EXE. NAC reduced lipid peroxidation and when associated with combined exercise, its effect was even more evident. Catalase was higher in EXE group (vs. CTL) and decreased when associated with NAC. Regarding to NADPH oxidase enzymatic complex, it was observed increase of p22 phox and Nox2

expression in EXE group compared to CTL, suggesting activation of cardiac remodeling signaling pathway. Improvement of some structural and functional parameters observed in EXENAC group may be associated with reduced expression of p-JNK and p-IkB and attenuation of lipid peroxidation. **Conclusion:** Combined aerobic and resistance exercise, associated with N-acetylcysteine, in spontaneously hypertensive rats attenuates cardiac remodeling, which is associated with reduction of oxidative stress and p-JNK and p-IkB protein expression.

Keywords: Physical exercise, hypertension, oxidative stress, N-acetylcysteine, MAPK, NF-kB.

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), e está associada à alta morbidade e mortalidade. Hoje, ela é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.¹

Apontada como um problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde, a HAS é considerada uma das dez maiores causas de morte prematura, que se pode prevenir, em países desenvolvidos.² No Brasil, de acordo com a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – Vigitel 2012, um quarto da população adulta (24,3%) tem hipertensão arterial.³

A HAS associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e às alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais,⁴ como a hipertrofia patológica do músculo cardíaco, que resulta da adaptação do miocárdio frente à sobrecarga de pressão imposta pela HAS, com o objetivo de reduzir o estresse proporcionado nas paredes da câmara ventricular. Essa sobrecarga de pressão pode gerar mudança na arquitetura do colágeno e favorecer o aumento de fibrose, com consequente aumento da rigidez do músculo e disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (VE),⁵ tais modificações fazem parte da remodelação cardíaca patológica.⁶

No sistema cardiovascular, as mudanças nas condições hemodinâmicas impostas pela sobrecarga de pressão gerada pela HAS podem causar alterações funcionais na síntese e liberação de fatores vasoativos no sistema vascular. Ao longo dos anos ocorre uma reforma arterial de longo prazo, traduzido pela diminuição da força laminar de cisalhamento (atrito do sangue sobre a parede dos

vasos) em algumas regiões, diminuindo a estimulação da produção do óxido nítrico (NO) que tem função vasorelaxante, além de alterar genes locais, o que auxilia na redução do estresse oxidativo.⁷

Além disso, a HAS pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem ser produzidas por diferentes fontes, tais como, células vasculares, óxido nítrico (NO), xantina oxidase, lipoxigenase, mieloperoxidase e cicloxigenase (associada à membrana).⁸⁻⁹ Além disso, a família de enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, com suas subunidades catalíticas (Nox), constitui uma das principais fontes de produção de ERO no sistema cardiovascular e na vasculatura, implicando papel importante na fisiopatologia da hipertensão e aterosclerose.¹⁰⁻¹⁴

As NADPH oxidases foram identificadas em diversos órgãos e tecidos, e são enzimas transmembrana que produzem superóxido pela transferência de um elétron da NAD(P)H para o oxigênio molecular. Embora a família Nox já tenha sido descrita com sete subunidades diferentes, nos miócitos, encontramos a expressão da Nox2 e Nox4, que são ligadas à subunidade p22phox. A atividade da Nox2 depende da ligação com outras subunidades citosólicas, como a p47phox, entre outras, que se deslocam até a membrana. Já a Nox4 não precisa se ligar a outras subunidades citosólicas para se tornar ativa.^{13,15,16}

Atualmente, há substancial evidência que o aumento do estresse oxidativo tenha papel importante na fisiopatologia da remodelação cardíaca. O estresse oxidativo ocorre quando há desbalanço entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante. No miocárdio, o sistema de enzimas antioxidantes é composto pelas enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase, que protege as células das ações de ERO e dos radicais livres. Esse desequilíbrio no sistema

oxidativo, com aumento da atividade da NADPH oxidase formando radicais livres em excesso e consequente diminuição das enzimas antioxidantes, pode causar hipertrofia e morte de miócitos, além de fibrose miocárdica.¹⁷

O processo de remodelamento miocárdico, ocasionado pelo estresse oxidativo, pode estar ligado às vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs)¹⁸, onde o desenvolvimento da hipertrofia miocárdica está ligado à ação das proteínas como a ERK1/2, JNK e p38 da via das MAPKs.¹⁹

A produção de ERO ativa a cascata MAPK e, conseqüentemente, induz a translocação do fator nuclear kappa-B (NF-kB) do citosol para o núcleo.²⁰ O início da transcrição gênica dependente de NF-kB é um passo fundamental na produção de mediadores pró-inflamatórios,²¹ podendo ocasionar o desenvolvimento e a progressão da remodelação do miocárdio e da matriz extracelular.²²

Portanto, o estresse oxidativo tem efeitos diretos sobre a estrutura e função celular, e pode ativar moléculas sinalizadoras integrais do remodelamento cardíaco, sugerindo papel de destaque das ERO, derivadas da NADPH oxidase, na gênese da disfunção contrátil do músculo cardíaco.^{12, 23}

A HAS é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis para as doenças cardiovasculares.²⁴ Ela requer tratamento farmacológico e não farmacológico, e as diretrizes européias e americanas atuais de tratamento da HAS recomendam o exercício físico regular como terapia de primeira linha. O exercício físico (resistido e/ou aeróbico) é capaz de reduzir os níveis pressóricos de indivíduos hipertensos, em parte, através da redução da resistência vascular periférica sistêmica. Alterações estruturais e hemodinâmicas participam deste processo, ocorrendo remodelação cardíaca, principalmente do VE, melhorando a força de

contração e o volume de enchimento diastólico ventricular, reduzindo a frequência cardíaca e melhorando o débito cardíaco.²⁵

Os efeitos benéficos do exercício físico no sistema cardiovascular podem ser obtidos através de exercícios físicos estruturados e individualizados. O treinamento aeróbio é recomendado como forma preferencial de exercício por reduzir a PA de indivíduos pré-hipertensos e hipertensos. Estes efeitos estão associados à redução da ativação neuro-humoral e inflamatória sistêmica, além da melhora na função vascular. Entre seus efeitos benéficos, destaca-se a ação antioxidante, com aumento na expressão de enzimas antioxidantes e redução na expressão de enzimas pró-oxidantes.^{26,27} Os radicais livres produzidos durante a contração muscular atuam como moléculas de sinalização, estimulando a expressão gênica e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes. No mais, modulam vias de proteção ao estresse oxidativo promovendo, entre outros, o aumento de enzimas reparadoras do ácido desoxirribonucleico (DNA) miocárdico.²⁸⁻³⁰

Na literatura, alguns estudos evidenciam que o treinamento tanto de resistência quanto o aeróbio reduz a PA de repouso em pacientes com hipertensão leve a grave^{25,31}, no entanto, algumas evidências relatam que tanto o exercício resistido isométrico^{32,33} quanto o dinâmico^{34,35} podem induzir reduções da PA sistólica e diastólica de repouso em indivíduos com hipertensão.

Todas essas ações tornam o exercício físico primordial ao tratamento da HAS. Assim, em alguns casos o exercício pode levar ao controle da PA independentemente do uso de medicamentos. Em outros, pode promover redução da dose e/ou do número de medicamentos utilizados.³⁶ Relação inversa entre a prática de exercício físico e a prevalência de HAS tem sido demonstrada na literatura.^{37,38}

Embora a atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelo exercício possa modular as vias de proteção ao estresse oxidativo proveniente da HAS, a terapia antioxidante, com seu fator cardioprotetor, ainda é assunto escasso na literatura. A ação destes mecanismos na remodelação cardíaca tem sido explorada e bem definida em diversas situações como as citadas anteriormente. A glutathiona (L- γ glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo endógeno que apresenta papel central na defesa celular contra o estresse oxidativo.³⁹ Ela é sintetizada e mantida em elevadas concentrações nas células em geral.⁴⁰

A N-acetilcisteína (NAC), uma precursora da glutathiona, é uma molécula com propriedades antioxidantes, que pode restabelecer os níveis de glutathiona total no miocárdio e reduzir significativamente os marcadores de estresse oxidativo sobre a remodelação cardíaca na hipertensão arterial não controlada.³⁹ Em ratos infartados, a suplementação de NAC obteve como resultado a restauração da concentração total de glutathiona miocárdica e redução de marcadores do estresse oxidativo, como hidroperóxido de lipídeo e peróxido de hidrogênio.^{39,41}

Considerando os efeitos da NAC previamente descritos, espera-se que a sua associação com o exercício físico aeróbico combinado ao resistido otimize a resposta cardioprotetora, atenuando o processo de remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico resistido combinado ao aeróbico associado à NAC na remodelação cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos.

Material e Métodos

Animais e Constituição dos Grupos

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), machos, com 6 meses de idade, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB, da Universidade de Campinas - UNICAMP.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Controle (CTL, n=15): formado por ratos SHR que não foram submetidos a nenhum tratamento;
- Exercício (EXE, n=15): formado por ratos SHR que foram submetidos aos protocolos de exercício físico;
- N-acetilcisteína (NAC, n=15): formado por ratos SHR que receberam NAC;
- Exercício + N-acetilcisteína (EXENAC, n=15): formado por ratos SHR que foram submetidos aos protocolos de exercício físico e simultaneamente receberam NAC.

Os animais foram alojados em gaiolas (2 animais/gaiola), mantidos em ambiente com temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12/12 horas claro/escuro invertidos) controlados.

Após verificação do consumo diário de ração, os animais dos grupos NAC e EXENAC receberam, adicionada à ração, NAC na dose de 120 mg/kg/dia por oito semanas.⁴²

Os animais dos grupos EXE e EXENAC foram submetidos à protocolos de exercícios resistido e aeróbico, três vezes por semana, em dias alternados, durante oito semanas.

Determinação da Carga Máxima para Exercício Resistido

O exercício resistido foi realizado em escada vertical especialmente construída para ratos (110 cm de altura, 18 cm de largura, grade de 2 cm entre os degraus, 80° de inclinação). No topo da escada havia uma câmara de alojamento (comprimento x largura x altura = 20x20x20 cm) que servia de abrigo ao final de cada subida, para o período de descanso (Figura 1). Dois dias após a adaptação ao protocolo, cada animal foi avaliado para estabelecer a capacidade máxima de carga. O teste consistiu de subidas na escada com aumento progressivo de carga.^{43,44} Foi colocado, preso a cauda do animal, um aparato que continha o peso carregado. Iniciou-se a subida com 75% do peso corporal do animal, e a cada nova subida era acrescido 15% do peso corporal até que fosse atingida a maior carga com a qual o rato conseguisse subir completamente a escada. Essa carga foi considerada a carga máxima (CM) do animal.

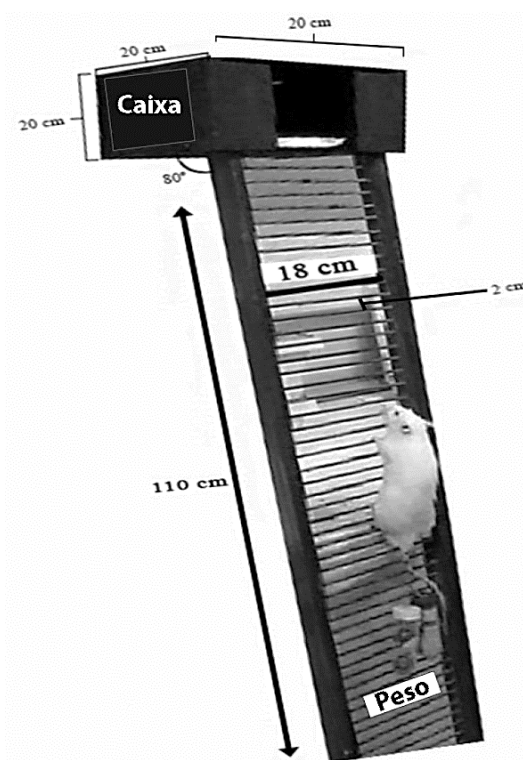


Figura 1 - Equipamento usado para a realização do treinamento de força em ratos, adaptado de Cassilhas et al., 2012.⁴³ Foto de Neves et al., 2016.⁴⁵

Teste de Capacidade Funcional Máxima

A capacidade funcional máxima (CFM) foi avaliada pelo teste de tolerância ao esforço físico, realizado antes e ao término do período de treinamento. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, sendo iniciado na velocidade de 6 metros por minuto (m/min), com incrementos de 3 m/min a cada três minutos, até a exaustão do animal. A distância e a durao total da corrida foram registradas.⁴⁶ Os animais foram adaptados ao ambiente de teste, antes das avaliaoes, durante uma semana por 10 min/dia.

Protocolo de Exercício Físico Resistido

O exercício resistido foi realizado três vezes por semana, em dias alternados, com aumento gradativo de carga, de acordo com protocolo adaptado de Leite *et al.*^{44,47} Inicialmente, houve um período de adaptaoo, no qual os ratos foram estimulados a subir a escada sem carga. Ao atingirem o topo da escada, os animais tinham um período de dois minutos de recuperaoo, e então eram estimulados a iniciar a subida novamente. O procedimento foi repetido até que os ratos subissem a escada três vezes sem necessidade de estímulo.

Inicialmente, na primeira semana, houve um processo de adaptaoo em que os ratos realizaram três subidas na escada sem necessidade de estímulo sendo que, no primeiro dia as subidas foram sem carga, no segundo dia foi adicionada carga de 15% do peso corporal, e no terceiro dia foi adicionada carga de 30% do peso corporal. A partir da segunda semana, o treinamento consistiu de quatro subidas na escada com cargas correspondentes a 50%, 75%, 90% e 100% da CM, previamente estabelecida para cada rato (Tabela 1), com um período de dois

minutos de recuperação. O treinamento foi mantido até o final do período experimental.

Tabela 1. Adaptação e protocolo de exercício físico resistido

Semanas	Dias	Carga	Quantidade de subidas*
1 ^a	1 ^o	0 (% peso corporal)	3
	2 ^o	15 (% peso corporal)	3
	3 ^o	30 (% peso corporal)	3
2 ^a à 8 ^a	1 ^o	50, 75, 90 e 100 (% CM)	4
	2 ^o	50, 75, 90 e 100 (% CM)	4
	3 ^o	50, 75, 90 e 100 (% CM)	4

CM: carga máxima; *sem necessidade de estímulo

Protocolo de Exercício Físico Aeróbio

Logo após a realização do exercício resistido os animais eram conduzidos para o exercício aeróbico, que foi realizado em esteira, três vezes por semana, em dias alternados, por 8 semanas, de acordo com protocolo adaptado de Moreira *et al.*⁴⁸ As três primeiras semanas do protocolo de exercício físico aeróbico foram

Tabela 2. Protocolo de exercício físico aeróbio

Semanas	Velocidade (m/min)	Duração (min)
1 ^a	7,5-10	20
2 ^a	12-14	30
3 ^a	15-17	40
4 ^a à 8 ^a	19 (60% VMáx)	40

m: metros; min: minutos; VMáx: velocidade máxima atingida no teste

marcadas por um período adaptativo, com aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício, conforme tabela abaixo (Tabela 2). A partir da quarta semana de treinamento, os ratos foram submetidos a sessões de corrida a 60% da CFM, com duração de 40 minutos, até o final do período experimental.

Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida na cauda do animal, antes e ao final do período experimental. Para aferição da PAS foi utilizado o método da pletismografia.⁴⁹ Os ratos foram colocados em uma caixa de madeira (50x40 cm), forrada com maravalha de pinus autoclavada, à temperatura de 40°C por 5 minutos, com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal. Para aferição da PAS foi utilizado o eletro-esfigmomanômetro NarcoBio-System®, modelo 709-0610 (InternationalBiomedical Inc., USA). O manguito foi posicionado em torno da cauda do animal e conectado a um transdutor de pressão (*Gould*, OH, USA). O manguito foi insuflado até atingir a pressão de 400 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA).

Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado no início e ao final do período experimental. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat

Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição para-esternal, eixo menor. A avaliação do VE foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares.⁵⁰⁻⁵² As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em uma impressora modelo UP-895 (Sony Co, Japan). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP); e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (ERVE) foi calculada dividindo-se a EDPP multiplicada por dois pelo DDVE. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE+EDPP+EDSIV)^3-(DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio.^{51,53} O índice de MVE (IMVE) foi calculado indexando a MVE pelo peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo) $[(DDVE-DSVE)/DDVE] \times 100$; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; e 3) deslocamento sistólico (S') do anel mitral (média aritmética das velocidades das paredes lateral e septal), obtido por Doppler tissular. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); 5) deslocamento diastólico inicial (E') e

tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades das paredes lateral e septal), obtido por Doppler tissular; e 6) razão entre as ondas E e E' média. A avaliação conjunta das funções diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico também conhecido por índice de Tei (soma do tempo de contração isovolumétrica e TRIV, dividido pelo tempo de ejeção do VE).⁵⁴

Análise de Variáveis Anatômicas

Após à realização do ecocardiograma final os animais foram colocados em jejum (12h) e, no dia seguinte, os animais foram eutanasiados sob anestesia com tiopental (50 mg/kg, i.p.) seguido de decapitação. Após a retirada do coração do tórax, os pesos dos ventrículos direito e esquerdo e dos átrios foram medidos. Amostras do VE foram obtidas e armazenadas para realização dos estudos morfométrico, bioquímico e de biologia molecular. Além do coração, foram colhidos o pulmão e fragmentos do fígado para determinação da razão peso úmido/peso seco desses órgãos. As razões entre os pesos úmidos e secos também foram calculadas para os átrios e ambos os ventrículos. A razão peso úmido/seco reflete a quantidade de líquido no tecido.

Estudo Morfométrico

Amostras do miocárdio do VE foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por período de 48 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, para se obter cortes histológicos coronais de 4 µm. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução hematoxilina-eosina (HE) para medida do diâmetro dos miócitos, empregando-se microscópio LEICA DM750 acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de

análise de imagens ImagePro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).^{55,56}

Histomorfometria - As imagens foram obtidas por meio de microscópio óptico binocular. Todas as imagens foram capturadas por câmera de vídeo no aumento de 40x. A seleção das imagens para captura e digitalização foi feita em áreas histológicas preservadas. A morfometria dessas imagens obtidas e digitalizadas foi realizada utilizando-se *software* apropriado para tal fim. De cada um dos quatro cortes obtidos do VE de cada animal foram realizadas capturas de campos diferentes, escolhidos de acordo com o local onde se permitia visualizar mais células em corte transversal. Foram mensuradas cinquenta células por corte do VE.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de *picrosirius red*, específico para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do VE. As imagens do tecido cardíaco foram capturadas por computador LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pró-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados vinte campos, utilizando objetiva de 40X. Os campos escolhidos foram as áreas afastadas da região perivascular.⁵⁷

Análise da Atividade de Enzimas Antioxidantes

As amostras do miocárdio do VE (200 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e análise da atividade das enzimas antioxidantes

superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT).⁵⁸ As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (µQuant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tek Instruments, USA).⁵⁹ Todos os reagentes foram de procedência da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Quantificação de Hidroperóxido de Lipídio

Parte do sobrenadante obtido para análise de atividade enzimática foi utilizado para quantificação de hidroperóxido de lipídio (LOOH). A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada por espectrofotometria utilizando-se *kit* disponível comercialmente.⁵⁹

Avaliação da Expressão Gênica de Subunidades do Complexo Enzimático NADPH Oxidase por RT-PCR em Tempo Real

A análise de mRNAs das subunidades da enzima NADPH oxidase Nox2, Nox4, p22 phox e p47 phox e dos genes de referência ciclofilina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR). A extração de RNA total do VE foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito.^{60,61} Resumidamente, o fragmento do VE congelado foi mecanicamente homogeneizado em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente.⁶² O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. A fase aquosa formada após a

centrifugação foi separada, acrescida de 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubada por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA.

Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C. O sedimento de RNA foi submetido à secagem por 10 min à temperatura ambiente e ressuspenso em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60°C, por 10 min. Para remover qualquer contaminação de DNA, as amostras foram incubadas com DNaseI (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Posteriormente, foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm foi de aproximadamente 2,0. Um micrograma de RNA foi submetido a RT utilizando-se o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA) para volume total de reação de 20 µL, de acordo com método recomendado pelo fabricante. Alíquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), foram submetidas à PCR em tempo real utilizando-se 10 µL 2X Taqman Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems) e 1 µL de ensaio (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e antisenso e sonda Taqman® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene: Nox2 (Taqman assay Rn00576710_m1; Ref. seq. Genbank NM_023965.1), Nox4 (Taqman assay Rn00585380_m1; Ref. seq. Genbank NM_053524.1), p22phox (Taqman assay Rn00577357_m1; Ref. seq. Genbank NM_024160.1) e p47phox (Taqman assay 20 Rn00586945_m1; Ref. seq. GenbankNM_053734.2). A amplificação e a análise foram realizadas utilizando o

StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados de expressão gênica dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes de referência ciclofilina (Taqman assay Rn00690933_m1; Ref. seq. Genbank NM_017101.1) e GAPDH (Taqman assay Rn01775763_g1 Ref. Seq. Genbank NM_058704.1). As reações foram feitas em triplicata e a expressão gênica foi calculada pelo método do CT (critical threshold cycle) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$).⁶³

Avaliação da Expressão Proteica por Western Blot

A expressão proteica das formas total e fosforilada de proteínas das MAPK (JNK, ERK e p38-MAPK), do NF- κ B (subunidade p65) e de seu inibidor (I κ B) foi avaliada por Western blot.^{64,65}

Fragmentos do VE (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 μ L de tampão RIPA, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12.000 rpm, a 4°C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80°C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford. A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento e de resolução, na concentração de 6 a 12%, dependendo do peso molecular da proteína analisada. A corrida eletroforética foi efetuada a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por aproximadamente 2h, com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema TransBlot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192

mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Regiões inespecíficas de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1%) por 60 min à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada overnight, a 4°C, com o anticorpo primário diluído na solução de bloqueio, sob agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 90 min. A seguir, a membrana foi lavada com TBST e os sinais foram visualizados com auxílio de *kit* para quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e analisador de imagens Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). As bandas obtidas nas imagens foram quantificadas por densitometria utilizando-se o programa GelPro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology).

- Anticorpos primários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA): p-JNK (sc-6254), JNK total (sc-137019), p-ERK (sc-136521), p-p38-MAPK (sc-7973), p38-MAPK total (sc-7972), p-IkB- α (sc-8404), IkB- α total (sc-1643), Ser 276 p-p65 NF- κ B (sc-101749), p65 NF- κ B total (sc-8008).
- Anticorpo primário da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): ERK total (sab-2500364).
- Anticorpos secundários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA): anti-mouse (sc-516102) e anti-rabbit (sc-2357).

Análise Estatística

Os resultados são apresentados em médias e desvios padrão ou medianas e percentis 25 e 75, de acordo com a distribuição normal ou não normal, respectivamente. Para a normalidade dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise entre os grupos foram realizadas a ANOVA para esquema de dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, quando os resultados das variáveis apresentaram distribuição normal. Para as variáveis com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Para o estudo de variação de medidas entre momentos inicial e final, foi utilizada a ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls. A comparação da frequência de mortalidade entre os grupos foi realizada pelo teste de Goodman. As conclusões estatísticas são discutidas no nível de significância de 5%.

Resultados

Caracterização dos Grupos Experimentais e Variáveis Anatômicas

Para a constituição dos grupos nesse estudo foram utilizados 60 ratos SHR, divididos em controle (CTL=15), exercitados (EXE=15), N-acetilcisteína (NAC=15) e exercitados com N-acetilcisteína (EXENAC=15). A perda amostral durante o experimento foi de oito animais, sendo três no grupo CTL, dois no grupo EXE, dois no grupo NAC e um no grupo EXENAC ($p>0,05$).

Teste de Esforço

Na Tabela 3 são apresentados os dados da capacidade física aeróbia com a distância percorrida e a velocidade máxima do teste de esforço, além da CM para

Tabela 3. Capacidade física aeróbia, carga máxima para exercício resistido e magnitude da variação (%) entre momentos inicial e final

		CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
Distância (metros)	Inicial	432 ± 155	425 ± 119	382 ± 137	414 ± 107
	Final	391 ± 97	893 ± 120 *	392 ± 46	842 ± 107 §
	Δ Dist (%)	4,04 ± 55,0	122 ± 57 *	13,5 ± 36,3	114 ± 53 §
Tempo (minutos)	Inicial	14,5 ± 2,45	14,2 ± 2,06	13,7 ± 2,44	14,7 ± 1,78
	Final	13,4 ± 3,12	20,3 ± 1,35 *	13,4 ± 0,92	19,9 ± 1,55 §
	Δ Tempo (%)	- 4,59 ± 28,7	44,7 ± 18,7 *	-0,03 ± 15,9	37,3 ± 15,5 §
Carga Máxima (gramas)	Inicial	282 (257-353)	371 (315-426) *	290 (272-321)	296 (266-343) #
	Final	328 ± 60	689 ± 88 *	305 ± 38	567 ± 88 # §
	Δ C. Máx. (%)	10,9 ± 29,9	92,2 ± 39,2 *	2,17 ± 16,9	87,2 ± 32,3 §

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn e ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls. *: $p<0,05$ vs CTL; #: $p<0,05$ vs EXE; §: $p<0,05$ vs NAC.

exercício resistido avaliada pela capacidade máxima dos animais, antes e após o protocolo de exercício físico, assim como a variação (%) da capacidade física aeróbia e da CM. Apesar dos ratos terem sido alocados aleatoriamente em cada um dos grupos no início do experimento, os ratos do grupo EXE mostraram maior CM em relação aos grupos CTL e EXENAC. Ao final do experimento, os grupos EXE e EXENAC apresentaram melhor desempenho físico em relação aos seus respectivos grupos controle, CTL e NAC. Apesar do melhor desempenho do grupo EXE no início do experimento, a magnitude da variação da CM não foi diferente entre os grupos exercitados (EXE e EXENAC).

Pressão Arterial Sistólica

A Tabela 4 apresenta os valores da PAS inicial e final, assim como, a variação da PAS dos quatro grupos. O grupo NAC apresentou PAS menor em relação ao grupo CTL.

Tabela 4. Pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final e magnitude da variação (%) entre os dois momentos

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
PAS inicial (mmHg)	250 ± 17	248 ± 22	245 ± 20	247 ± 26
PAS final (mmHg)	217 ± 16	213 ± 12	203 ± 10 *	208 ± 09
Δ PAS (%)	-8,79 ± 13,2	-9,02 ± 15,7	-15,3 ± 8,85	-13,2 ± 8,92

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni e ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs CTL; #: p<0,05 vs EXE; §: p<0,05 vs NAC.

Avaliação Ecocardiográfica

O ecocardiograma foi utilizado para avaliar as variáveis estruturais e funcionais do coração. O exame foi realizado antes do início do protocolo de treinamento para assegurar distribuição homogênea dos ratos entre os grupos (dados não apresentados). As Tabelas 5 a 10 apresentam as variáveis estruturais do

Tabela 5. Análise ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
PC final (g)	369 ± 14,7	366 ± 23,7	371 ± 23,3	365 ± 26,8
FC (bpm)	232 (215-261)	235 (211-267)	244 (222-258)	253 (229-287)
DDVE (mm)	7,43 ± 0,34	7,72 ± 0,39	7,85 ± 0,46 *	7,54 ± 0,49
DDVE/PC (mm/kg)	20,2 ± 1,07	21,2 ± 1,37	21,3 ± 1,64	20,7 ± 1,17
DSVE (mm)	3,49 ± 0,47	3,71 ± 0,32	3,92 ± 0,54 *	3,60 ± 0,46
EDPP (mm)	1,50 ± 0,12	1,52 ± 0,10	1,56 ± 0,12	1,62 ± 0,14 #
Esp. rel. VE	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,43 ± 0,04 # §
AO (mm)	4,38 (4,20-4,38)	4,38 (4,26-4,56)	4,38 (4,29-4,47)	4,29 (4,20-4,38)
AE (mm)	5,92 ± 0,44	5,83 ± 0,38	5,86 ± 0,35	5,95 ± 0,41
AE/AO	1,37 ± 0,11	1,33 ± 0,10	1,34 ± 0,08	1,37 ± 0,07
AE/PC (mm/kg)	16,1 ± 1,04	16,0 ± 1,06	15,9 ± 1,02	16,3 ± 0,82
MVE (g)	0,74 (0,69-0,79)	0,79 (0,74-0,92)	0,88 (0,79-0,93) *	0,82 (0,78-0,97)
IMVE (g/kg)	2,04 ± 0,21	2,23 ± 0,26	2,38 ± 0,39 *	2,37 ± 0,38

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. PC: peso corporal em gramas; FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP: espessuras diastólicas da parede posterior do VE; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. *: p<0,05vs CTL; #: p<0,05 vs EXE; §: p<0,05 vs NAC.

coração, função sistólica e função diastólica do VE avaliadas ao final do experimento, assim como a variação destes valores em relação ao exame inicial. O grupo NAC apresentou maior DDVE, DSVE, MVE e IMVE em comparação ao grupo CTL. A EDPP foi maior no grupo EXENAC em relação ao grupo EXE, e a espessura relativa do VE foi maior no grupo EXENAC em relação ao grupo EXE e NAC. O PC,

Tabela 6. Magnitude da variação (%) das medidas ecocardiográficas das variáveis estruturais do coração (inicial vs. final)

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
Δ PC (%)	5,87 ± 2,77	2,28 ± 4,33 *	5,85 ± 3,03	4,31 ± 3,09
Δ FC (%)	2,35 ± 21,8	2,03 ± 15,1	-2,38 ± 17,4	7,69 ± 16,6
Δ DDVE (%)	4,36 ± 5,71	6,32 ± 5,43	11,0 ± 5,48 *	3,26 ± 6,82 #
Δ DDVE/PC (%)	-1,38 ± 4,98	4,11 ± 6,67 *	4,98 ± 6,25 *	-0,98 ± 6,25 # §
Δ DSVE (%)	18,2 ± 20,0	23,1 ± 22,7	41,0 ± 30,3	18,1 ± 23,8
Δ EDPP (%)	104,2 ± 34,4	111,8 ± 29,3	124,7 ± 38,1	99,6 ± 33,2
Δ Esp. rel. VE (%)	-15,7 ± 8,96	-18,7 ± 8,52	-19,6 ± 6,73	-12,9 ± 10,8
Δ AO (%)	3,30 ± 5,36	4,53 ± 4,10	3,94 ± 2,84	2,63 ± 5,60
Δ AE (%)	1,73 ± 6,43	-1,93 ± 5,20	0,82 ± 6,68	0,46 ± 9,71
Δ AE/AO (%)	-1,18 ± 9,67	-6,01 ± 6,85	-2,93 ± 6,99	-2,15 ± 6,96
Δ AE/PC (%)	-3,47 ± 6,74	-4,03 ± 5,21	-4,73 ± 6,21	-3,71 ± 8,59
Δ MVE (%)	-11,5 ± 18,1	-9,42 ± 15,9	2,14 ± 20,0	-9,81 ± 12,5
Δ IMVE (%)	-16,2 ± 14,5	-11,4 ± 15,4	-3,36 ± 19,5	-13,5 ± 12,0

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. PC: peso corporal em gramas; FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP: espessuras diastólicas da parede posterior do VE; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE. ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls; *: p<0,05 vs CTL; #: p<0,05 vs EXE; §: p<0,05 vs NAC.

FC, DDVE/PC, AO, AE, AE/AO e AE/PC não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 5).

Na avaliação da variação (%) dos parâmetros estruturais do coração (Tabela 6) podemos observar que o ganho do peso corporal foi menor no EXE em comparação com o grupo CTL. A variação do DDVE foi maior no grupo NAC em relação ao CTL e menor no grupo EXENAC em comparação ao EXE. Já, a variação do DDVE/PC foi maior nos grupos EXE e NAC em comparação com o grupo CTL.

Tabela 7. Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
% Enc. Endo	52,7 ± 5,14	51,9 ± 3,94	50,5 ± 5,41	52,4 ± 4,91
VEPP (mm/s)	39,4 ± 5,01	36,4 ± 2,96	39,7 ± 3,44	41,6 ± 3,57 #
Índice de Tei	0,60 ± 0,10	0,56 ± 0,06	0,57 ± 0,09	0,58 ± 0,07
S' média (cm/s)	3,50 ± 0,30	3,45 ± 0,30	3,47 ± 0,30	3,57 ± 0,27

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. % Enc. Endo: % de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Índice de Tei (índice de performance miocárdica); S' média: média das velocidades sistólicas máximas de deslocamento das paredes lateral e septal do anel mitral avaliada por Doppler tissular. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni; #: $p < 0,05$ vs EXE.

Observamos ainda que a variação desse dado no grupo EXENAC foi menor em comparação aos grupos EXE e NAC. Outras diferenças entre as variações dos parâmetros estruturais do coração não foram observadas entre os grupos.

Em relação à função sistólica do VE (Tabela 7), apenas o índice VEPP mostrou-se maior no grupo EXENAC em relação ao grupo EXE. Os demais índices não mostraram diferenças entre os grupos. Não foram observadas diferenças na avaliação da variação da função sistólica do VE (Tabela 8).

Tabela 8. Magnitude da variação (%) da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma (inicial vs. final)

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
Δ % Enc. Endo (%)	-7,56 ± 11,5	-9,56 ± 11,8	-15,2 ± 10,8	-8,57 ± 11,4
Δ VEPP (%)	1,23 ± 29,4	-7,07 ± 12,2	1,60 ± 17,1	0,79 ± 14,3
Δ Índice de Tei (%)	-2,21 ± 16,4	-1,12 ± 11,6	3,57 ± 17,6	-3,86 ± 16,7
Δ S' média (%)	6,06 ± 15,5	0,15 ± 10,5	2,46 ± 12,6	3,50 ± 9,08

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. % Enc. Endo: % de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Índice de Tei (índice de performance miocárdica); S' média: média das velocidades sistólicas máximas de deslocamento das paredes lateral e septal do anel mitral avaliada por Doppler tissular. ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 9. Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
E mitral (cm/s)	91,5 ± 8,05	86,8 ± 7,37	93,5 ± 7,87	89,9 ± 6,62
A mitral (cm/s)	36,0 (35,0-48,0)	41,0 (36,5-52,0)	47,0 (44,0-53,5)	46,0 (39,0-58,0)
E/A	2,32 ± 0,47	2,13 ± 0,57	2,02 ± 0,46	1,94 ± 0,52
TRIV (ms)	31,3 ± 3,52	33,0 ± 3,37	31,7 ± 2,84	31,9 ± 3,39
E' média (cm/s)	3,66 ± 0,38	3,95 ± 0,57	4,10 ± 0,46 *	3,93 ± 0,31
E/E' média	25,1 ± 2,18	22,4 ± 3,94 *	23,0 ± 2,68	23,2 ± 1,98
A' média (cm/s)	2,58 ± 0,51	3,31 ± 0,98 *	3,01 ± 0,56	3,20 ± 0,60

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. E: pico de velocidade do fluxo de enchimento inicial; A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn; *: p<0,05 vs CTL.

Os resultados da avaliação da função diastólica do VE (Tabela 9) mostram que o índice E' média foi maior no grupo NAC em relação ao grupo CTL. O índice E/E' média foi menor no grupo EXE quando comparado ao CTL e, por fim, o índice A' média foi maior no grupo EXE vs. CTL. Na avaliação da variação da função diastólica do VE (Tabela 10), encontramos diferença apenas na variação do E mitral que no grupo EXENAC foi maior em comparação ao grupo NAC.

Tabela 10. Magnitude da variação (%) da função diastólica do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma (inicial vs. final)

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
Δ E mitral (%)	-4,55 \pm 7,19	-8,50 \pm 7,08	-0,72 \pm 7,25	-7,64 \pm 8,50 §
Δ A mitral (%)	-18,0 \pm 25,4	-16,9 \pm 20,5	-5,67 \pm 21,8	-4,54 \pm 33,6
Δ E/A (%)	25,3 \pm 36,0	15,4 \pm 24,5	9,22 \pm 19,5	5,45 \pm 28,4
Δ TRIV (%)	-5,03 \pm 12,0	1,09 \pm 7,99	-1,31 \pm 14,2	-4,63 \pm 15,1
Δ E' média (%)	1,26 \pm 13,9	5,83 \pm 15,7	4,36 \pm 16,5	10,4 \pm 15,6
Δ E/E' média (%)	-3,59 \pm 19,7	-12,1 \pm 12,0	-3,34 \pm 12,4	-14,3 \pm 10,3
Δ A' média (%)	-13,5 \pm 19,7	4,29 \pm 43,3	3,73 \pm 23,3	4,29 \pm 22,3

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. E: pico de velocidade do fluxo de enchimento inicial; A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. ANOVA de duas vias complementada com teste de Student-Newman-Keuls; §: p<0,05 vs NAC.

Variáveis Anatômicas

A Tabela 11 mostra as variáveis corporais e cardíacas dos quatro grupos. O VE/PC foi maior no grupo EXENAC em relação ao grupo NAC. O peso do VD, VD/PC, átrios e átrios/PC foram maiores nos grupos EXE e NAC em comparação com o grupo CTL e não diferiram em relação ao grupo EXENAC. A razão peso

úmido/peso seco do VD foi maior no grupo EXE vs. CTL. Essa razão dos átrios foi maior nos grupos EXE e NAC em relação ao grupo CTL.

Tabela 11. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais

	CTL (n=12)	EXE (n=13)	NAC (n=13)	EXENAC (n=14)
PC (g)	369 ± 15	366 ± 24	370 ± 24	365 ± 26
VE (g)	1,06 ± 0,08	1,09 ± 0,06	1,01 ± 0,13	1,07 ± 0,08
VE/PC (g/kg)	2,87 ± 0,18	3,00 ± 0,13	2,72 ± 0,32	2,94 ± 0,33 §
VD (g)	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,02 *	0,24 ± 0,04 *	0,24 ± 0,03
VD/PC (g/kg)	0,57 ± 0,07	0,65 ± 0,05 *	0,65 ± 0,11 *	0,66 ± 0,11
Átrios (g)	0,07 (0,07-0,09)	0,11 (0,10-0,12) *	0,10 (0,08-0,12) *	0,10 (0,09-0,11)
Átrios/PC (g/kg)	0,20 (0,18-0,23)	0,31 (0,28-0,32) *	0,28 (0,21-0,31) *	0,27 (0,23-0,29)
VE úmido/seco	3,71 (2,82-3,81)	3,88 (3,54-4,09)	4,27 (3,49-4,69)	4,00 (3,68-4,21)
VD úmido/seco	3,99 (3,56-4,27)	4,42 (4,25-4,70) *	4,12 (3,89-4,25)	4,16 (4,11-4,32)
Átrios úmido/seco	3,73 ± 0,66	4,34 ± 0,43 *	4,32 ± 0,70 *	4,75 ± 0,58
Pulmão úmido/seco	4,40 (4,18-4,47)	4,49 (4,40-4,56)	4,45 (4,26-4,57)	4,54 (4,38-4,63)
Fígado úmido/seco	3,13 (3,07-3,22)	3,21 (3,14-3,43)	3,12 (3,02-3,17)	3,17 (3,12-3,23)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn; *: p<0,05 vs CTL; #: p<0,05 vs EXE; §: p<0,05 vs NAC.

Análise Histológica

Na Tabela 12 estão expressos os valores de diâmetro dos miócitos (Figura 2) e fração colágena intersticial (FCI) do miocárdio do VE. O diâmetro dos miócitos e a FCI não apresentaram diferenças entre os grupos.

Tabela 12. Diâmetro do miócito e fração colágena intersticial do miocárdio do ventrículo esquerdo

	CTL (n=10)	EXE (n=10)	NAC (n=10)	EXENAC (n=10)
Diâmetro (μm)	16,1 \pm 1,70	15,9 \pm 3,03	15,5 \pm 2,48	16,7 \pm 2,43
FCI (%)	6,01 \pm 0,87	5,85 \pm 0,62	5,96 \pm 0,66	5,88 \pm 0,87

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais; FCI: fração colágena intersticial. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni.

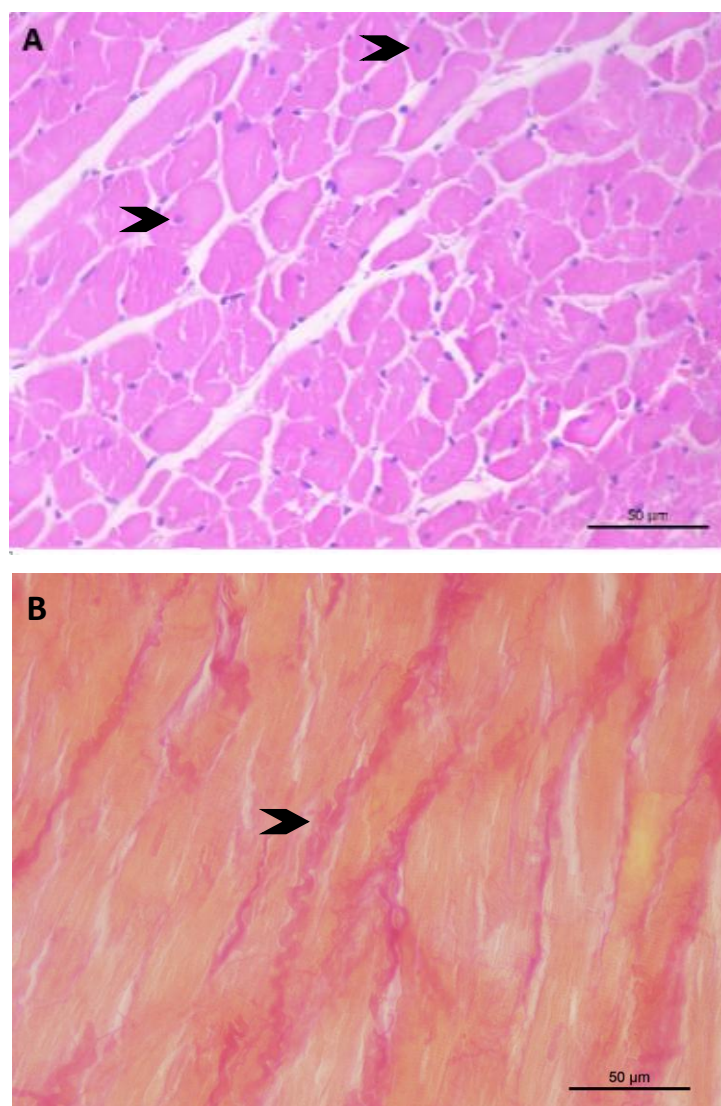


Figura 2 – Corte histológico do miocárdio do ventrículo esquerdo. A: diâmetro dos miócitos, coloração hematoxilina e eosina. B: tecido colágeno, coloração picrosirius red. Aumento 40X. Barra 50 μm .

Atividade das Enzimas Antioxidantes

A Figura 3 apresenta os dados da atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio. O grupo EXE apresentou maior atividade de catalase em comparação com os grupos CTL e EXENAC. As enzimas superóxido dismutase e a glutatona peroxidase não apresentaram diferenças entre os grupos.

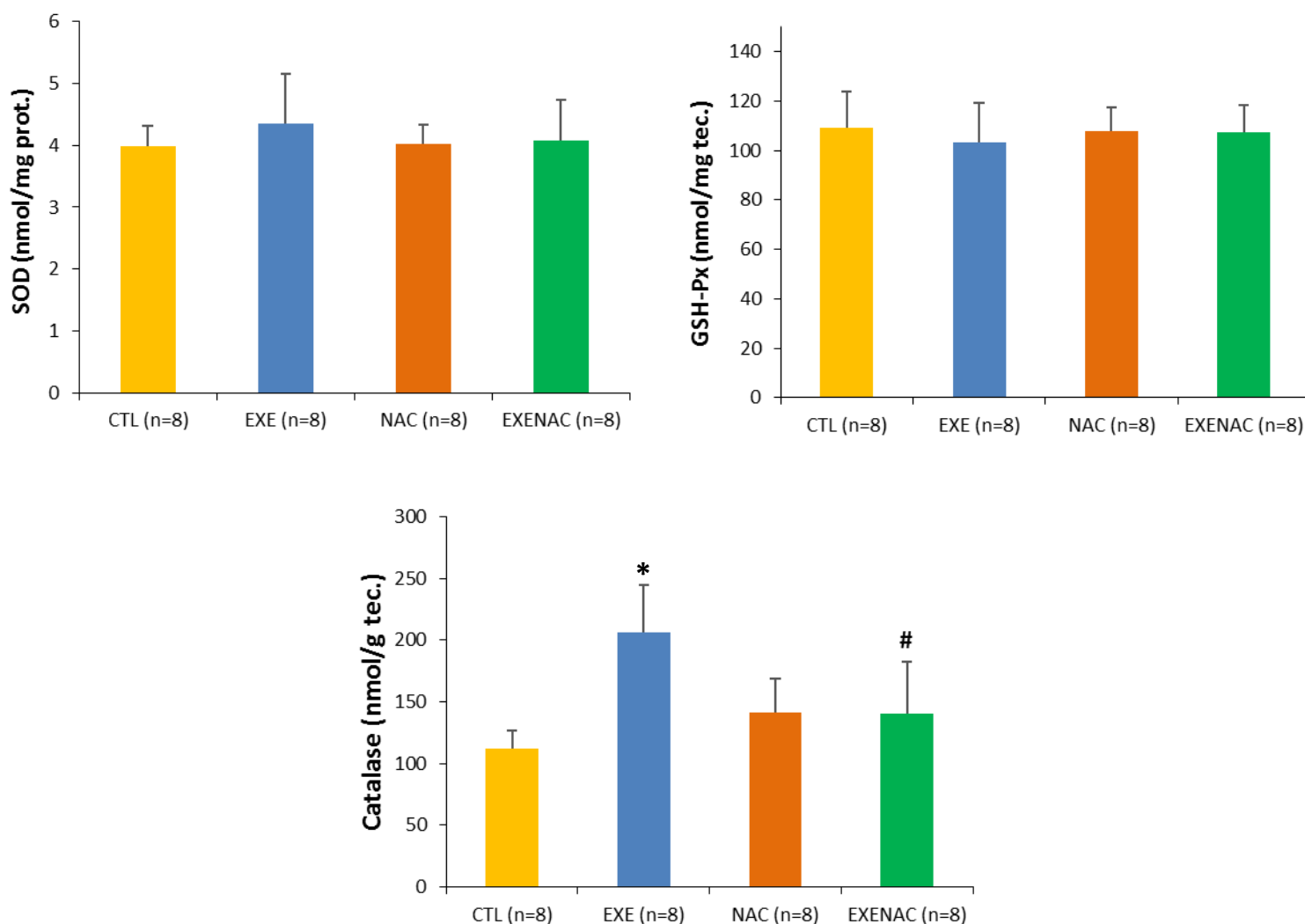


Figura 3 - Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; GSH-Px: glutatona peroxidase; SOD: superóxido dismutase. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni. *:p<0,05 vs.CTL; #:p<0,05 vs.EXE.

Marcador do Estresse Oxidativo

A concentração de hidroperóxido de lipídeo foi menor no grupo NAC quando comparado ao grupo CTL. No grupo EXE a concentração foi menor em relação ao CTL, mas não atingiu significância estatística. No entanto, o grupo EXENAC apresentou menor concentração em relação aos grupos EXE e NAC (CTL: 210±48; EXE: 182±43; NAC: 159±33; EXENAC: 110±23 nmol/g tecido) (Figura 4).

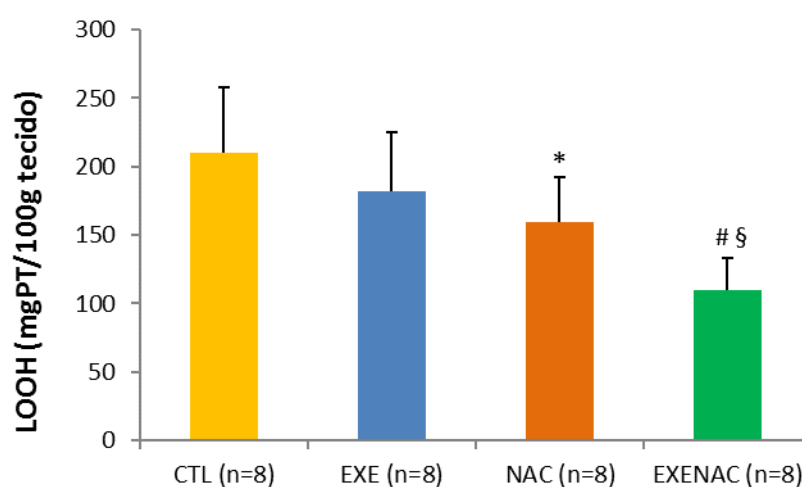


Figura 4. Concentração de hidroperóxido de lipídeo (LOOH) no miocárdio. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni. *: $p < 0,05$ vs CTL; #: $p < 0,05$ vs. EXE; §: $p < 0,05$ vs NAC.

Expressão Gênica do Complexo Enzimático NADPH Oxidase por RT-PCR em Tempo Real

As expressões da p22 phox (proteína transmembrana) e Nox2 (isoforma cardíaca) foram maiores no grupo EXE em relação ao grupo CTL. A p47 phox (subunidade reguladora citosólica da Nox2) apresentou-se menor no grupo EXE comparado ao CTL. A Nox4 (isoforma cardíaca) não diferiu entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação da expressão gênica de subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase por RT-PCR em tempo real

	CTL (n=10)	EXE (n=10)	NAC (n=10)	EXENAC (n=09)
p22 phox	0,93 ± 0,46	1,31 ± 0,52 *	1,17 ± 0,31	1,24 ± 0,22
p47 phox	1,37 (0,66-1,66)	0,78 (0,61-1,04) *	1,07 (1,01-1,38)	1,06 (1,01-1,15)
Nox2	0,81 (0,55-1,25)	2,00 (1,23-3,16) *	1,31 (0,65-1,75)	1,76 (1,29-2,00)
Nox4	0,74 (0,65-1,00)	0,51 (0,30-0,91)	0,75 (0,51-0,88)	0,68 (0,60-0,87)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. *: p<0,05 vs CTL.

Tabela 14. Expressão miocárdica de proteínas MAPK

	CTL (n=7)	EXE (n=7)	NAC (n=7)	EXENAC (n=7)
p-ERK/ERK	1,00 ± 0,21	0,89 ± 0,21	0,88 ± 0,26	0,95 ± 0,22
ERK p-ERK/GAPDH	1,00 ± 0,36	0,99 ± 0,27	0,91 ± 0,29	0,95 ± 0,20
ERK/GAPDH	1,00 ± 0,18	1,16 ± 0,23	1,06 ± 0,09	1,05 ± 0,21
p-JNK/JNK	1,00 ± 0,13	1,13 ± 0,17	1,07 ± 0,17	0,93 ± 0,23 #
JNK p-JNK/GAPDH	1,00 ± 0,16	1,26 ± 0,28 *	1,24 ± 0,28	1,01 ± 0,15 #
JNK/GAPDH	1,00 ± 0,15	1,11 ± 0,16	1,15 ± 0,15	1,11 ± 0,19
p-P38/ P38	1,00 ± 0,10	1,10 ± 0,14	1,02 ± 0,14	0,98 ± 0,13
P38 p-P38/GAPDH	0,97 (0,72-1,14)	1,10 (0,90-1,55)	0,99 (0,85-1,26)	0,93 (0,82-1,45)
P38/GAPDH	0,84 (0,76-1,34)	1,17 (1,11-1,89)	0,96 (0,85-1,31)	0,90 (0,81-1,31)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. EXE.

Avaliação da Expressão Proteica por Western Blot

A quantificação das MAPK e do NF- κ B por Western blot estão dispostas nas Tabelas 14 e 15. A expressão proteica p-JNK/JNK foi menor no grupo EXENAC quando comparado ao grupo EXE, e a p-JNK/GAPDH foi maior no grupo EXE quando comparados aos grupos CTL e EXENAC. As proteínas ERK e P38, nas formas fosforilada e total, assim como, a JNK/GAPDH não apresentaram diferenças entre os grupos. A proteína I κ B, na sua forma fosforilada (p-I κ B/GAPDH), apresentou maior expressão no grupo EXE quando comparados aos grupos CTL e EXENAC. As demais isoformas das NF- κ B não diferiram entre os grupos.

Tabela 15. Expressão miocárdica de proteínas NF- κ B e I κ B

		CTL (n=7)	EXE (n=7)	NAC (n=7)	EXENAC (n=7)
	p-NF-κB (p65)/NF-κB (p65)	1,00 \pm 0,12	0,93 \pm 0,12	1,02 \pm 0,13	0,99 \pm 0,13
NF-κB (p65)	p-NF-κB (p65)/GAPDH	1,00 \pm 0,18	1,07 \pm 0,21	1,15 \pm 0,13	1,07 \pm 0,20
	NF-κB (p65)/GAPDH	1,00 \pm 0,23	1,13 \pm 0,19	1,13 \pm 0,21	1,08 \pm 0,21
	p-IκB/IκB	1,00 \pm 0,17	0,95 \pm 0,30	0,92 \pm 0,18	0,84 \pm 0,16
IκB	p-IκB/GAPDH	1,00 \pm 0,36	1,26 \pm 0,42 *	1,19 \pm 0,19	0,90 \pm 0,18 #
	IκB/GAPDH	1,00 \pm 0,29	1,13 \pm 0,15	1,17 \pm 0,16	0,97 \pm 0,22

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: SHR controle; EXE: SHR submetido ao exercício combinado; NAC: SHR submetido à N-acetilcisteína; EXENAC: SHR submetido ao exercício combinado e à N-acetilcisteína; n: número de animais. ANOVA para esquema de dois fatores complementada com teste de Bonferroni. *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. EXE.

Discussão

Neste estudo, foram investigados os efeitos do exercício físico aeróbico combinado ao resistido associado à NAC nas estruturas e função cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos.

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos tem sido comumente utilizada em estudos experimentais, por ser um modelo experimental de HAS similar em muitos aspectos à hipertensão primária do homem. Estes ratos foram desenvolvidos através de reprodução genética em 1963 por Okamoto e Aoki⁶⁶, cujos resultados foram animais naturalmente hipertensos.⁶⁷⁻⁶⁸ Estes animais desenvolvem precocemente elevação da PA com hipertrofia do VE do tipo concêntrica, o que permite manutenção da função sistólica normal, apesar da hipertensão arterial.⁶⁸⁻⁶⁹

As adaptações neurais, hormonais, cardiovasculares e respiratórias promovidas mediante à prática de exercícios físicos são evidentes, tanto em ratos quanto em humanos.⁷⁰ O exercício físico tem demonstrado importante papel na promoção da saúde e no tratamento não farmacológico para o controle dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. A prática regular de exercício resulta na melhora da composição corporal, da função endotelial, na hipertensão arterial, na capacidade antioxidante e na capacidade física.^{28,71,72}

Neste estudo, o protocolo de exercício aeróbio utilizado é considerado de intensidade moderada e foi adaptado de Moreira et al.⁴⁸ A capacidade física foi avaliada através do teste de tolerância ao exercício físico, com aumento gradativo da velocidade da esteira para ratos até a exaustão dos animais. Os ratos dos grupos submetidos ao exercício físico aeróbio apresentaram maior capacidade física que os demais animais após o período de treinamento.

Em relação ao exercício resistido, foi utilizado o protocolo adaptado de Leite et al.^{44,47}, composto por quatro subidas na escada adaptada para ratos com cargas

correspondentes a 50%, 75%, 90% e 100% da CM atingida, inicialmente estabelecida para cada rato. Ao final das 8 semanas de exercício, os grupos treinados apresentaram maior capacidade de CM que os animais não treinados.

Evidências atuais afirmam que o exercício físico, nas suas diversas modalidades e intensidades, melhora a capacidade funcional, além de promover adaptações e benefícios na PA tanto em animais experimentais como em indivíduos hipertensos.²⁵ Neste estudo o exercício não influenciou a PA dos grupos. Resultados semelhantes foram observados por Pagan et al.⁷², em SHR com 16 meses de idade, após 16 semanas de treinamento.

A avaliação pelo ecocardiograma permitiu analisar, de maneira evolutiva, as estruturas e funções cardíacas para determinar o comprometimento dessas variáveis causadas pela hipertensão não controlada. Anteriormente aos protocolos de tratamento foi realizado ecocardiograma (dados não apresentados) para garantir a distribuição uniforme entre os grupos estudados. Ao final do período experimental, após dois meses de exercícios e suplementação com NAC, foi realizado um novo exame. O ecocardiograma mostrou algumas alterações entre os grupos, no entanto não foram alterações consistentes. Os protocolos de exercícios e suplementação com NAC isoladamente não foram capazes de promover alterações na geometria do ventrículo esquerdo.

No estudo da variação da cavidade ventricular esquerda (DDVE/PC), observamos que o exercício físico associado à NAC foi eficiente em reestabelecer as alterações promovidas pelos tratamentos de maneira isolada, sugerindo melhora do VE. A função sistólica do VE avaliada por VEPP mostrou que o grupo EXENAC foi melhor que o EXE. Observando as variáveis E' média, E/E' média e A' média,

ficou evidenciado que o exercício físico e a NAC, de maneira isolada, melhorou a função diastólica do VE.

Foi observado que animais dos grupos EXE e NAC apresentaram maiores valores de VD, VD/PC, átrios, átrios/PC, VD úmido/seco e átrios úmido/seco em relação ao grupo CTL. Os valores destas variáveis no grupo EXENAC não diferiram em relação aos grupos EXE e NAC. Portanto, o exercício e a NAC induziram aumento do peso do VD e átrios. Schultz et al.⁷³ demonstraram que o exercício excessivo, no estado hipertensivo não tratado, pode ter efeitos deletérios no remodelamento cardíaco e pode realmente acelerar a progressão para IC. Sendo assim, de acordo com estas evidências, ressalta-se a importância da realização de exercícios de forma gradativa, sistematizada, que respeite as limitações funcionais, reduzindo os possíveis efeitos deletérios que podem agravar ainda mais o processo de remodelamento cardíaco induzido pela hipertensão.

Na análise morfométrica foi avaliado o diâmetro dos miócitos e a fração de colágeno intersticial e os grupos não apresentaram diferenças entre eles. Podemos destacar então que em nosso trabalho o exercício e a NAC não influenciaram estas variáveis. Respostas adversas foram encontradas na literatura, no mesmo estudo supracitado, Schultz et al.⁷³ evidenciaram que o exercício excessivo, além de acelerar a progressão da IC, aumentou o conteúdo de colágeno, a área transversal e o volume dos miócitos. Por outro lado, Rossoni et al.⁷⁴ com protocolo de exercícios de baixa intensidade em SHR idosos, observaram diminuição da fração de colágeno intersticial, sem alteração da área dos miócitos, após 13 semanas de treinamento.

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e dos agentes antioxidantes. Neste estudo, nós avaliamos o marcador da peroxidação lipídica, hidroperóxido de lipídeo (LOOH), e a

concentração deste marcador foi menor nos grupos suplementados com NAC. Observou-se diminuição ainda mais intensa quando a NAC foi associada ao exercício. O grupo tratado apenas com exercício combinado apresentou redução na concentração de LOOH, mas não atingiu significância estatística em relação ao grupo CTL. Assim, a NAC teve ação importante na redução do marcador de peroxidação lipídica e, quando associada ao exercício combinado, seu efeito foi ainda mais evidente. No estudo anterior do nosso grupo, observamos também que a NAC reduziu a concentração de LOOH em ratos com estenose aórtica.⁶⁵

Os radicais livres produzidos nos processos metabólicos ativam os mecanismos de defesa antioxidante na tentativa de controlar o complexo sistema das EROs. No presente estudo foi avaliado a capacidade antioxidante das enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase, e os resultados demonstraram que, no grupo EXE o aumento da atividade da enzima catalase foi acompanhado de redução não significativa do LOOH. Os grupos NAC e EXENAC não apresentaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes e, no entanto, reduziram o LOOH. Isso demonstra que o exercício foi benéfico para a capacidade antioxidante do miocárdio, porém o aumento da catalase não foi efetivo em reduzir o LOOH no grupo EXE; resultados semelhantes foram vistos no estudo de Pagan et al.⁷⁵ No entanto, em ratas normotensas e hipertensas, ovariectomizadas com 10 semanas de idade, foram observadas redução do marcador de peroxidação lipídica e aumento da atividade da enzima catalase em ambos os grupos treinados, sem diferença entre os grupos normotenso e hipertenso.⁷⁶

A família de enzimas da NADPH oxidase com suas subunidades catalíticas (Nox), podem produzir espécies reativas de oxigênio que estão envolvidas na fisiopatologia da hipertensão e aterosclerose.^{10-14,77} Para avaliar o potencial papel da

NADPH oxidase no aumento do estresse oxidativo, foram analisadas a expressão gênica de Nox2 e Nox4, assim como as principais isoformas cardíacas, p22 phox (proteína transmembrana) e p47 phox (subunidade reguladora citosólica). Observou-se aumento na expressão da p22 phox e da Nox2 no grupo EXE em comparação ao grupo CTL. O estudo de Li et al., afirma que o aumento da atividade e expressão da NADPH oxidase está associado à hipertrofia ventricular esquerda em modelos experimentais de sobrecarga de pressão, ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo destas subunidades.⁷⁸ Em contrapartida, observou-se diminuição na expressão da subunidade citosólica p47 phox no grupo EXE em comparação ao grupo CTL. A fosforilação deste sítio citosólico é uma etapa fundamental na ativação da NADPH oxidase, e a redução na sua expressão pode ser explicada pela existência de outros componentes com sítios de fosforilação, tais como, p67 phox e p40 phox, embora a fosforilação do componente p47 phox tenha sido alvo do nosso estudo por ser o sítio de fosforilação mais estudado na literatura.⁷⁹

Muitas vezes o aumento do estresse oxidativo favorece a ativação das vias de sinalização intracelular do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que estão envolvidas em várias atividades celulares presentes no processo de remodelamento cardíaco, tais como expressão gênica, mitose, apoptose e diferenciação celular. No nosso estudo foram avaliados os principais membros da via MAPK, a ERK, a JNK e a p38.⁸⁰ De acordo com Zhang et al.,⁸¹ a ERK catalisa a fosforilação de fatores de transcrição que estimula a síntese de proteína e o crescimento celular. A JNK e a p38 estão envolvidas no processo apoptótico, na síntese de citocinas inflamatórias e fibrose.

Nossos dados mostram aumento da fosforilação da JNK no grupo EXE e restauração destes valores no grupo EXENAC. O estudo de Zhang et al.⁸¹ relata que

a JNK pode mediar a resposta hipertrófica, assim como a ERK e a p38 devido a ação na via de proliferação celular e apoptose. Em nosso estudo, o aumento do estresse oxidativo pode ter ativado a sinalização da p-JNK no grupo EXE que provavelmente foi atenuado pelo tratamento com NAC reduzindo o estresse oxidativo no grupo EXENAC. Pagan et al.⁷⁵ sugerem descobertas importantes sobre o efeito cardioprotetor ligado ao exercício físico, correlacionando as MAPKs com os mecanismos responsáveis pelas alterações que ocorrem no músculo cardíaco durante processos inflamatórios e/ou estímulos como o exercício físico.

A via do NF- κ B é importante na transdução de sinais e é sensível ao estresse oxidativo. Em nosso estudo, foi avaliado também a subunidade p65 da via NF- κ B e seu inibidor I κ B. Nossos dados mostram aumento da fosforilação da I κ B no grupo EXE e restauração destes valores no grupo EXENAC. A fosforilação do I κ B estimula a liberação do NF- κ B proporcionando a ativação e translocação dos heterodímeros do NF- κ B para o núcleo celular enquanto o I κ B é degradado⁸². Os nossos dados mostram que a subunidade p65 não foi diferente entre os grupos, e que o I κ B fosforilado está aumentado por influência do exercício no grupo EXE, porém quando houve associação do exercício com o antioxidante (NAC) observamos a normalização desses valores. Portanto, o aumento da p-I κ B no grupo exercitado pode sinalizar a ativação de genes envolvidos nos processos inflamatórios e hipertróficos e, quando associado à NAC, foi capaz de inibir a ativação destes genes.

São claros os prejuízos funcionais induzidos pela sobrecarga crônica de pressão imposta pela HAS, e o evidente processo de remodelamento cardíaco ocasionado por isso. No entanto, foi observado que o exercício físico é capaz de modular as complexas vias de sinalização atenuando o remodelamento cardíaco

com melhora da função contrátil e redução dos níveis pressóricos em ratos hipertensos após seis semanas de exercícios de baixa intensidade.⁸³

Resumidamente, a melhora de alguns parâmetros estruturais e da função cardíaca observada no grupo EXENAC, pode estar associada à redução da expressão da p-JNK e da p-IkB e da atenuação do marcador da peroxidação lipídica. Os nossos achados demonstram resposta adaptativa positiva ao treinamento físico associado à NAC no remodelamento cardíaco dos animais hipertensos.

Conclusão

O exercício físico aeróbico combinado ao resistido associado à N-acetilcisteína em ratos espontaneamente hipertensos atenua o remodelamento cardíaco, que está associado ao aumento da tolerância ao esforço físico aeróbico e resistido. Além disso, proporciona efeito cardioprotetor caracterizado pela diminuição do marcador de estresse oxidativo e diminuição da expressão proteica da p-JNK e p-IkB.

Referências

1. Malachias MVB, Souza WKSB, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7th Brazilian guideline of arterial hypertension: presentation. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107:1-83.
2. Withworth JA. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. World Health Organization (WHO)/International Society Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens.* 2003;21:1983-92.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, Vigitel 2014. Brasília: Ministério da Saúde; 2015:154.
4. Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;55:66–73.
5. Villari B, Campbell SE, Hess OM, Mall G, Vassalli G, Weber KT, et al. Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22:1477-84.
6. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:569-82.
7. Junqueira LCU & Carneiro J. *Histologia Básica*, 11^a edição - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.
8. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34:5-14.
9. Paletta-Silva R, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2013;14:3683-704.
10. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:2164-71.

11. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71:208-15.
12. Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:401-28.
13. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal.* 2015;10;23:406-27.
14. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart – roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J.* 2014;78:300-6.
15. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:15-22.
16. Kuroda J, Sadoshima J. NADPH oxidase and cardiac failure. *J CardiovascTransl Res.* 2010;3:314-20.
17. Dias IH, Griffiths HR. Oxidative stress in diabetes - circulating advanced glycation end products, lipid oxidation and vascular. *Ann Clin Biochem.* 2014;51:125-7.
18. Byun M-S, Jeon K-I, Choi J-W, Shim J-Y, Jue D-M, Lee S-S, et al. Dual effect of oxidative stress on NF-kappaB activation in HeLa cells. *Exp Mol Med.* 2002;34:332–9.
19. Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell T, et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail.* 2004;10:511-8.
20. Haddad JJ, Land SC. Regulação redox / ROS da ativação da proteína-cinase ativada por mitogênio (MAPK) induzida por lipopolissacarídeo e biossíntese de TNF-alfa mediada por MAPK. *Br J Pharmacol.* 2002;135:520–36.

21. Zheng W, Zheng X, Liu S, Ouyang H, Levitt RC, Candiotti KA, et al. TNF α e IL-1 β são mediados por ambas as vias TLR4 e Nod1 nas células HAPI cultivadas estimuladas por LPS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;420:762-7.
22. Matsushima S, Kuroda J, Zhai P, Liu T, Ikeda S, Nagarajan N, et al. Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. *J Clin Invest*. 2016;126:3403–16.
23. MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy. Role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation*. 2001;104:2967–74.
24. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Prospective Studies Collaboration. Lancet*. 2002;360:1903–13.
25. Boutcher YN, Boutcher SH. Exercise intensity and hypertension: what's new? *J Hum Hypertens*. 2017;31:157-64.
26. Pinho RA, Araujo MC, Ghisi GL, Benetti M. Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94:549-55.
27. Koike A, Hiroe M, Adachi H, Yajima T, Nogami A, Ito H, et al. Anaerobic metabolism as an indicator of aerobic function during exercise in cardiac patients. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:120-6.
28. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget* 2017;8:20428–40.
29. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 2015;36:377–93.

30. Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M, Colombo PC, Cohen-Solal A, Evans T, et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:194-8.
31. Whelton SP, Chin A, Xin X, et al. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Intern Med*. 2002;136:493-503.
32. Peters PG, Alessio HM, Hagerman AE, Ashton T, Nagy S, Wiley RL. Short-term isometric exercises reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: possible role of reactive oxygen species. *Int J Cardiol*. 2006;110:199-205.
33. Taylor AC, McCartney N, Kamath MV, Wiley RL. Isometric training lowers resting blood pressure and modulates autonomic control. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:251-6.
34. Balducci S, Leonetti F, Di Mario U, Fallucca F. Is a long term aerobic plus resistance training program feasible for and effective on metabolic profile in type 2 diabetes? *Diabetes Care*. 2004;27:841-2.
35. Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, Ludvik B, Metz-Schimmerl S, Pacini G, et al. The relative benefits of endurance and strength training on metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes. *Arch Phys Med Rehab*. 2005;86:1527-33.
36. Fagard RH. Physical activity, physical fitness and the incidence of hypertension. *J Hypertens*. 2005;2:265-7.
37. Medina FL, Lobo FS, Souza DR, Kanegusuku H, Forjaz CLM. Atividade física: impacto sobre a pressão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2010;17:103-6.
38. Xing W, Li Y, Zhang H, Mi C, Hou Z, Quon MJ, et al. Improvement of vascular insulin sensitivity by downregulation of GRK2 mediates exercise-induced alleviation of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;8:H1111-9.

39. Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M, et al. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:13998-4003.
40. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*. 2014;141:150–9.
41. Adamy C, Mulder P, Khouzami L, Andrieu-abadie N, Defer N, Candiani G, et al. Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:344–53.
42. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Junior SA, Damatto RL, Cezar MD, et al. Modulation of MAPK and NF-954;B signaling pathways by antioxidant therapy in skeletal muscle of heart failure rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39:371-84.
43. Cassilhas RC, Lee KS, Venancio DP, Oliveira MG, Tufik S, de Mello MT. Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1215-20.
44. Leite RD, Durigan RDCM, de Souza Lino AD, de Souza Campos MV, das Graças Souza M, Selistre-de-Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism*. 2013;62:1477-84.
45. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:760-5.
46. Neves RVP, Souza MK, Passos CS, Bacurau RFP, Simoes HG, Prestes J, et al. Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106:201-9.
47. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal

- muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009;34:1079-86.
48. Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol (Bethesda, Md. : 1985).* 2013;114:1029-41.
49. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 1971;78:957-62.
50. de Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas AS, et al. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens.* 1992;10:725–32.
51. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation.* 1995;91:2642-54.
52. Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, et al. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:607-13.
53. de Paiva SA, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H2242-6.
54. Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr.* 1997;10:169-78.

55. Gomes RJ, de Oliveira CAM, Ribeiro C, Mota CSDA, Moura LP, Tognoli LMMC. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. *Hippocampus*. 2009;19:981-7.
56. Oliveira Junior SA, Pai-Silva MD, Martinez PF, Lima-Leopoldo AP, Campos DH, Leopoldo AS, et al. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit*. 2010;16:BR367-73.
57. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Camapanha AO, et al. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:276-82.
58. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
59. Rosa CM, Xavier NP, Campos DH, Fernandes AA, Cezar MD, Martinez PF, et al. Diabetes mellitus activated fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:152.
60. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, et al. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path*. 2010;91:54-62.
61. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima ARR, et al. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit*, 2010;16:BR374-83.
62. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98:2709-15.
63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddct method. *Methods*. 2001;25:402-8.

64. Oliveira-Junior SA, Dal Pai M, Guizoni DM, Torres BP, Martinez PF, Campos DHS, et al. Effects of AT1 receptor antagonism on interstitial and ultrastructural remodeling of heart in response to a hypercaloric diet. *Physiol Rep*. 2019;7:e13964.
65. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Damatto FC, Damatto RL, et al. N-acetylcysteine influence on oxidative stress and cardiac remodeling in rats during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44:2310-2321.
66. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-93.
67. Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1966;30:703-16.
68. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981;48:309-19.
69. Anversa P, Beghi C, McDonald SL, Levicky V, Kikkawa Y, Olivetti G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol*. 1984;116:504-13.
70. Rondon MUPB, Alonso DO, Santos AC, Rondon E. Noções sobre fisiologia integrativa no exercício. In: Carlos Eduardo Negrão; Antônio Carlos Pereira Barretto. (Org.). *Cardiologia do Exercício: Do Atleta ao Cardiopata*. 2ed. Barueri - SP: Editora Manole Ltda. 2006;1:25-46.
71. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima AR, et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;8695716.

72. Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, Lima AR, Bonomo C, Campos DH, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:61-74.
73. Schultz RL, Swallow JG, Waters RP, Kuzman JA, Redetzke RA, Said S, et al. Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. *Hypertension*. 2007;50:410-6.
74. Rossoni LV, Oliveira RA, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 2011;29:2349-58.
75. Pagan LU, Damatto RL, Gomes MJ, Lima AR, Cezar MD, Damatto FC, et al. Low-intensity aerobic exercise improves cardiac remodeling of adult spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019;23:6504-7.
76. Brito-Monzani JO, Sanches IC, Bernardes N, Ponciano K, Moraes-Silva IC, Irigoyen MC, et al. Hypertension induces additional cardiometabolic impairments and attenuates aerobic exercise training adaptations in fructose-fed ovariectomized rats. *Hypertens Res*. 2018;41:88-95.
77. Cao TT, Chen HH, Dong Z, Xu YW, Zhao P, Guo W, et al. Stachydrine protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42:103-14.
78. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002;40:477-484.
79. Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T, Vignais PV. The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem*. 1997;249:531-9.
80. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*. 2007;116:1413-23.

81. Zhang W, Elimban V, Nijjar MS, Gupta SK, Dhalla NS. Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Exp Clin Cardiol.* 2003;8:173-83.
82. Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 2010;95:1-9
83. Locatelli J, Paiva NCN, Carvalho SHR, Lavorato VN, Gomes LHLS, Castro QJT, et al. Swim training attenuates the adverse remodeling of LV structural and mechanical properties in the early compensated phase of hypertension. *Life Sci.* 2017;187:42–9.