



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade De Medicina**

Luana Urbano Pagan

**Influência do Exercício Físico no Remodelamento
Cardíaco, Estresse Oxidativo e Vias de
Sinalização das MAPK e do NF- κ B de Ratos
Espontaneamente Hipertensos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Fisiopatologia em Clínica
Médica

Orientador: Prof. Dr. Katashi

**Botucatu
2018**

Luana Urbano Pagan

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NO
REMODELAMENTO CARDÍACO, ESTRESSE OXIDATIVO E
VIAS DE SINALIZAÇÃO DAS MAPK E DO NF- κ B 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 Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. *Katashi Okoshi*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pagan, Luana Urbano.

Influência do exercício físico no remodelamento cardíaco, estresse oxidativo e vias de sinalização das MAPK e do NF- κ B de ratos espontaneamente hipertensos / Luana Urbano Pagan. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Capes: 40101100

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

Palavras-chave: Exercício físico; estresse oxidativo; hipertensão arterial; ratos espontaneamente hipertensos; remodelamento cardíaco.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcuta

DEDICATÓRIA

À minha FAMÍLIA e aos meus AMIGOS que formam
o alicerce da minha vida. Sem vocês, seria impossível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela competência na orientação, pela dedicação, pelo respeito, pela confiança em meu trabalho e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

À Prof. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, por todo apoio, preocupação, respeito e ensinamentos durante toda a pós-graduação.

À Prof. Dra. ANA ANGÉLICA FERNANDES, pelas análises realizadas no Laboratório de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp.

Ao Prof. Adj. Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aos pesquisadores DENISE e JOÃO, e à técnica do laboratório MARIA BERTOLINA pela ajuda com as análises de espécies reativas de oxigênio e NADPH oxidase.

Ao Prof. Dr. JOSÉ VIÑA e à Prof. Dra. ANA LLORETE, pela oportunidade de realizar estágio no grupo de pesquisa “Freshage - Age and Exercise Research Group” da Universidade de Valência, pelo respeito e atenção durante todo o período de estágio.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, pelos constantes estímulos ao estudo e à pesquisa.

À Prof. Dra. BERTHA POLEGATO e ao Prof. Dr. MARCOS MINICUCCI, pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, pela disponibilidade e por toda ajuda durante o curso de pós-graduação.

Aos FUNCIONÁRIOS DA UNIPEX, pela cooperação, respeito e ajuda durante todos esses anos.

Aos queridos amigos, ALINE, ANDRÉA, BERTHA, CAMILA BONOMO, DANIELE, DAVID, DIJON, FELIPE, MARCELO, MARIANA, PAULA, PAULA GRIPPA, RICARDO e SÍLVIO, por toda a ajuda e parceria: vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Aprendi muito com vocês! Obrigada por me fazerem rir, mesmo quando a vontade era de chorar.

Aos amigos da UNIPEX, BRUNA RAFACHO, BRUNA LETÍCIA, CAMILA, DANIELE TOMAZ, DANIELE VILEIGAS, EDER, FABIANE, FERNADA, GUSTAVO, JÉSSICA, LORETA, MARIA TERESA, PATRICIA, REGIANE, RENATA, SÉRGIO, SANDRO, THIERRES e VITOR, pelo respeito, pela troca e pela boa convivência.

Às companheiras de casa e grandes amigas, LETÍCIA e JÉSSICA, por todo companheirismo, por estarem sempre dispostas a ajudar, por toda a paciência no convívio e pelos ótimos momentos.

Às amigas ANNA, CAMÉLIA, ELISANGELA, LETÍCIA e MARIANA, por tornarem meus dias longe da família muito mais fáceis, por estarem sempre acessíveis e presentes nas dificuldades, e por poder compartilhar de momentos alegres e inesquecíveis.

Aos amigos AMANDA, ELIZA, FABIANA, FRANCIELE, NAIARA, NATÁLIA ELISA, NATÁLIA SIQUEIRA, NATÁLIA VIEIRA, RICARDO, ROSE e TALITA, pelo apoio, torcida e pelos bons momentos compartilhados. Muitas vezes, fui ausente, mas sempre com vocês no coração.

Aos amigos JORGE, VIRGINIA, CARLA, ANDRÉ, HELEN, ADRIÁN, CORALIE e RAQUEL, pelos ensinamentos, parcerias, apoio e por fazerem meus dias mais fáceis e felizes em Valência.

À minha família, LEANDRO, LEONARDO, ROBERTA, JULIANA, PYETRA, DAVI, LUCIA, GRABRIELA e FABIANA, por sempre estarem ao meu lado, apoiando e torcendo pela minha felicidade. “Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si. É saber que em algum lugar alguém zela por ti” (Ana Vilela).

Aos meus queridos pais, CECÍLIA e FAUSTO, que me ensinaram os verdadeiros valores do ser humano e pelo apoio incondicional em todos os momentos. “Dê a quem você ama asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar” (Dalai Lama).

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP processo 2014/00747-1) e COORDENAÇÃO APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES processo n 88881.131998/2016-01), pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	1
Absctract	4
Introdução	7
Objetivos	14
Material e Métodos	16
Resultados	29
Discussão	46
Conclusão	57
Referências Bibliográficas.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Pressão arterial sistólica (PAS) no início e final do experimento.....	32
Tabela 2.	Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração.....	33
Tabela 3.	Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma.....	34
Tabela 4.	Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma	34
Tabela 5.	Parâmetros corporais e cardíacos dos animais.....	35
Tabela 6.	Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas na condição basal.....	37
Tabela 7.	Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após pausas de 10, 30 e 60 segundos.....	37
Tabela 8.	Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após elevação da concentração de cálcio.....	38
Tabela 9.	Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após adição de isoproterenol (ISO).....	39
Tabela 10.	Produção de malondialdeído (MDA), hidroperóxido de lipídeo (Hidrop. lip.) e atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase.....	41
Tabela 11.	Diâmetro do miócito, fração colágena intersticial (FCI) e concentração de hidroxiprolina (HOP) do miocárdio do ventrículo esquerdo.....	41
Tabela 12.	Expressão proteica do colágeno I e III e da lisil oxidase no miocárdio.....	42
Tabela 13.	Expressão proteica do inibidor tecidual da metaloproteinases (TIMP) 1 e 2 e zimografia da metaloproteinase (MMP).....	43
Tabela 14.	Expressão proteica da via das MAPK no miocárdio.....	43
Tabela 15.	Expressão proteica da via do NF-kB no miocárdio.....	45

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1.	Protocolo de exercício físico.....	18
Figura 1.	A geração de ERO influencia as moléculas de sinalização envolvidas no crescimento dos miócitos, fibrose, disfunção contrátil e inflamação.....	12
Figura 2.	Frequência de sinais de insuficiência cardíaca.....	30
Figura 3.	Distância e tempo no teste de esforço.....	31
Figura 4.	Atividade das enzimas antioxidantes 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

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral

EDPP: espessura diastólica da parede posterior

EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular

ERO: espécies reativas de oxigênio

Esp. Rel. VE: espessura relativa do ventrículo esquerdo

ESPP: espessura sistólica da parede posterior

ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular

FC: frequência cardíaca

FCI: fração colágena intersticial

GSH-Px: glutathione peroxidase

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HCl: ácido clorídrico

HOP: hidroxiprolina

IC: insuficiência cardíaca

IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo

ISO: isoproterenol

Lmax: comprimento do músculo

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MDA: malondialdeído

MMP: metaloproteinase

MVE: massa do ventrículo esquerdo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF- κ B: factor nuclear κ B

NO: óxido nítrico

PA: pressão arterial

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

PC: peso corporal

RNA: ácido ribonucleico

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

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SHR-SED: SHR sedentário

SHR-EX: SHR exercitado

SOD: superóxido dismutase

TD: tensão desenvolvida

TDE: tempo de desaceleração da onda E

Tei: índice de Tei

TIMP: inibidor tecidual das metaloproteinases

TR: tensão de repouso

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico

VD: ventrículo direito

VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior

VE: ventrículo esquerdo

W: Wistar

W-SED: Wistar sedentário

W-EX: Wistar exercitado

%Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico

%Δ meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico

+dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida

-dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida

RESUMO

Introdução: A sobrecarga de pressão causada pela hipertensão arterial sistêmica (HAS) pode gerar mudança na arquitetura do colágeno, favorecer a fibrose, bem como o desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante. Aumento das ERO pode gerar ativação de vias sinalizadoras como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Alterações dessas vias contribuem para o processo de remodelamento cardíaco causado pela HAS. O exercício físico desempenha importante papel na atenuação dos fatores de risco cardiovascular como a HAS. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do treinamento físico sobre o remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) na fase que antecede o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. **Métodos:** Foram constituídos quatro grupos experimentais de ratos: normotensos Wistar (W) sedentários (W-SED, n=27); W exercitados (W-EX, n=31); SHR sedentários (SHR-SED, n=27); e SHR exercitados (SHR-EX, n=32). A partir de 13 meses de idade, os animais dos grupos exercitados foram submetidos a protocolo de exercício em esteira, cinco dias por semana, durante quatro meses. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do coração foi realizada por ecocardiograma. A função miocárdica *in vitro* foi avaliada em preparações de músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE). Amostras de tecido do VE foram obtidas para análises bioquímicas, histológicas e moleculares. A avaliação do colágeno miocárdico total foi realizada pela histologia e por quantificação de hidroxiprolina. O tamanho dos miócitos foi medido em cortes histológicos do VE. A atividade das enzimas antioxidantes foi quantificada por espectrofotometria. A atividade da NADPH oxidase foi avaliada pela redução da lucigenina. A quantificação proteica dos colágenos I e III, lisil oxidase, vias MAPK e NF- κ B, e inibidores teciduais 1 e 2 das metaloproteinases foi realizada por Western blot. A atividade das metaloproteinases foi realizada por zimografia. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni (distribuição normal), ou o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn (distribuição não normal). **Resultados:** A pressão arterial sistólica foi maior nos grupos SHR. Os grupos exercitados apresentaram maior capacidade física. Os sinais de insuficiência cardíaca foram maiores nos grupos hipertensos em relação aos controles, e o grupo

SHR-EX apresentou menor prevalência de derrame pleural e taquipneia em comparação ao SHR-SED. O ecocardiograma mostrou reduções da espessura da parede do VE, espessura relativa do VE, diâmetro do átrio esquerdo e melhora do relaxamento no grupo SHR-EX vs. SHR-SED. O estudo da função miocárdica *in vitro* mostrou melhor performance no grupo SHR-EX (derivada positiva da tensão desenvolvida) vs. SHR-SED. O grupo SHR-EX mostrou maior atividade das enzimas antioxidantes em comparação SHR-SED. A produção de hidroperóxido de lipídeo, diâmetros dos miócitos, expressões proteicas da JNK fosforilada e da IκB total foram maiores nos grupos hipertensos. A quantificação de hidroxiprolina, malondialdeído, atividade da NADPH oxidase, expressões proteicas do colágeno III, lisil oxidase, TIMP-1, JNK total, p38 fosforilada, p65 fosforilada e total e IκB fosforilada não apresentaram diferença entre os grupos. A fração colágena intersticial, a atividade da MMP-2 e a expressão proteica da p38 total, ERK total e fosforilada foram maiores no SHR-SED em comparação com controle. O exercício causou redução da atividade da MMP-2 e da expressão da ERK fosforilada nos ratos hipertensos. **Conclusão:** O exercício físico em ratos espontaneamente hipertensos atenua o remodelamento cardíaco que está associado à melhora da tolerância ao esforço físico e redução da frequência de sinais de insuficiência cardíaca. Além disso, associa-se ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes, diminuição da fosforilação da ERK e da atividade da MMP-2, e atenuação da expressão proteica da ERK total.

Palavras-chave: Exercício físico, hipertensão arterial, remodelamento cardíaco, ratos espontaneamente hipertensos, estresse oxidativo, matriz extracelular, MAPK, NF-κB.

ABSTRACT

Introduction: The pressure overload caused by systemic arterial hypertension (SAH) may change the collagen architecture, induce fibrosis, as well as imbalance between the reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant capacity. Increased ROS leads to activation of signaling pathways such as nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPK). Alterations in these pathways contribute to cardiac remodeling process induced by SAH. Physical exercise plays an important role in mitigating cardiovascular risk factors such as hypertension. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of physical training, started before clinical evidence of heart failure, on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** Four experimental groups were used: sedentary (W-SED n=27) and trained (W-EX, n=31) normotensive Wistar rats, and sedentary (SHR-SED, n=27) and exercised (SHR-EX, n=32) hypertensive rats. Rats of the exercise groups underwent a protocol of treadmill exercise five days a week, for four months; exercise started at 13 months of age. Echocardiogram was performed to evaluate *in vivo* cardiac structures and function. *In vitro* myocardial function was analyzed in left ventricular (LV) papillary muscle preparations. LV tissue samples were obtained for biochemical, histological, and molecular analysis. Total myocardial collagen was assessed by histology and hydroxyproline quantification. Cardiomyocyte size was measured in LV histological sections. Antioxidant enzymes activity was quantified by spectrophotometry. NADPH oxidase activity was analyzed by reduction of lucigenin. Protein expression of collagen I and III, lysyl oxidase, MAPK and NF- κ B, and metalloproteinases tissue inhibitors 1 and 2 was quantified by Western blot. The activity of metalloproteinases was evaluated by zymography. Comparisons between groups were performed by two factors analysis of variance (ANOVA), complemented with the Bonferroni test (normal distribution), or Kruskal-Wallis complemented with Dunn test (non-normal distribution). **Results:** Systolic blood pressure was higher in the SHR groups. The exercised groups showed greater physical capacity. Prevalence of heart failure signs was higher in the hypertensive groups compared to controls, and the SHR-EX group showed lower prevalence of pleural effusion and tachypnea compared to SHR-SED. Echocardiogram showed lower LV wall thickness, LV relative wall thickness, left atrium diameter, and relaxation time in the SHR-EX group vs. SHR-SED. Myocardial

functional study showed better performance in the SHR-EX group (positive derivative of the developed tension) vs. SHR-SED. The SHR-EX group showed higher antioxidant enzymes activity compared to SHR-SED. Lipid hydroperoxide production, myocyte diameters, and phosphorylated JNK and total I κ B protein expression were higher in the hypertensive groups. Quantification of hydroxyproline, malondialdehyde, NADPH oxidase activity, and protein expression of collagen III, lysyl oxidase, TIMP-1, total JNK, phosphorylated p38, phosphorylated and total p65, and phosphorylated I κ B did not differ between groups. The interstitial collagen fraction, MMP-2 activity, protein expression of total p38, and total and phosphorylated ERK were higher in the SHR-SED group compared to normotensive control. Physical exercise reduced the MMP-2 activity and the phosphorylated ERK expression in hypertensive rats. **Conclusion:** Physical exercise in spontaneously hypertensive rats attenuates cardiac remodeling associated with improved physical capacity and reduced prevalence of heart failure signs. In addition, it is associated with increased antioxidant enzymes activity, decreased ERK phosphorylation and MMP-2 activity, and attenuation of total ERK protein expression.

Keywords: Physical exercise, arterial hypertension, cardiac remodeling, spontaneously hypertensive rats, oxidative stress, extracellular matrix, MAPK, NF- κ B.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma condição clínica que se associa com piora da qualidade de vida e da capacidade funcional e com elevada morbidade e mortalidade.

Dados da *American Heart Association* estimaram a prevalência de 5,1 milhões de indivíduos com IC nos Estados Unidos no período de 2007-2012 (Go *et al.*, 2014). No Brasil, a IC encontra-se entre as principais causas de internação hospitalar, considerando-se todas as internações do Sistema Único de Saúde (Albuquerque *et al.*, 2014).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais causas de IC. No Brasil, afeta 32,5% dos adultos e 60% dos idosos (Sociedades Brasileiras de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2017). A HAS é altamente prevalente, com baixa taxa de controle sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública (Sociedades Brasileiras de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2017).

Pode se dizer que a HAS é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, e que envolve interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. Associa-se frequentemente as alterações funcionais e estruturais dos órgãos-alvo, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos e as alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares (Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2017).

A HAS não controlada pode induzir alterações cardíacas como hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), disfunção ventricular diastólica e/ou sistólica e manifestações clínicas como arritmia e IC. Níveis elevados de pressão arterial induzem hipertrofia miocárdica, que é um mecanismo compensatório do coração com a finalidade de manter o débito cardíaco em valores normais. A progressão da hipertrofia cardíaca leva à IC, inicialmente decorrente de disfunção diastólica isolada do VE. Com a persistência da pressão arterial elevada e a incapacidade do miocárdio de continuar se hipertrofiando, estabelece-se o comprometimento adicional e predominante da função sistólica, com piora acentuada do quadro clínico da IC e do prognóstico do paciente (Cicogna *et al.*,

2000). A hipertrofia ventricular esquerda é fator de risco independente para o desenvolvimento de IC e morte (Dunn, 1999).

Sobrecargas hemodinâmicas crônicas, como a HAS, induzem alterações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente como modificações no tamanho, forma e função do coração, cujo processo é denominado remodelamento cardíaco (Cohn *et al.*, 2000).

As características da hipertrofia do VE dependem do tipo de sobrecarga, se pressórica, como na HAS e estenose aórtica, ou volumétrica como no infarto do miocárdio. Essas sobrecargas apresentam características fenotípicas e funcionais distintas, mas têm em comum o fator patogênético que é o aumento da carga hemodinâmica imposta ao coração (Franchini, 2001). Na sobrecarga de pressão, há aumento do estresse sistólico no VE que estimula vias sinalizadoras intra e extracelulares, resultando na replicação dos sarcômeros em paralelo, denominada hipertrofia concêntrica. Por outro lado, se a sobrecarga for volumétrica, ocorre aumento do estresse diastólico do VE com replicação dos sarcômeros em série, resultando na hipertrofia do tipo excêntrica (Mann, 2012). Há relatos de que a hipertrofia da HAS pode ser mais complexa, podendo inclusive ser do tipo excêntrica dependendo de fatores genéticos, neuro-hormonais e doenças associadas como diabetes e obesidade (Drazner, 2011; Garg & Drazner, 2016).

Além da hipertrofia dos miócitos, outro elemento envolvido no processo de remodelamento cardíaco é o aumento do tecido conjuntivo intersticial (Cohn *et al.*, 2000; Spinale, 2002). No interstício do coração são encontrados, predominantemente, fibras de colágeno tipo I e III, as quais correspondem a aproximadamente 92% de todo o colágeno cardíaco (Mill & Vassalo, 2001). As fibras desses colágenos são justapostas e formam uma complexa rede circundando e interligando os miócitos, vasos, fibroblastos e células endoteliais. A função dessa rede é regular a apoptose, resistir às deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a transmissão de força durante o encurtamento da fibra cardíaca (Zannad *et al.*, 2010). Dessa forma, o colágeno desempenha importante função na manutenção da arquitetura e no desempenho cardíaco. A sobrecarga de pressão causada pela HAS pode gerar mudança na arquitetura do colágeno e favorecer o aumento de fibrose (Villari *et al.*, 1993).

Portanto, o aumento na deposição de colágeno pode trazer diversas consequências para o funcionamento do miocárdio, entre elas o aumento da rigidez da câmara ventricular, o que dificulta o enchimento e pode resultar em disfunção ventricular diastólica e insuficiência cardíaca (Mill & Vassalo 2001).

O aumento do estresse oxidativo tem sido considerado importante fator no desenvolvimento de alterações que interferem no processo de remodelamento cardíaco. O estresse oxidativo ocorre quando há desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante. Esse desequilíbrio pode causar hipertrofia e morte de cardiomiócitos e fibrose miocárdica (Tsutsui *et al.*, 2011). O estresse oxidativo tem efeitos diretos sobre a estrutura e função celular, e pode ativar moléculas sinalizadoras integrais do remodelamento cardíaco (Figura 1).

As mudanças nas condições hemodinâmicas geradas pela HAS podem causar alterações funcionais na síntese e liberação de fatores vasoativos no sistema vascular. As ERO podem ser produzidas por células vasculares, óxido nítrico (NO), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (via enzimática), xantina oxidase, lipoxigenase e cicloxigenase (associada à membrana). A atuação das ERO sobre o sistema cardiovascular envolve a regulação e diferenciação celular, modulação da matriz extracelular, transformação do NO em peróxido de nitrito e estimulação de várias quinases (Touyz *et al.*, 2004). A geração de ERO em maiores quantidades causa diminuição do NO biodisponível, o que induz prejuízo na função endotelial e cardíaca (Panza *et al.*, 1990).

As células aeróbias possuem mecanismos para combater os efeitos agressivos das ERO, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e o sistema não enzimático (Bertaglia *et al.*, 2011).

A NADPH oxidase e suas subunidades gp91phox e p22phox são importantes fontes de ERO no coração (Xu *et al.*, 2010). A NADPH pode ser ativada por fatores hemodinâmicos (*shear stress*), humorais e genéticos, e essa ativação pode gerar grande quantidade de radicais superóxido (Vasconcelos *et al.*, 2011). O aumento da atividade e expressão da NADPH oxidase está associado à hipertrofia

ventricular esquerda em modelos experimentais de sobrecarga de pressão (Li, 2002).

Muitas vezes o aumento do estresse oxidativo causa ativação de vias sinalizadoras como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) que podem estar envolvidas na resposta do músculo cardíaco ao estresse oxidativo (Tsutsui *et al.*, 2011). As MAPK respondem a estímulos extracelulares, como o estresse oxidativo, e tem participação em várias atividades celulares tais como expressão gênica, mitose, apoptose e diferenciação celular. A via do NF- κ B desempenha papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção e como fator de transcrição. Essas vias são importantes na transdução de sinais e são sensíveis ao estresse oxidativo. No músculo esquelético de ratos infartados foi observado aumento do estresse oxidativo, que foi associado a alterações na expressão proteica das vias de sinalização das MAPK e do NF- κ B (Martinez *et al.*, 2016). A atividade dessas vias no miocárdio ainda não está esclarecida.

As metaloproteinases (MMPs) desempenham papel importante nos processos de remodelamento tecidual, tais como migração celular, invasão, proliferação e apoptose (Creemers *et al.*, 2001). O aumento da expressão das MMPs está associado à degradação dos colágenos I e III em indivíduos com IC, mostrando a importância delas na configuração, ativação e deposição do colágeno no processo de fibrose miocárdica (Polyakova *et al.*, 2011). Em modelos animais de IC, foi observado aumento da atividade das MMPs de acordo com a progressão da IC, contribuindo para disfunção e dilatação do VE (Spinale *et al.*, 1998).

As fontes de geração de ERO, assim como as vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo causa alterações no músculo cardíaco, ainda não estão devidamente esclarecidas.

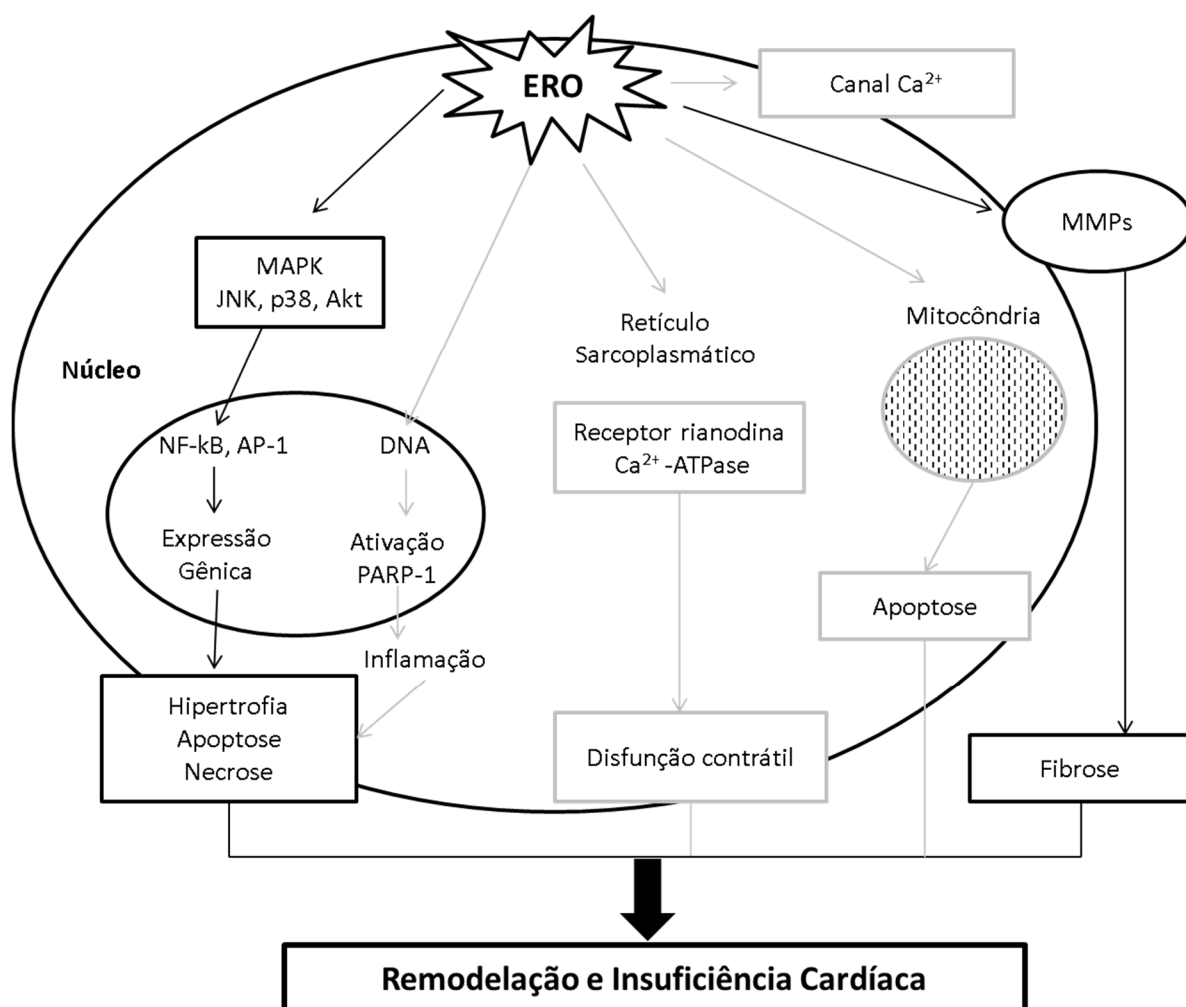


Figura 1: A geração de ERO influencia as moléculas de sinalização envolvidas no crescimento dos miócitos, fibrose, disfunção contrátil e inflamação. Estes processos contribuem para o dano no músculo cardíaco com consequente remodelamento cardíaco. MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógenos; NF-kB: fator nuclear kappa B; JNK: quinase Jun N-terminal; PARP-1: poli (ADP) ribose polimerase-1; MMPs: metaloproteínases da matriz extracelular; AP-1: ativador da proteína 1. *Adaptado de Tsutsui et al., 2011.*

O exercício físico desempenha importante papel na atenuação dos fatores de risco cardiovascular como HAS, dislipidemia, resistência à insulina e obesidade (Rossoni *et al.*, 2011; Sposito *et al.*, 2007; Schenk & Horowitz, 2007). Entre outros efeitos benéficos, destaca-se a ação antioxidante, uma vez que o exercício físico promove aumento na expressão de enzimas antioxidantes e redução na expressão de enzimas pró-oxidantes. O estudo de Xu *et al.* (2010), em modelo experimental de ratos infartados submetidos a treinamento físico aeróbio,

constatou aumento do RNAm das proteínas SOD e CAT, diminuição da fração colágena miocárdica e preservação da fração de encurtamento do VE.

Entretanto, o efeito do exercício físico sobre o remodelamento cardíaco, particularmente associado à HAS não controlada, ainda não está esclarecido. Smart *et al.* (2017) observaram, em pacientes com disfunção sistólica e diastólica, efeitos benéficos do treinamento físico na qualidade de vida e na capacidade física, porém sem mudança na função cardíaca. Recentemente, Locatelli *et al.* (2017) avaliaram os efeitos de um protocolo de baixa intensidade nas estruturas cardíacas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), e constataram atenuação do remodelamento adverso do VE, melhora da eficiência da contração e diminuição da pressão arterial (PA). Da mesma forma, Huang *et al.* (2012) observaram em SHR que o treinamento físico reduz a PA, previne a apoptose e melhora a arquitetura do miocárdio e as vias sinalizadoras cardíacas relacionadas com a pró-sobrevida. Portanto, o treinamento físico pode ser importante estratégia não farmacológica para a atenuação do remodelamento cardíaco adverso da HAS não controlada.

No entanto, efeitos adversos do exercício físico em SHR também já foram descritos. Costa Rebelo *et al.* (2012) demonstraram que o exercício físico aeróbico de alta intensidade em SHR idosos, com PA não controlada, produz aumento de fenótipos pró-fibróticos com desregulação das proteínas do trânsito de cálcio, contribuindo para o remodelamento cardíaco adverso. As diferentes respostas metabólicas decorrentes da realização de exercício físico podem ser influenciadas por gênero, idade e estado nutricional, como também pelas variáveis do exercício físico (intensidade, duração e tipo de exercício físico).

Portanto, os resultados divulgados na literatura são divergentes e há escassez de estudos envolvendo o exercício físico, estresse oxidativo, as vias de sinalização das MAPK e NF- κ B e alterações da matriz extracelular que estão envolvidos no processo de remodelamento cardíaco induzido por HAS não controlada, na fase que antecede o desenvolvimento de IC. No presente estudo, foi testada a hipótese que o treinamento físico pode atenuar o remodelamento cardíaco, o estresse oxidativo e as alterações das vias MAPK e NF- κ B em ratos espontaneamente hipertensos na fase que antecede o desenvolvimento de IC.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a influência do treinamento físico sobre o remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos na fase que antecede o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Específicos

Avaliar a influência do exercício físico sobre:

- Estruturas e funções cardíacas *in vivo* por ecocardiograma;
- Função miocárdica em músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo;
- Diâmetro dos miócitos e fração colágena miocárdica;
- Atividade de enzimas antioxidantes, marcadores do estresse oxidativo e NADPH oxidase;
- Concentração miocárdica de hidroxiprolina;
- Proteínas da matriz extracelular e das vias das MAPK e do NF- κ B.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar (W) provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e ratos SHR machos provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alimentados com ração comercial Purina® e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas, com três ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ($24\pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos invertidos de luminosidade de 12 h. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (N° 1058/2013).

Foram constituídos quatro grupos experimentais:

- 1) grupo controle (W-SED, n=27), formado por ratos Wistar sedentários;
- 2) grupo controle exercitado (W-EX, n=31), formado por ratos Wistar submetidos a protocolo de exercício;
- 3) grupo SHR sedentário (SHR-SED, n=27);
- 4) grupo SHR submetido a protocolo de exercício (SHR-EX, n=32).

O protocolo de treinamento físico foi aplicado a partir de 13 meses de idade por período de 16 semanas. Antes e após o período de exercício, foram realizadas medidas da pressão arterial caudal e avaliações estruturais e funcionais cardíacas por ecocardiograma. Como a mortalidade dos SHR começa a ocorrer por volta dos 18 meses de idade por IC (Bing *et al.*, 1995; Cezar *et al.*, 2013), optamos por iniciar o experimento com 13 meses de idade.

Tolerância ao esforço

A tolerância ao esforço físico foi avaliada antes e após o período de treinamento. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, sendo iniciado na velocidade de 6 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos, até a exaustão do animal. A velocidade máxima de corrida foi registrada e a distância total percorrida calculada (Ferreira *et al.*, 2007). Os animais foram adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações, por 10 min/dia.

Protocolo de exercício físico

O exercício físico foi realizado em esteira, cinco vezes por semana. Inicialmente, houve período de adaptação, com aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício, conforme tabela abaixo (Quadro 1). A partir da sexta semana de treinamento, os ratos foram exercitados à velocidade de 17 m/min e duração de 45 min até o final do período experimental de 16 semanas. O protocolo utilizado é considerado de baixa intensidade e foi adaptado de Emter *et al.* (2005).

Quadro 1. Protocolo de exercício físico em esteira rolante por 16 semanas

Semanas	Velocidade (m/min)	Duração (min)
1 ^a	5	10
2 ^a	7,5	16
3 ^a	10	22
4 ^a	13	26
5 ^a	15	36
6 ^a em diante	17	45

m: metros; min: minutos

Medida da pressão arterial

A pressão arterial sistólica foi aferida indiretamente na cauda do animal. Os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40° C por 5 minutos e as medidas determinadas por plestimografia, utilizando-se o aparelho electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System; modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA) (Pfeffer *et al.*, 1971).

Avaliação das estruturas cardíacas e função ventricular *in vivo*

As estruturas cardíacas e a função do VE foram avaliadas antes e após o protocolo de exercício físico por ecocardiograma transtorácico. O exame antes do exercício físico teve como objetivo certificar a homogeneidade dos grupos. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de

xilidino (1 mg/kg), por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório (Okoshi *et al.*, 2002; Fioretto *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2009). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography (Sahn *et al.*, 1978). As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Δ endo): $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Δ meso): $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)$; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; e 4) velocidade de deslocamento do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular. A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); 4) velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (onda E') obtida por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E'). Adicionalmente foi calculado o índice de performance miocárdica do VE (Tei *et al.*, 1997).

Estudo do músculo isolado

A função miocárdica foi analisada por meio de preparações com músculos papilares isolados do VE. O desempenho mecânico do músculo papilar foi avaliado no dia seguinte à realização do último ecocardiograma, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente em nosso laboratório (Cicogna *et al.*, 1997; Cicogna *et al.*, 2000; Gut *et al.*, 2003; Okoshi *et al.*, 2006). Em resumo, após anestesia com tiopental (50 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia mediana. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose; e 24,88 NaCO₃. A solução foi mantida à temperatura de 28° C e oxigenada com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. A seguir, um músculo papilar do VE foi dissecado e preso a dois anéis de aço inoxidável pelas extremidades, e transferido para câmara contendo solução de Krebs Henseleit com pH entre 7,38 a 7,42 e pressão parcial de oxigênio entre 550 e 600 mmHg. A extremidade inferior do músculo foi acoplada a transdutor de força (Kyowa 120T 20B) e a superior a sistema de alavanca isotônica que permite ajuste do comprimento de repouso do músculo e da pós-carga.

O músculo papilar foi estimulado 12 vezes por min por meio de eletrodos de platina (E8 - Grass) com voltagem de estímulo de 12 a 15 volts, correspondente a valor 10% acima do mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo.

Após período de 60 min, no qual o músculo contraiu sem desenvolver força (contração isotônica), este foi colocado em contração isométrica pela adição de pós-carga de 50 g. A seguir, o músculo foi progressivamente estirado, até a força desenvolvida atingir seu valor máximo. O comprimento de repouso da fibra muscular associado com a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se L_{max}. O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 min. Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD, g/mm²), tensão de repouso (TR, g/mm²), velocidade de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm²/s) e velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt,

g/mm²/s). As contrações isométricas foram registradas por meio de sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). Os valores de tensão foram normalizados pelas áreas seccionais dos músculos.

A reserva contrátil foi avaliada por meio dos seguintes estímulos inotrópicos: 1) contrações após pausas de 10, 30 e 60 segundos; 2) aumento da concentração extracelular de cálcio de 0,625 para 1,25 e 2,5 mM; e 3) adição de isoproterenol (10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M) à solução nutriente.

O comprimento do músculo (Lmax) foi medido com auxílio de catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). Ao final do experimento, a porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. A área seccional do músculo foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento.

Análise histológica do ventrículo esquerdo

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras do VE foram transferidas para câmara do micrótomo criostato (-20° C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (Tissue-Tek OCT Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras musculares com espessura de 8 µm. A seguir, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina. Em secções do VE foram medidos os menores diâmetros transversos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas em que os núcleos estivessem claramente identificáveis (Ahmet *et al.*, 2005). Outras lâminas foram coradas por *picro-sirius red* e utilizadas para quantificação da fração de colágeno intersticial, mensurada em pelo menos 20 campos histológicos. A fração de colágeno intersticial foi correspondente à porcentagem de tecido colágeno em relação à área total do músculo. Na avaliação, não foram incluídas regiões perivasculares. As análises morfométricas foram realizadas em sistema de análise de imagem computadorizado com o auxílio de

microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo normalizados pelo peso corporal e tíbia dos animais. Após a retirada do coração do tórax, foram colhidos fragmentos do pulmão, átrios e do fígado para a determinação da relação peso seco/peso úmido desses órgãos.

Análise de atividade das enzimas antioxidantes

Amostras do miocárdio do VE (cerca de 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 9.000 g por 15 min, em centrífuga refrigerada a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e análise de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (Cat) (Lowry *et al.*, 1951). As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (μQuant-MQX 200 com KC Junior software, Bio-Tek Instruments, USA) (Rosa *et al.*, 2016). 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 das enzimas antioxidantes foi utilizado para quantificação de hidroperóxido de lipídio. Através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com o alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (Jiang *et al.*, 1991).

Concentração miocárdica de malondialdeído

Amostras de tecidos congelados do VE foram pesados e colocados em tubos Eppendorf. Um tampão foi adicionado mantendo a proporção de 100 µL de tampão para 10 mg de tecido (tampão: KPi 50 mM + EDTA 1 mM, pH 7,4). Após homogeneização e sonicação, as amostras descansaram durante 30 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 min a 4° C e o sobrenadante removido. Foram utilizados 40 µL da amostra para determinar o malondialdeído (MDA) e proteínas. A quantidade de 25 µL foi adicionada a 500 µL de tampão de acetato de sódio anidro 2 M, pH 3,5, com 0,2% de ácido tiobarbitúrico (TBA), e foi incubada por 60 min a 95° C. Durante a reação de ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA e produz um cromogênio rosa com absorção máxima de 532-535 nm. Foi adicionado 500 µL do tampão KH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8, em cada amostra e, em seguida, agitada e centrifugada a 13.000 g por 5 min a 4° C. Após, 200 µL do sobrenadante foi removido e 200 µL do tampão de KH₂PO₄ 50 mM, pH 3,5, foi adicionado e agitado. A seguir, foi retirado 200 µL e colocado num frasco para ser analisado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Buege & Aust, 1978). Essa técnica foi realizada no *Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia*, sob orientação do Prof. José Viña.

Concentração sérica de malondialdeído

A peroxidação lipídica sistêmica foi avaliada pela medição de MDA por HPLC, conforme relatado anteriormente (Nilsen *et al.*, 1997). Em resumo, 100 µL de soro foram tratados com 700 µL de ácido ortofosfórico a 1% e misturados com vórtex durante 10 s para precipitação da proteína. Em seguida, foi adicionado 200 µL de TBA. A mistura foi aquecida a 100° C por 60 min e arrefecida a -20° C por 10 min. A seguir, adicionou-se 200 µL desta mistura a uma solução contendo 200 µL de NaOH: metanol (1:12). Os tubos foram centrifugados por 3 min a 13.000 g, e 200 µL do sobrenadante foram retirados para análise no equipamento de HPLC. A fase móvel consistiu numa mistura de 60:40 (v/v) de 10 mM de

dihidrogenofosfato de potássio (pH 6,8): metanol. O MDA foi quantificado por uma curva de calibração construída diariamente para essa análise.

Avaliação da atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada em frações enriquecidas de membrana celular pela redução de lucigenina detectada por luminômetro. A lucigenina, uma vez reduzida para seu cátion-radical (LucH^+) por uma redutase (principalmente flavoenzimas, que utilizam o NADH como substrato), sofre a segunda redução ao reagir (especificamente) com ânion radical superóxido e gera o composto instável dioxetano, que por sua vez, decai espontaneamente para acridona liberando luz, que pode ser quantificada.

O músculo cardíaco foi cuidadosamente lavado em PBS para remoção de sangue e trombos. Fragmentos do músculo de aproximadamente 200 mg foram homogeneizados com auxílio de Polytron, em gelo, com 1,0 mL de tampão de lise contendo Tris 50 mM (pH 7,4), DTPA 100 mM, β -mercaptoetanol 0,1% e inibidores de protease. A seguir, as amostras foram submetidas a sonicação (3 ciclos de 10 segundos a 8 Watts) e centrifugação a 1.000 g, por 3 min, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 18.000 g, por 10 min, a 4° C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para tubo de ultracentrífuga e submetido a centrifugação a 100.000 g, por 45 min a 4° C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 100 μL de tampão de lise, obtendo-se, assim, a fração enriquecida da membrana. A quantificação de proteínas totais foi realizada, então, pelo método de Bradford.

Posteriormente, foram incubados 30 μg de fração enriquecida da membrana em PBS (pH 7,4 contendo EDTA 10 μM) e 150 μL de NADPH 2,0 mM em tubos de plástico colocados no equipamento luminômetro Sirius Berthold, que realiza injeção automática de 20 μL de lucigenina 0,25 mM em cada tubo. Os dados de luminescência foram obtidos a cada 2 s durante 5 min por meio do programa FB12/Sirius. A atividade da NADPH oxidase, avaliada pela redução de lucigenina, é apresentada pela área sob a curva dos dados de luminescência obtidos durante a reação.

Avaliação do conteúdo de hidroxiprolina miocárdica

Para avaliação da hidroxiprolina do tecido cardíaco foi utilizado ensaio colorimétrico pelo *kit* comercial Quickzyme Hydroxyproline Assay (Quickzyme Biosciences®). A análise de hidroxiprolina foi realizada por hidrólise ácida mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos da amostra e, posteriormente, foi adicionado a solução cloramina T/P-dimetilamina-benzaldeído para obtenção de cor, e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 570 nm conforme bula do *kit*.

Quantificação da expressão de proteínas colágeno I, colágeno III e lisil oxidase (LOX)

A expressão proteica dos colágenos tipo I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e III (ABCAM, Cambridge, MA, USA) e da LOX (ABCAM, Cambridge, MA, USA) foi avaliada por *Western blot*. As amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCl 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200 mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCl 240 mM, pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mM, pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), 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), aproximadamente 3 h, com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 min à temperatura ambiente sob constante agitação. Em

seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1,0 M, pH 2,8, NaCl 5,0 M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 h. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 h. 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 Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH (6C5 sc-32233, Santa Cruz Biotechnology).

Quantificação da expressão de proteínas das vias das MAPK e do NF- κ B

A expressão proteica das formas total e fosforilada das proteínas da via das MAPK (JNK, ERK e p38-MAPK) e do NF- κ B (I κ B e subunidade p65 do NF- κ B) foi avaliada também pela técnica de *Western blot*, conforme descrito acima.

Anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA): p-JNK (sc-6254), JNK total (sc-137019), p-ERK (sc-16982), ERK total (sc-93), p-p38-MAPK (sc-17852), p38-MAPK total (sc-7972), Ser 276 p-p65 NF- κ B (sc-101749), Ser 536 p-p65 NF- κ B (sc-33020), p65 NF- κ B total (sc-7151) e GAPDH (sc-32233).

Anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA): anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

Quantificação da expressão de proteínas do inibidor tecidual da metaloproteinase (TIMP)

A expressão proteica dos TIMP-1 e TIMP-2 foi avaliada também pela técnica de *Western blot*. Anticorpos primários: TIMP-1 (R&D Systems, Mouse IgG1 Clone 150906); TIMP-2 (Novus Biologicals, rabbit - NB100-92000). Anticorpos

secundários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA): anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

Zimografia da metaloproteinase

A atividade da metaloproteinase foi avaliada pelo método de zimografia, utilizando-se o método adaptado de Tyagi *et al.* (1993). Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X; 10 mM CaCl₂. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 200 µL deste tampão. As amostras foram trituradas a 21.000 rpm e centrifugadas a 13.000 g, por 20 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada pelo método de Bradford (1976) e a concentração final ajustada para 4 µg/µL. As amostras (20 µg de proteína) foram diluídas em tampão da amostra contendo: 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol; e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina, e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 100 V por 1,5 h, contendo tampão Tris-Glicina-SDS pH 8,3. Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes por 30 min cada vez, em 2,5% Triton X-100 e, após, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 18 h em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de CaCl₂, em agitação contínua e à temperatura de 37° C. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie blue 2,5% por 1 h e descorado com solução de metanol 30% e ácido acético 10%. Um controle positivo foi utilizado para confirmar o peso molecular das bandas (R & D Systems). Os géis foram fotografados no analisador de imagens Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel.

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. As comparações entre os grupos foram realizadas pela técnica de análise de variância (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. Os valores de frequência dos sinais de IC são apresentados em porcentagem e as comparações foram realizadas pelo teste de Goodman. As conclusões estatísticas são discutidas no nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e sinais de insuficiência cardíaca

Para a constituição dos grupos nesse estudo foram utilizados 58 ratos normotensos Wistar, divididos em sedentários (n=27) e exercitados (n=31), e 59 ratos SHR, divididos em sedentários (n=27) e exercitados (n=32). No final do experimento, os grupos normotensos apresentaram mortalidade de seis animais sendo três em cada grupo, e os grupos hipertensos apresentaram mortalidade de dez animais (seis sedentários e quatro exercitados).

A frequência de sinais de IC apresentada pelos grupos estão na Figura 2. O grupo SHR-SED apresentou maior porcentagem de ratos com derrame pleural e taquipneia em comparação com os grupos W-SED e SHR-EX. O grupo SHR-EX apresentou maior porcentagem de derrame pleural e congestão hepática em comparação ao grupo W-EX. Os ratos normotensos não apresentaram nenhum sinal de IC.

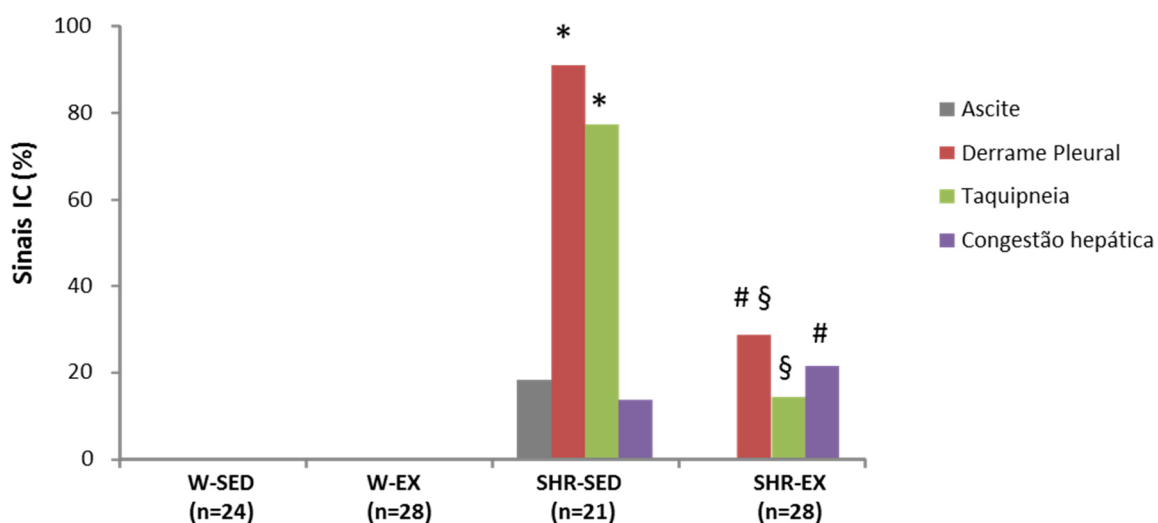


Figura 2. Frequência de sinais de insuficiência cardíaca. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: $p < 0,05$ vs. W-SED; #: $p < 0,05$ vs. W-EX; §: $p < 0,05$ vs. SHR-SED (teste de Goodman).

Teste de esforço

Na Figura 3 são apresentados os dados de distância percorrida e tempo do teste de esforço, antes e após o protocolo de exercício físico. No teste final, os grupos SHR apresentaram melhor desempenho em relação aos respectivos controles normotensos. Os grupos exercitados tiveram melhor desempenho em relação aos grupos sedentários após o protocolo de exercício.

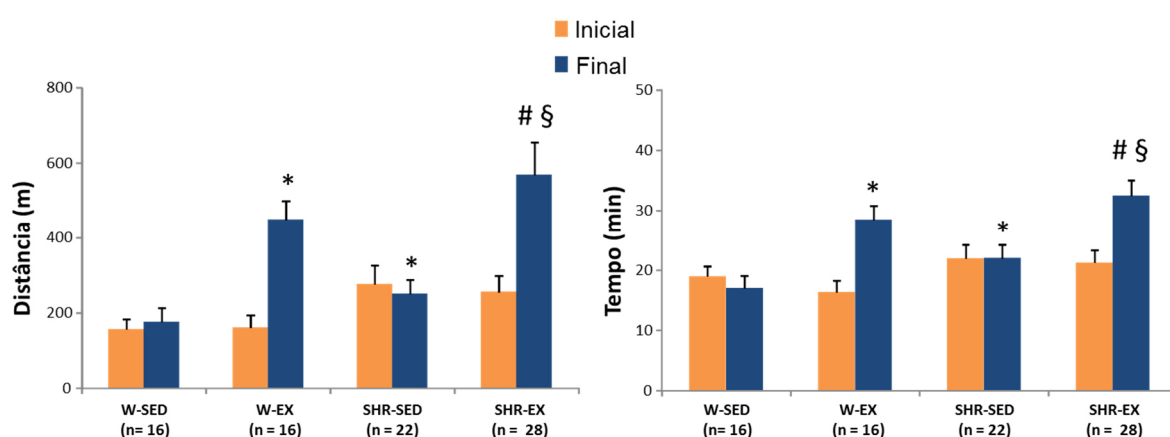


Figura 3: Distância e tempo no teste de esforço. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos e exercitados. Os símbolos indicam diferença estatística no momento final (*: $p < 0,05$ vs. W-SED final; #: $p < 0,05$ vs. W-EX final; §: $p < 0,05$ vs. SHR-SED final; ANOVA).

Pressão arterial sistólica (PAS)

A Tabela 1 apresenta os valores de PAS inicial e final dos quatro grupos. O grupo SHR-SED e o SHR-EX apresentaram valores de PAS maiores quando comparado com os respectivos controles, no início e final do experimento.

Tabela 1. Pressão arterial sistólica (PAS) no início e final do experimento

	W-SED (n= 23)	W-EX (n= 28)	SHR-SED (n= 21)	SHR-EX (n= 28)
PAS inicial (mmHg)	109 ± 15,6	108 ± 12,6	185 ± 17,2*	175 ± 17,2 [#]
PAS final (mmHg)	119 ± 11,0	114 ± 8,57	194 ± 21,6*	188 ± 12,2 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; *: $p < 0,05$ vs. W-SED; #: $p < 0,05$ vs. W-EX; (ANOVA).

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). Na Tabela 2 são apresentadas as variáveis estruturais do coração avaliadas ao final do experimento. Os grupos hipertensos apresentaram menor peso corporal e maior DDVE/PC, AE/PC, IMVE, EDPP e espessura relativa do VE em comparação aos respectivos controles. O DSVE foi menor no grupo SHR-SED em comparação ao controle. O AE foi maior no grupo SHR-EX em comparação com o W-EX e menor em comparação com o SHR-SED. A razão AE/AO foi menor no controle W-EX em comparação com o controle sedentário e maior no grupo SHR-EX em comparação com o W-EX. A EDPP e a espessura relativa do VE foram menores no grupo SHR-EX em comparação com o SHR-SED. A espessura relativa foi maior no grupo W-EX em comparação com o W-SED. A FC, AO e MVE não apresentaram diferença entre os grupos.

A Tabela 3 apresenta os dados da função sistólica do VE. Os grupos hipertensos apresentaram menor VEPP e S' média e maior valor do índice de Tei em comparação aos respectivos grupos controles. O índice de Tei avalia conjuntamente o desempenho miocárdico sistólico e diastólico, e quanto menor o índice melhor o desempenho. Os resultados da avaliação indicam comprometimento da função sistólica e do desempenho miocárdico nos grupos hipertensos, e o exercício não melhorou esses índices.

A Tabela 4 mostra os dados obtidos da avaliação da função diastólica do VE por ecocardiograma. Os grupos hipertensos apresentaram maior valor no TRIV em comparação aos respectivos controles, e o grupo SHR-EX apresentou menor valor dessa variável em comparação com o SHR-SED. O E' septal foi menor nos grupos hipertensos em comparação com os respectivos controles. O grupo SHR-SED apresentou E' lateral menor em comparação com o controle normotenso. O grupo SHR-EX apresentou A' lateral menor em comparação com o controle normotenso. Em relação a A' média e A' septal não houve diferença entre os grupos. Esses dados indicam comprometimento diastólico do VE nos grupos hipertensos, e o exercício foi benéfico por reduzir a tempo de relaxamento isovolumétrico do VE.

Tabela 2. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração

	W-SED (n= 19)	W-EX (n= 18)	SHR-SED (n= 18)	SHR-EX (n=22)
PC (g)	612 ± 76	576 ± 56*	377 ± 43*	373 ± 34 [#]
FC (bpm)	268 ± 29	285 ± 29	263 ± 52	279 ± 50
DDVE (mm)	8,67 ± 0,36	8,41 ± 0,36	7,56 ± 0,60*	7,78 ± 0,54 [#]
DSVE (mm)	4,50 ± 0,43	4,16 ± 0,48	3,83 ± 0,53*	4,01 ± 0,56
EDPP (mm)	1,37 (1,32 - 1,42)	1,41 (1,36 - 1,44)	1,63 (1,57 - 1,70)*	1,53 (1,49 - 1,59) ^{#§}
AO (mm)	4,38 (4,20 - 4,56)	4,38 (4,16 - 4,57)	4,38 (4,38 - 4,56)	4,38 (4,20 - 4,38)
AE (mm)	6,28 ± 0,40	5,76 ± 0,54*	6,57 ± 0,54	6,18 ± 0,50 ^{#§}
AE/AO	1,43 ± 0,07	1,33 ± 0,13*	1,49 ± 0,11	1,42 ± 0,13 [#]
DDVE/PC (mm/kg)	14,4 ± 1,73	14,8 ± 1,63	20,2 ± 2,05*	21,0 ± 2,30 [#]
AE/PC (mm/kg)	10,4 ± 1,29	10,1 ± 1,21	17,7 ± 3,14*	16,7 ± 1,95 [#]
MVE (g)	0,88 ± 0,10	0,85 ± 0,08	0,87 ± 0,12	0,80 ± 0,19
IMVE (g/kg)	1,45 ± 0,19	1,50 ± 0,18	2,32 ± 0,29*	2,26 ± 0,31 [#]
Esp. Rel. VE	0,32 (0,31 - 0,33)	0,34 (0,32 - 0,35)*	0,43 (0,39 - 0,48)*	0,39 (0,43 - 0,48) ^{#§}

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: MVE/PC; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; * p<0,05 vs. W-SED; # p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 3. Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

	W-SED (n= 19)	W-EX (n= 18)	SHR-SED (n= 18)	SHR-EX (n=22)
% Enc. Endo	46,9 (44,4 – 51,2)	50,4 (48,1 – 53,2)	46,8 (44,9 – 55,6)	48,3 (44,5 – 51,0)
VEPP (mm/s)	42,5 ± 1,75	42,7 ± 4,22	35,0 ± 6,53*	35,8 ± 4,78#
Índice de Tei	0,45 ± 0,07	0,44 ± 0,08	0,62 ± 0,06*	0,59 ± 0,08#
S' média (cm/s)	3,91 ± 0,56	3,64 ± 0,34	2,83 ± 0,48*	2,90 ± 0,29#

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; % 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; *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 4. Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

	W-SED (n= 17)	W-EX (n= 15)	SHR-SED (n= 13)	SHR-EX (n=16)
E mitral (cm/s)	77,0 (69,0 - 90,0)	73,5 (69,0 - 83,0)	87,5 (60,8 - 98,0)	80,0 (75,5 - 90,5)
A mitral (cm/s)	56,0 (53,0 - 62,0)	52,0 (46,8 - 62,5)	53,5 (47,8 - 74,0)	53,0 (42,0 - 81,5)
E/A	1,38 (1,23 - 1,57)	1,42 (1,24 - 1,60)	1,68 (0,83 - 1,98)	1,67 (1,08 - 1,94)
TRIV (ms)	26,0 (24,0 - 30,0)	26,0 (22,0 - 26,0)	36,0 (33,0 - 37,0)*	33,0 (30,0 - 34,5)#§
E' média (cm/s)	4,55 (4,35 - 4,80)	4,25 (4,07 - 4,77)	4,00 (2,48 - 4,36)*	4,20 (3,16 - 4,56)
E' lateral (cm/s)	4,60 ± 0,58	4,21 ± 0,70	3,58 ± 1,17*	4,13 ± 1,04
E' septal (cm/s)	4,50 (4,40 - 4,80)	4,70 (4,10 - 4,76)	3,80 (2,50 - 4,20)*	3,95 (3,08 - 4,45)#
E/E' media	17,4 ± 2,32	16,9 ± 3,36	22,2 ± 4,60	21,4 ± 6,37
A' média (cm/s)	3,66 ± 0,73	4,07 ± 0,85	3,44 ± 0,55	3,67 ± 0,79
A' lateral (cm/s)	3,71 ± 0,71	4,22 ± 0,96	3,31 ± 0,72	3,57 ± 0,86#
A' septal (cm/s)	3,30 (2,90 - 4,10)	3,75 (3,48 - 4,48)	3,55 (2,98 - 4,33)	3,90 (2,98 - 4,33)
E' média/ A' media	1,28 (1,15 - 1,51)	1,09 (0,90 - 1,36)	1,15 (0,77 - 1,42)	1,16 (0,84 - 1,38)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; 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; *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Variáveis anatômicas

A Tabela 5 mostra as variáveis corporais e cardíacas dos quatro grupos. As variáveis peso corporal (PC), comprimento da tíbia (tíbia), peso do ventrículo direito (VD) e peso dos átrios estavam diminuídas nos grupos SHR em relação aos respectivos controles. No entanto, as relações VE/PC, e a relação peso úmido/seco do pulmão foram maiores nos grupos SHR em comparação com os

respectivos controles. O peso dos átrios e a relação átrio/tíbia foram menores no grupo SHR-EX em relação ao SHR-SED. O grupo SHR-SED apresentou maiores valores na relação VD/PC, átrios/PC e dos pesos úmido/seco do VE e VD em relação ao grupo W-SED. O grupo W-EX apresentou maior valor da relação VD/PC em comparação ao W-SED. O peso do VE, as relações VE/tíbia e dos pesos úmido/seco dos átrios e do fígado não apresentaram diferenças entre os grupos.

Tabela 5. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais

	W-SED (n= 24)	W-EX (n= 28)	SHR-SED (n=21)	SHR-EX (n= 28)
PC (g)	612 ± 76	576 ± 56*	377 ± 43*	373 ± 34 [#]
Tíbia (cm)	4,70 (4,60 - 4,80)	4,70 (4,60 - 4,80)	4,20 (4,10 - 4,30)*	4,30 (4,25 - 4,30) [#]
VE (g)	1,04 (0,94 - 1,21)	1,07 (0,98 - 1,13)	0,99 (0,90 - 1,05)	1,05 (0,97 - 1,10)
VE/PC (g/kg)	1,64 (1,54 - 1,96)	1,87 (1,79 - 2,00)	2,67 (2,55 - 2,89)*	2,78 (2,64 - 2,96) [#]
VE/Tíbia (g/cm)	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,02
VD (g)	0,27 (0,24 - 0,30)	0,29 (0,24 - 0,32)	0,21 (0,19 - 0,22)*	0,22 (0,20 - 0,23) [#]
VD/PC (g/kg)	0,41 (0,38 - 0,49)	0,52 (0,44 - 0,64)*	0,54 (0,49 - 0,61)*	0,56 (0,52 - 0,62)
VD/Tíbia (g/cm)	55,2 (48,4 - 63,9)	61,5 (53,7 - 66,7)	48,8 (47,1 - 52,0)*	50,5 (46,7 - 53,1) [#]
Átrios (g)	0,12 (0,11 - 0,13)	0,13 (0,12 - 0,14)	0,09 (0,08 - 0,10)*	0,08 (0,07 - 0,09) ^{#§}
Átrios/PC (g/kg)	0,20 (0,17 - 0,22)	0,23 (0,19 - 0,24)	0,23 (0,21 - 0,30)*	0,21 (0,20 - 0,25)
Átrios/Tíbia (g/cm)	5,96 (5,43 - 6,34)	6,04 (5,24 - 6,80)	4,61 (4,40 - 5,41)*	4,00 (3,65 - 4,75) ^{#§}
VE úmido/seco	4,01 (3,68 - 4,19)	3,99 (3,73 - 4,26)	4,34 (4,15 - 4,49)*	4,21 (3,93 - 4,54)
VD úmido/seco	4,18 (4,01 - 4,28)	4,14 (3,96 - 4,24)	4,33 (4,18 - 4,44)*	4,24 (4,06 - 4,38)
Átrios úmido/seco	4,49 (4,10 - 4,82)	4,60 (4,27 - 4,75)	4,67 (4,37 - 4,84)	4,60 (4,38 - 4,81)
Pulmão úmido/seco	4,67 (4,47 - 4,97)	4,58 (4,47 - 4,68)	4,92 (4,59 - 5,25)*	4,92 (4,74 - 5,25) [#]
Fígado úmido/seco	3,05 (2,99 - 3,13)	3,07 (2,99 - 3,15)	3,11 (2,93 - 3,35)	2,96 (2,59 - 3,20)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; PC: peso corporal; Tíbia: comprimento da tíbia; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Estudo do músculo isolado

Os resultados da função miocárdica avaliada pela técnica do músculo papilar isolado, na condição basal, estão apresentados na Tabela 6. O grupo SHR-EX apresentou melhor desempenho em todas as variáveis em comparação com o controle normotenso, e maior +dT/dt em comparação ao grupo SHR-SED. A TR e a -dT/dt foi maior nos grupos SHR em relação aos respectivos controles. Embora a

TD e a $-dT/dt$ tenha sido maior no grupo SHR-EX em relação ao SHR-SED, essas diferenças não atingiram significância estatística.

Na Tabela 7 estão apresentadas as variáveis de função miocárdica após pausas de 10, 30 e 60 segundos. O grupo SHR-EX apresentou valores mais elevados da TD, TR e da $-dT/dt$ em comparação ao W-EX após as três pausas. Já o grupo SHR-SED mostrou maior TR em relação ao respectivo controle (W-SED) após as pausas de 30 e 60 segundos. Não houve diferença entre os grupos SHR.

A elevação da concentração extracelular de cálcio resultou nos dados apresentados na Tabela 8. O grupo SHR-EX apresentou maiores valores da TD, TR e $-dT/dt$ nas três concentrações de cálcio em relação ao grupo W-EX, e na concentração 0,625 mM apresentou maior valor em comparação ao SHR-SED nas variáveis TD e $+dT/dt$. O grupo SHR-SED apresentou maiores valores em relação ao controle nas variáveis TD, TR e $-dT/dt$ nas concentrações de cálcio de 0,625 e 1,25 mM. Na concentração de cálcio de 2,5 mM, apenas o valor da TR foi maior no grupo SHR-SED em comparação com o controle.

A Tabela 9 apresenta as variáveis funcionais após adição de diferentes concentrações de isoproterenol. Na condição basal, o grupo SHR-EX mostrou maior valor de todas as variáveis em relação ao grupo W-EX, e maior TD e TR no grupo SHR-EX após adição de isoproterenol 10^{-8} M em relação ao controle W-EX. Os grupos SHR-EX e SHR-SED apresentaram maior TR em todas as concentrações de isoproterenol em comparação aos respectivos controles. Somente a $+dT/dt$, na condição basal, foi maior no grupo SHR-EX em relação ao SHR-SED. Interessante notar que nas três concentrações de isoproterenol utilizadas, os valores das variáveis de função contrátil e de relaxamento foram sempre maiores no grupo SHR-EX em relação ao SHR-SED, embora sem atingir significância estatística.

Tabela 6. Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas na condição basal

	W-SED (n=14)	W-EXE (n=13)	SHR-SED (n=18)	SHR-EXE (n=17)
TD (g/mm ²)	5,02 ± 1,41	4,84 ± 1,10	5,77 ± 1,32	6,35 ± 0,82 [#]
TR (g/mm ²)	0,57 ± 0,17	0,52 ± 0,09	0,78 ± 0,15*	0,79 ± 0,19 [#]
+dT/dt (g/mm ² /s)	53,3 ± 16,8	50,4 ± 11,5	52,2 ± 12,8	63,4 ± 9,78 ^{#§}
-dT/dt (g/mm ² /s)	20,2 ± 4,74	19,6 ± 3,49	23,2 ± 4,41*	24,7 ± 3,30 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 7. Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após pausas de 10, 30 e 60 segundos

	Grupos	PP 10 s	PP 30 s	PP 60 s
TD (g/mm²)	W-SED	5,94 ± 1,53	6,60 ± 1,49	6,81 ± 1,52
	W-EX	5,82 ± 1,12	6,47 ± 1,21	6,65 ± 1,25
	SHR-SED	6,49 ± 1,38	7,05 ± 1,45	7,26 ± 1,48
	SHR-EX	7,30 ± 1,53 [#]	7,80 ± 1,53 [#]	7,98 ± 1,60 [#]
TR (g/mm²)	W-SED	0,56 ± 0,17	0,56 ± 0,16	0,55 ± 0,16
	W-EX	0,52 ± 0,08	0,52 ± 0,11	0,51 ± 0,12
	SHR-SED	0,82 ± 0,19	0,80 ± 0,19*	0,77 ± 0,19*
	SHR-EX	0,84 ± 0,24 [#]	0,85 ± 0,25 [#]	0,82 ± 0,23 [#]
+dT/dt (g/mm²/s)	W-SED	63,0 ± 18,7	69,7 ± 17,5	72,2 ± 17,5
	W-EX	61,6 ± 12,6	69,5 ± 14,4	71,3 ± 14,7
	SHR-SED	58,7 ± 14,4	65,0 ± 15,6	67,1 ± 15,5
	SHR-EX	71,6 ± 14,5	77,2 ± 16,5	78,6 ± 18,0
-dT/dt (g/mm²/s)	W-SED	21,5 ± 4,36	23,2 ± 4,47	23,6 ± 4,25
	W-EX	21,8 ± 3,28	22,8 ± 3,37	23,3 ± 3,08
	SHR-SED	23,8 ± 4,01	24,7 ± 3,96	25,7 ± 4,28
	SHR-EX	25,5 ± 3,60 [#]	26,0 ± 3,91 [#]	26,9 ± 4,40 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX (ANOVA).

Tabela 8. Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após elevação da concentração de cálcio

	Grupos	0,625 mM	1,25 mM	2,5 mM
TD (g/mm ²)	W-SED	3,36 ± 0,82	5,27 ± 0,98	6,13 ± 1,38
	W-EX	3,34 ± 0,77	5,14 ± 0,83	5,88 ± 1,10
	SHR-SED	4,40 ± 1,27*	6,15 ± 1,55*	6,58 ± 1,33
	SHR-EX	5,16 ± 0,97 ^{#§}	6,62 ± 1,26 [#]	6,87 ± 1,33 [#]
TR (g/mm ²)	W-SED	0,49 ± 0,14	0,49 ± 0,14	0,49 ± 0,13
	W-EX	0,46 ± 0,10	0,45 ± 0,09	0,47 ± 0,09
	SHR-SED	0,71 ± 0,15*	0,70 ± 0,16*	0,72 ± 0,19*
	SHR-EX	0,74 ± 0,23 [#]	0,75 ± 0,23 [#]	0,80 ± 0,25 [#]
+dT/dt (g/mm ² /s)	W-SED	35,0 ± 9,12	56,7 ± 12,5	69,3 ± 16,9
	W-EX	35,2 ± 6,42	55,7 ± 8,69	66,2 ± 14,1
	SHR-SED	38,5 ± 10,4	58,5 ± 16,7	63,8 ± 14,6
	SHR-EX	48,8 ± 9,53 ^{#§}	66,5 ± 12,7	71,9 ± 15,2
-dT/dt (g/mm ² /s)	W-SED	15,8 ± 3,50	22,2 ± 3,61	23,4 ± 4,68
	W-EX	15,1 ± 2,26	21,6 ± 2,42	22,7 ± 3,43
	SHR-SED	20,0 ± 5,40*	25,5 ± 5,29*	26,0 ± 4,22
	SHR-EX	22,4 ± 3,45 [#]	26,2 ± 3,99 [#]	26,4 ± 4,05 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA).

Tabela 9. Variáveis funcionais do músculo papilar obtidas após adição de isoproterenol (ISO)

	Grupos	Basal	ISO 10 ⁻⁸ M	ISO 10 ⁻⁷ M	ISO 10 ⁻⁶ M
TD (g/mm ²)	W-SED	5,00 ± 1,00	5,29 ± 1,08	5,50 ± 1,09	5,65 ± 1,11
	W-EX	4,85 ± 0,82	5,14 ± 0,84	5,39 ± 1,00	5,59 ± 1,06
	SHR-SED	5,60 ± 1,32	5,67 ± 1,37	5,71 ± 1,29	5,57 ± 1,17
	SHR-EX	6,23 ± 1,20 [#]	6,34 ± 1,33 [#]	6,33 ± 1,51	6,31 ± 1,63
TR (g/mm ²)	W-SED	0,49 ± 0,14	0,45 ± 0,14	0,46 ± 0,19	0,41 ± 0,13
	W-EX	0,49 ± 0,12	0,44 ± 0,13	0,42 ± 0,12	0,40 ± 0,11
	SHR-SED	0,78 ± 0,18*	0,73 ± 0,17*	0,71 ± 0,17*	0,68 ± 0,17*
	SHR-EX	0,85 ± 0,24 [#]	0,81 ± 0,23 [#]	0,78 ± 0,23 [#]	0,76 ± 0,22 [#]
+dT/dt (g/mm ² /s)	W-SED	53,2 ± 12,4	60,6 ± 13,8	67,1 ± 13,8	73,1 ± 16,9
	W-EX	52,3 ± 8,32	57,6 ± 8,83	65,6 ± 11,4	70,9 ± 11,9
	SHR-SED	51,6 ± 11,9	56,9 ± 14,1	62,3 ± 15,4	64,3 ± 18,7
	SHR-EX	62,5 ± 12,4 ^{#§}	66,6 ± 13,5	71,8 ± 16,1	76,1 ± 18,7
-dT/dt (g/mm ² /s)	W-SED	21,0 ± 3,86	24,8 ± 4,35	31,9 ± 5,40	40,7 ± 7,05
	W-EX	20,2 ± 2,46	23,5 ± 2,68	30,4 ± 3,41	40,0 ± 4,75
	SHR-SED	23,7 ± 5,23	24,8 ± 5,31	32,2 ± 6,72	41,4 ± 8,15
	SHR-EX	24,6 ± 4,02 [#]	25,9 ± 3,95	31,0 ± 4,95	41,7 ± 6,69

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA).

Análise do estresse oxidativo

A Figura 4 apresenta os dados da atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio. O grupo SHR-SED apresentou menor atividade de catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em comparação com o controle W-SED. O grupo SHR-EX apresentou menor produção de superóxido dismutase em comparação com o controle W-EX, e maior produção dessa enzima e da catalase em comparação com o grupo SHR-SED. Esses dados indicam que o exercício melhorou a produção das enzimas antioxidantes no miocárdio de animais hipertensos.

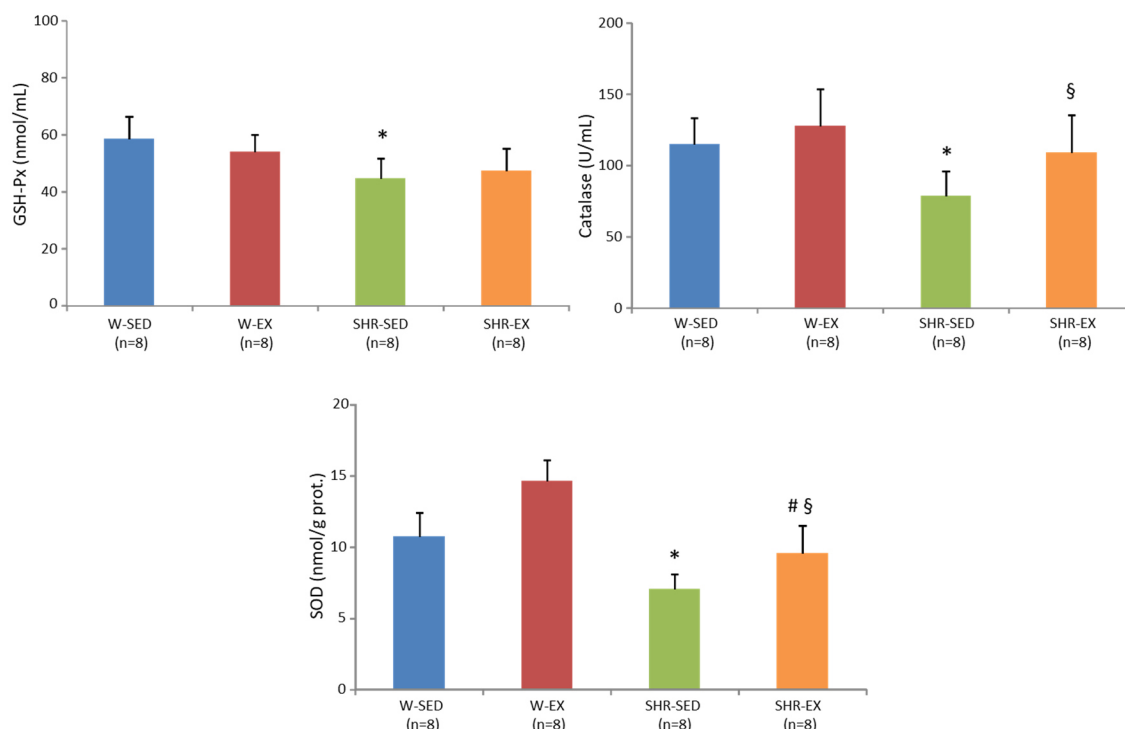


Figura 4. Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio.

W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; GSH-Px: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase. *: $p < 0,05$ vs. W-SED; #: $p < 0,05$ vs. W-EX; §: $p < 0,05$ vs. SHR-SED (ANOVA).

Na Tabela 10 estão expressos os valores da produção de malondialdeído, hidroperóxido de lipídeo e NADPH oxidase. Os grupos hipertensos apresentaram maior produção de hidroperóxido de lipídeo em relação aos respectivos grupos controles. Já os valores de MDA e NADPH oxidase não apresentaram diferenças entre os grupos. O exercício físico não alterou esses níveis.

Tabela 10. Produção de malondialdeído (MDA), hidroperóxido de lipídeo (Hidrop. lip.) e atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase

	W-SED (n=10)	W-EX (n=10)	SHR-SED (n=10)	SHR-EX (n=10)
MDA sérico ($\mu\text{M/L}$)	1,83 $\pm$ 0,39	1,74 $\pm$ 0,37	1,86 $\pm$ 0,42	2,01 $\pm$ 0,74
MDA miocárdico (nmol/mg)	0,86 $\pm$ 0,12	0,70 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,22	0,76 $\pm$ 0,25
Hidrop. lip. (nmol/g tec.)	203 $\pm$ 33	183 $\pm$ 26	248 $\pm$ 24*	226 $\pm$ 38 [#]
NADPH oxidase ($\times 10^6\text{UA/mg}$)	3,42 $\pm$ 1,4	2,65 $\pm$ 1,45	2,50 $\pm$ 0,98	2,87 $\pm$ 0,70

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: $p < 0,05$ vs. W-SED; #: $p < 0,05$ vs. W-EX (ANOVA).

Análise histológica e hidroxiprolina miocárdica

Na Tabela 11 estão expressos os valores de diâmetro dos miócitos, fração colágena intersticial (FCI) e quantificação da concentração de hidroxiprolina do miocárdio do VE. Os grupos hipertensos apresentaram maior diâmetro em comparação com os respectivos grupos controles. A FCI foi maior no grupo SHR-SED em comparação com o controle. A FCI no grupo SHR-EX não foi diferente do controle W-EX e do grupo SHR-SED. A concentração de hidroxiprolina miocárdica não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 11. Diâmetro do miócito, fração colágena intersticial (FCI) e concentração de hidroxiprolina (HOP) do miocárdio do ventrículo esquerdo

	W-SED (n=7)	W-EX (n=7)	SHR-SED (n=7)	SHR-EX (n=7)
Diâmetro (μm)	16,4 $\pm$ 1,11	15,5 $\pm$ 1,18	17,8 $\pm$ 0,96*	17,5 $\pm$ 0,45 [#]
FCI (%)	4,26 $\pm$ 1,19	5,20 $\pm$ 2,11	6,49 $\pm$ 1,00*	6,34 $\pm$ 1,92
HOP ($\mu\text{g/mg}$)	0,88 $\pm$ 0,22	0,77 $\pm$ 0,25	1,11 $\pm$ 0,25	0,97 $\pm$ 0,30

Valores expressos em média e desvio padrão. W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: $p < 0,05$ vs. W-SED; #: $p < 0,05$ vs. W-EX (ANOVA).

Nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 são apresentadas as expressões proteicas analisadas pela técnica de *Western blot* e a zimografia da metaloproteinase. As proteínas da matriz colágena (colágeno III e lisil oxidase), o TIMP-1, a JNK total e a p38 fosforilada, presentes na via das MAPK, p65 (total e fosforilada) e o IκB fosforilada, presentes na via do NF-κB, não apresentaram diferenças entre os grupos avaliados. A expressão proteica do colágeno I foi maior no grupo SHR-EX em comparação com o controle. A relação colágeno I/colágeno III foi maior no grupo SHR-SED em comparação com o grupo W-SED. A expressão proteica total da JNK, IκB e TIMP-2, foram maiores nos grupos hipertensos em comparação aos respectivos controles. A expressão proteica da p38 total e ERK fosforilada e total foi maior no grupo hipertenso sedentário em comparação ao controle. O grupo SHR-EX apresentou menor expressão da ERK fosforilada em relação ao hipertenso sedentário. A MMP-2, inativa e ativa- intermediária, foi maior no grupo SHR-SED em comparação com o controle e a MMP-2 inativa foi menor SHR-EX em comparação com SHR-SED.

Tabela 12. Expressão proteica do colágeno I e III e da lisil oxidase no miocárdio

	W-SED (n=7)	W-EX (n=7)	SHR-SED (n=7)	SHR-EX (n=7)
Colágeno I	1,00 ± 0,22	1,05 ± 0,10	1,45 ± 0,56	1,57 ± 0,64 [#]
Colágeno III	1,00 ± 0,31	0,83 ± 0,15	0,82 ± 0,24	0,99 ± 0,24
Col I/Col III	1,06 ± 0,27	1,29 ± 0,33	1,79 ± 0,40*	1,59 ± 0,53
Lisil oxidase	1,00 ± 0,68	0,49 ± 0,15	1,10 ± 0,52	0,86 ± 0,39

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitrária). W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados; *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX ANOVA.

Tabela 13. Expressão proteica do inibidor tecidual da metaloproteinases (TIMP) 1 e 2 e zimografia da metaloproteinase (MMP)

	W-SED (n=7)	W-EX (n=7)	SHR-SED (n=7)	SHR-EX (n=7)
TIMP-1	1,00 ± 0,28	1,03 ± 0,43	0,75 ± 0,45	0,70 ± 0,28
TIMP-2	1,00 ± 0,57	0,72 ± 0,25	3,68 ± 2,25*	1,42 ± 0,67 [#]
MMP-2 (inativa)	1,00 ± 0,37	1,32 ± 0,46	1,80 ± 0,47*	1,27 ± 0,05 [§]
MMP-2 (ativa intermediária)	0,94 ± 0,17	0,91 ± 0,24	1,23 ± 0,19*	1,12 ± 0,17

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitrária). W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA).

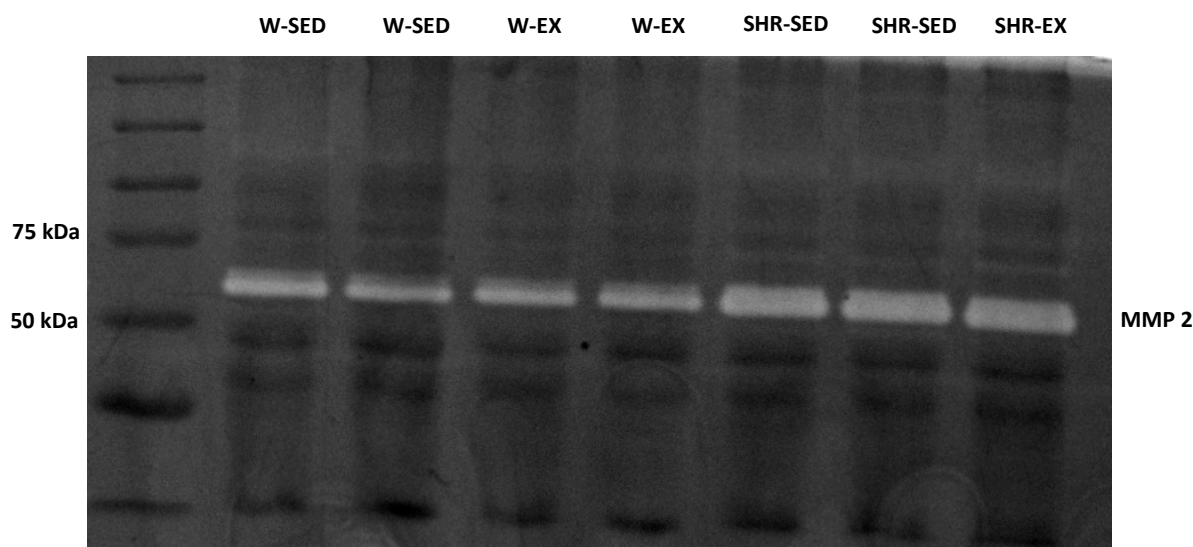


Tabela 14. Expressão proteica da via das MAPK no miocárdio

		W-SED (n=7)	W-EX (n=7)	SHR-SED (n=7)	SHR-EX (n=7)
JNK	Fosforilada	1,00 ± 0,31	1,02 ± 0,31	3,46 ± 1,23*	3,38 ± 1,61 [#]
	Total	1,00 ± 0,47	0,91 ± 0,40	1,54 ± 0,59	1,09 ± 0,27
p38	Fosforilada	1,00 ± 0,37	0,85 ± 0,27	1,10 ± 0,18	1,17 ± 0,49
	Total	1,00 ± 0,22	0,76 ± 0,22	3,38 ± 1,79*	3,36 ± 2,08
ERK	Fosforilada	1,14 (0,69-1,21)	1,14 (0,99-1,44)	6,03 (2,08-10,8)*	0,90 (0,26-0,99) [§]
	Total	1,00 ± 0,41	0,66 ± 0,24	1,54 ± 0,44*	1,12 ± 0,55

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 (unidade arbitrária). W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: p<0,05 vs. W-SED; #: p<0,05 vs. W-EX; §: p<0,05 vs. SHR-SED (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

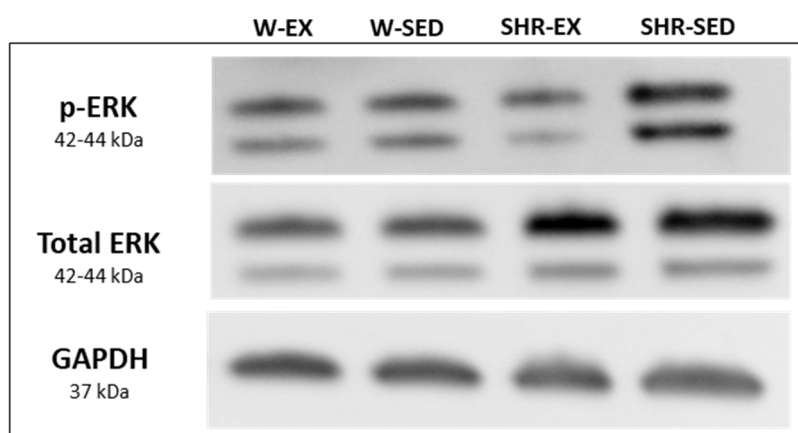
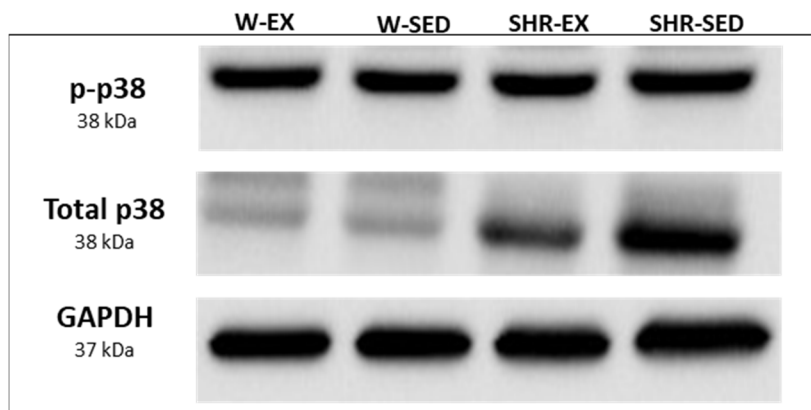
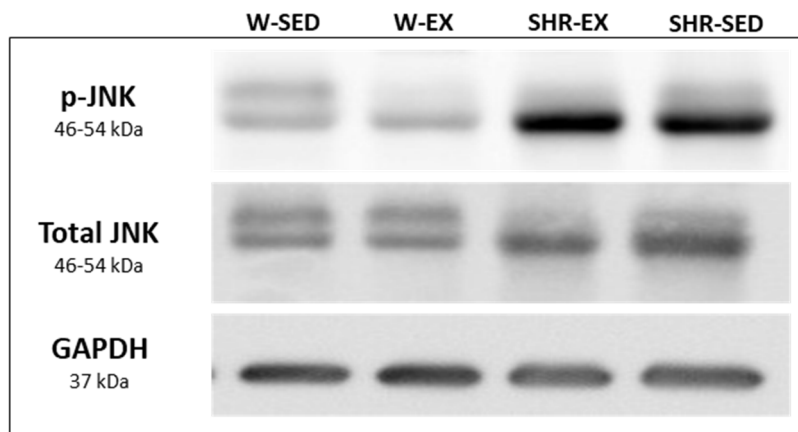
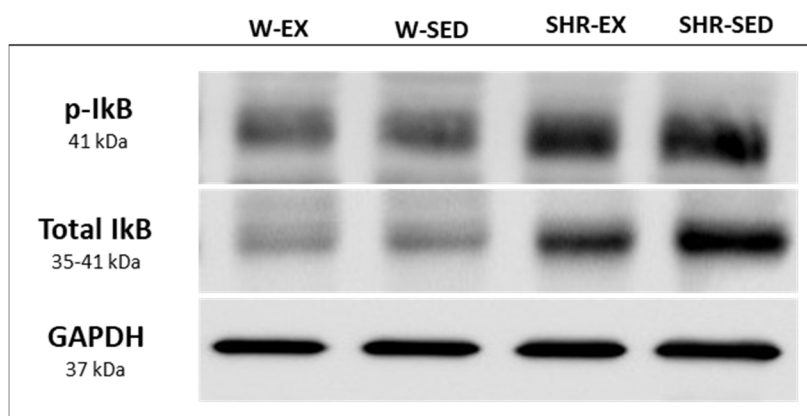


Tabela 15. Expressão proteica da via do NF- κ B no miocárdio

		W-SED (n=7)	W-EX (n=7)	SHR-SED (n=7)	SHR-EX (n=7)
p65 NF- κ B	Fosforilada	1,00 $\pm$ 0,69	0,96 $\pm$ 0,45	1,03 $\pm$ 0,49	0,63 $\pm$ 0,60
	Total	1,00 $\pm$ 0,50	0,61 $\pm$ 0,17	0,90 $\pm$ 0,62	0,90 $\pm$ 0,88
I κ B	Fosforilada	1,00 $\pm$ 0,67	0,75 $\pm$ 0,38	1,53 $\pm$ 0,73	1,01 $\pm$ 0,85
	Total	1,00 $\pm$ 0,67	0,67 $\pm$ 0,26	3,67 $\pm$ 1,50*	2,57 $\pm$ 1,56 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitrária). W-SED: grupo de ratos Wistar sedentários; W-EX: grupo de ratos Wistar exercitados; SHR-SED: grupo de ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-EX: grupo de ratos espontaneamente hipertensos exercitados. *: $p < 0,05$ vs. W-SED; [#]: $p < 0,05$ vs. W-EX (ANOVA).



DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisado o efeito do treinamento físico aeróbio nas estruturas e funções cardíacas, capacidade antioxidante, matriz extracelular, estresse oxidativo e a atividade das vias MAPKs e NF- κ B de ratos SHR na fase que antecede o desenvolvimento de IC. Essa fase é caracterizada por hipertrofia cardíaca e função sistólica do VE preservada, com acometimento da função diastólica (Pfeffer *et al.*, 1979; Trippodo & Frohlich, 1981). Por essa razão, optou-se por iniciar o treinamento físico com a idade de 13 meses, considerando que por volta de 18 meses de idade os ratos SHR começam a apresentar sinais de IC com evolução fatal em poucos meses (Boluyt & Bing, 2000; Bing *et al.*, 2002).

Para o diagnóstico de IC em estudos experimentais é verificado a presença de taquipneia/dispneia *in vivo*, e/ou *post mortem* como ascite, derrame pleural, trombo em átrios, congestão pulmonar e hipertrofia do VD. No presente estudo, foi observado que ao final de 16 meses de idade grande parte dos animais hipertensos já apresentavam sinais de IC e isso foi atenuado com o protocolo de exercício físico.

Neste estudo foi utilizado o protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade. Para avaliar a capacidade física foi realizado um teste de tolerância ao exercício físico, com aumento gradativo da velocidade até a exaustão dos animais. O teste de esforço mostrou que os grupos exercitados apresentaram melhor capacidade física em relação aos grupos sedentários. O mesmo foi observado por Carneiro-Junior *et al.* (2014) que demonstraram aumento da capacidade física em SHR e relataram que após quatro semanas de destreino a capacidade física se iguala aos animais sedentários. Protocolos semelhantes ao adotado nesse estudo mostraram que o exercício de baixa intensidade também foi eficiente para melhorar a sobrevida de animais hipertensos (Emter *et al.*, 2005; Chicco *et al.*, 2008). Os grupos SHR apresentaram melhor capacidade física que os animais controles. Estudos anteriores mostraram que o SHR é fisicamente mais ativo, apresentando, portanto, melhor capacidade funcional que ratos normotensos (Robinson *et al.*, 2011; Langen *et al.*, 2011).

O treinamento físico aeróbio tem mostrado efeitos benéficos na hipertensão arterial com ação hipotensora (Huang *et al.*, 2012; Locatelli *et al.*, 2017), porém seu efeito na hipertensão não controlada e em estágio avançado

ainda é pouco estudado. Os possíveis mecanismos responsáveis por essa ação hipotensora são: atenuação da atividade nervosa simpática, diminuição da concentração plasmática de noradrenalina e redução da resistência vascular periférica (Brum *et al.*, 2006). No presente trabalho, o protocolo de exercício físico não alterou a pressão arterial sistólica dos animais hipertensos. Em estudo anterior realizado em nossos laboratórios encontramos resultados semelhantes quanto a pressão arterial após o protocolo de treinamento físico (Pagan *et al.*, 2015). O protocolo de exercício utilizado no presente estudo foi de maior intensidade e duração em comparação com o estudo anterior, porém não foi efetivo para alterar a PAS. Outra possível resposta para o exercício não ter alterado a PAS pode estar associado à hipertensão não controlada e de longa evolução.

A avaliação realizada por meio do exame de ecocardiografia tem a finalidade de analisar as estruturas e funções cardíacas e determinar o comprometimento dessas variáveis causadas pela hipertensão não controlada. Anteriormente a realização do protocolo de exercício físico foi realizado ecocardiograma (dados não apresentados) para garantir a distribuição uniforme entre os grupos estudados. Ao final do período experimental, após quatro meses de exercício, novo exame foi realizado. Esses dados mostraram que os grupos hipertensos apresentaram aumento das variáveis estruturais, e comprometimento das funções sistólica e diastólica do VE. A diferença na geometria do VE entre os grupos SHR e W deve-se ao efeito da sobrecarga crônica de pressão arterial no grupo SHR (hipertrofia concêntrica). O exercício físico foi eficiente em diminuir a EDPP, AE, espessura relativa do VE e o TRIV nos animais hipertensos, o que sugere melhora estrutural e da função diastólica do VE. Porém a função sistólica se mostra prejudicada nos grupos hipertensos, pois a velocidade de deslocamento do anel mitral (onda S') e a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior (VEPP) estão diminuídas e a performance miocárdica avaliado pelo Índice de Tei está aumentado. Em estudos com animais hipertensos jovens que tiveram livre acesso a roda de corrida durante seis meses, pesquisadores observaram que esses animais apresentaram hipertrofia cardíaca e dilatação da câmara ventricular, mas com melhora da fração de ejeção (Schreckenber *et al.*, 2017). Por outro lado, Schultz *et al.* (2007) demonstraram que o exercício excessivo a longo prazo em

ratos SHR idosos aumentou o estresse parietal e a massa ventricular esquerda, e reduziu a fração de ejeção do VE, acelerando a progressão da IC. Os dados desses estudos, somados aos nossos dados, sugerem que a intensidade e a duração do protocolo de treinamento físico têm efeitos diretos nas adaptações que ocorrem na geometria e função cardíaca de animais hipertensos. Dessa forma, ressalta a importância da realização de exercícios de forma sistematizada, e que respeite os princípios do treinamento físico, diminuindo assim os possíveis efeitos adversos que podem agravar ainda mais o processo de remodelamento cardíaco induzido pela hipertensão.

Os dados obtidos *post mortem* confirmam os achados ecocardiográficos de hipertrofia do VE nos grupos hipertensos. Os pesos do VE, normalizados pelo peso corporal, estavam aumentados nos grupos hipertensos em relação aos controles normotensos. Foram observados efeitos positivos do exercício em atenuar o peso dos átrios e o conteúdo de água no VE e VD. Esses resultados também demonstram concordância com os dados do ecocardiograma, que apresentaram redução do diâmetro do átrio esquerdo, EDPP e Esp. Rel. VE no grupo SHR-EX em comparação ao SHR-SED.

O estudo da função miocárdica foi realizado por meio de preparações com músculos papilares isolados do VE. A avaliação do músculo papilar isolado é capaz de medir a capacidade do músculo cardíaco em desenvolver força e relaxar, independente das mudanças de carga, frequência cardíaca e geometria da câmara ventricular que podem alterar o desempenho cardíaco *in vivo*. Na análise da condição basal, foi observado melhor desempenho contrátil e de relaxamento do grupo SHR-EX em todas as variáveis em relação ao controle, e na $+dT/dt$ em relação ao SHR-SED. Os grupos SHR apresentaram maior valor de TR e $-dT/dt$ em comparação aos controles, mostrando comprometimento da propriedade passiva do miocárdio e melhor relaxamento nos animais hipertensos. Resultados semelhantes foram observados em estudos prévios em nosso laboratório (Pagan *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2015). Da mesma forma, estudo realizado por Fernandes *et al.* (2015) mostrou que uma única sessão de exercício resistido provocou aumento no desenvolvimento da força isométrica dos músculos papilares isolados de ratos hipertensos.

Com o objetivo de identificar alterações na contração e relaxamento do músculo cardíaco, não observadas em condições basais, foram realizadas manobras inotrópicas. No nosso estudo, os grupos hipertensos apresentaram melhor desempenho nas manobras em comparação aos grupos controles. Os músculos hipertrofiados dos animais hipertensos mostram-se mais eficientes em contrair e relaxar durante as manobras inotrópicas, e essa melhora foi mais evidente no grupo SHR-EX. Já foi descrita na literatura melhora da função miocárdica, tanto em condições normais quanto após manobras inotrópicas, analisada pelo músculo papilar isolado de animais hipertensos e hipertensos treinados (Mill *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2015). Os autores sugerem que na fase compensada da hipertrofia cardíaca a participação do retículo sarcoplasmático no fornecimento de cálcio, responsável por ativar o sistema contrátil, estaria normal ou até mesmo otimizada em relação ao músculo cardíaco sem hipertrofia. Assim, os dados ecocardiográficos e do músculo papilar isolado mostram que o exercício físico gera benefícios estruturais e funcionais no coração de animais hipertensos, que refletem na melhora da capacidade física e na redução de ocorrência de sinais de insuficiência cardíaca.

Com o intuito de analisar o papel da matriz extracelular na disfunção cardíaca observada em nosso estudo, foi avaliada a histologia, expressão proteica dos colágenos I e III, lisil oxidase e TIMPs 1 e 2, concentração de hidroxiprolina e a zimografia de metaloproteinase. Os valores dos diâmetros dos cardiomiócitos confirmam a hipertrofia miocitária já esperada nos animais hipertensos, isso se deve à fase avançada da hipertensão não controlada em que os animais se encontravam. A sobrecarga de pressão, causada pela HAS, estimula vias sinalizadoras intra e extracelulares, que levam a replicação dos sarcômeros em paralelo, resultando no aumento do diâmetro dos miócitos e também induz alterações na matriz colágena intersticial, que podem aumentar a rigidez do músculo (Mann, 2012b; Cohn *et al.*, 2000). O exercício físico também pode gerar hipertrofia cardíaca, porém essa hipertrofia é considerada uma adaptação fisiológica e ocorre de forma simétrica, não produzindo alterações deletérias, comuns nas hipertrofias de natureza patológica (Mill & Vassalo, 2001). Na hipertrofia fisiológica, o aumento dos miócitos se faz pela síntese de componentes

como, aumento das proteínas contráteis, do retículo sarcoplasmático e do número e tamanho das mitocôndrias. Essas alterações estruturais resultantes do treinamento físico dependem da natureza, duração e intensidade do exercício (Ghorayeb & Batlouni, 1998). No entanto, em nosso estudo, o protocolo de exercício físico utilizado não interferiu no diâmetro dos miócitos, que pode estar associado a baixa intensidade do treinamento físico.

Além dos miócitos, o tecido cardíaco também é constituído pela matriz extracelular que incluem colágeno, glicoproteínas, fibras de elastina, entre outros componentes. Essa matriz tem como principal função manter o alinhamento normal dos cardiomiócitos e das fibras musculares através da integração da geometria do colágeno, integrina, citoesqueleto e fibras musculares (Lu *et al.*, 2016). Os colágenos I e III são os mais abundantes na matriz extracelular cardíaca, juntos representam 92% do colágeno cardíaco. A organização desses colágenos assegura a integridade estrutural dos miócitos e é essencial para a manutenção do alinhamento das miofibrilas dentro do miócito através da interação de colágeno e integrinas com as proteínas do citoesqueleto. Os nossos dados da FCI mostraram aumento no SHR-SED em relação ao controle. O fato do grupo SHR-EX não apresentar diferença entre os grupos, W-EX e SHR-SED, e apresentar um valor intermediário, poderia ser associado a um efeito positivo ao exercício. Entretanto, o grupo SHR-EX apresentou maior expressão do colágeno I em relação ao controle, mas sem alterações no colágeno III e da lisil oxidase, e o grupo SHR-SED apresentou maior relação entre os colágenos I e III em comparação ao controle. A rigidez do VE é afetada por alterações na quantidade e qualidade do colágeno miocárdico, ou seja, é dependente da proporção dos tipos de colágeno. O colágeno I é formado de fibras espessas e de grande resistência à tensão. Já o colágeno III é constituído de fibras de pequeno diâmetro e é mais maleável (Brower *et al.*, 2006; López *et al.*, 2009). Assim, alterações no conteúdo e nas proporções de colágeno podem afetar a função do músculo cardíaco, aumentando a rigidez miocárdica (Matsubara *et al.*, 2000, Azevedo *et al.*, 2015). No entanto, maior expressão de colágeno I no grupo SHR-EX não se refletiu nas variáveis ecocardiográficas (onda E, onda A, E/A, E'média, A'média e E/E').

A concentração de colágeno miocárdico também pode ser avaliada pela quantificação de hidroxiprolina, um aminoácido que é o principal componente da molécula de colágeno e presente em pequenas concentrações em um número restrito de outras proteínas (Matsubara *et al.*, 2000). Em nosso estudo, não observamos diferença na concentração de hidroxiprolina miocárdica entre os grupos, demonstrando que o exercício físico e a hipertensão não influenciaram nessa variável.

A quantidade de colágeno e a integridade da matriz extracelular são dependentes de um sistema de regulação que envolve inúmeros fatores, como as metaloproteinases de matriz (MMP) e os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP). As metaloproteinases são endoproteinases dependentes de zinco capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular. Elas são sintetizadas como pró-enzimas latentes ativadas via clivagem (Bellafibre *et al.*, 2013), e coordenam o reparo e reorganização de tecidos, modulando a rede da matriz para regular a adesão, migração, proliferação celular e são essenciais para a remodelação do tecido normal e durante o processo de crescimento (Lu *et al.*, 2016). No entanto, a ativação excessiva de MMP, especialmente as MMP-2 e MMP-9, parecem desempenhar papel fundamental no processo de remodelamento cardíaco (Phatharajaree *et al.*, 2007).

A atuação das MMP pode ser modulada pelos TIMPs, que têm alta afinidade pelas MMPs ativas e bloqueiam seu sítio catalítico. O TIMP-2 é conhecido por se ligar mais efetivamente na MMP-2, enquanto o TIMP-1 tem alta afinidade pela MMP-9 (Gomes *et al.*, 1997). No presente estudo, observou-se aumento da MMP-2 (inativa e intermediária) e TIMP-2 no SHR-SED em relação ao controle, e a MMP-2 foi atenuada no grupo hipertenso exercitado e sem alteração do TIMP-2 em comparação ao SHR-SED. Redução dos níveis de MMP-2 e 9 e de TIMP-1 e 2 no miocárdio de ratos hipertensos sensíveis ao sal foi associado a melhora da hipertrofia cardíaca e da função cardíaca (Ichihara *et al.*, 2006). A atividade da MMP-2 diminuída após 6 semanas de exercício voluntário em ratos Wistar também foi relacionada como mecanismo de proteção contra lesões cardíacas (Pósa *et al.*, 2015). A atenuação da MMP-2 sem alteração dos TIMPs pode ser responsável pelo aumento do colágeno I no grupo SHR-EX, porém não refletiu nas demais variáveis

que avaliaram o conteúdo de colágeno miocárdico. Aumentos de MMP, TIMPs e colágenos I e III estão associados ao desenvolvimento de fibrose em corações com IC (Polyakova *et al.*, 2011). O aumento da maioria das variáveis relacionadas com a avaliação da matriz extracelular (FCI, colágeno I/colágeno III, MMP-2, TIMP-2) no grupo SHR-SED poderia estar associada ao aumento de fibrose, que pode afetar a rigidez do miocárdio, contribuindo para o desenvolvimento de disfunção diastólica e sistólica. Isso corrobora com o achado de maior frequência de sinais de IC nos animais SHR-SED. O fato do grupo SHR-EX não apresentar todas essas alterações nos componentes da matriz extracelular pode estar associado à atenuação da fibrose miocárdica e justificar a melhora estrutural e funcional.

O estresse oxidativo também tem sido relacionado com a fisiopatologia da hipertensão arterial, pois o desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio é elemento importante de comprometimento vascular, levando a elevação da pressão arterial (Touyz, 2004). Como marcadores do estresse oxidativo, foram realizadas análises do malondialdeído e hidroperóxido de lipídeo. Os grupos hipertensos apresentaram aumento da produção do hidroperóxido de lipídeo que não se alterou com o exercício físico. Assim como a peroxidação lipídica, o complexo NADPH oxidase constitui também uma importante fonte de geração de ERO (Xu *et al.*, 2010). A atividade da NADPH oxidase não apresentou diferença entre os grupos, sugerindo que a atividade dessa enzima, em nosso estudo, não esteja contribuindo para o aumento da produção de EROs, e que outras possíveis fontes produtoras de EROs estejam envolvidas.

A produção de radicais livres durante os processos metabólicos resulta na ativação de mecanismos de defesa antioxidante. No presente estudo, a capacidade antioxidante foi avaliada pela atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Foi observada melhora da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no grupo SHR treinado. Isso mostra que o exercício foi benéfico para a capacidade antioxidante do miocárdio, porém o aumento da catalase e da glutathione peroxidase não foi efetivo em reduzir o hidroperóxido de lipídeo no grupo SHR-EX. No entanto, estudos anteriores mostram melhora do estresse oxidativo em animais hipertensos treinados, com aumento da capacidade

antioxidante e redução da peroxidação lipídica (Bertagnolli *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2016). Sabe-se que uma única sessão de exercício físico induz a formação de ERO, porém quando o estímulo passa a ser crônico, como no treinamento físico, provocam adaptações que melhoram a resistência a ERO e aumentam a defesa antioxidante (Fisher-Wellman *et al.*, 2009).

O aumento do estresse oxidativo promove ativação da via de sinalização das MAPK, que está envolvida no processo de hipertrofia cardíaca e IC. Essa via é ativada também por estímulos extracelulares, como angiotensina II, endotelina 1, noradrenalina e fator de crescimento, com consequente indução de mudanças intracelulares, promovendo crescimento, apoptose e transformação celular (Marber *et al.*, 2011). Em nosso estudo, além do hidróperóxido de lipídeo, é possível que existam outros estímulos que podem estar ativando a via das MAPK nos grupos hipertensos, como a atividade do sistema nervoso simpático, que é aumentada nesse modelo, e o estresse de parede, devido aumento da pós-carga (Cesaretti *et al.*, 2006; Richer *et al.*, 1997). As principais kinases dessa via são ERK, JNK e p38 (Wang, 2007). A ERK catalisa a fosforilação de fatores de transcrição que estimula a síntese de proteína e crescimento celular, já a JNK e a p38 estão envolvidas no processo apoptótico, na síntese de citocinas inflamatórias e fibrose (Zhang *et al.*, 2003).

Nossos dados mostram aumento da fosforilação da JNK, da p38 total e da ERK fosforilada e total no grupo hipertenso sedentário. No grupo SHR-EX, houve restauração da ERK fosforilada e total, atenuação da p38 e aumento da JNK fosforilada. Behr *et al.* (2001) relataram que o bloqueio da atividade da p38 está associado a redução da hipertrofia e da disfunção do VE em animais SHR. Zhang *et al.* (2003) sugerem que a ERK pode mediar a resposta hipertrófica, assim como a JNK e a p38 devido a ação na via de proliferação celular e apoptose. Além disso, fato interessante é que a ERK pode mediar o aumento da produção das MMPs induzida por diferentes estímulos (Ichihara *et al.*, 2006; Huntington *et al.*, 2004). Nossos dados corroboram com esses achados, mostrando aumento da ERK e da MMP-2 no grupo SHR-SED, e a normalização da ERK no grupo SHR-EX foi acompanhado pela atenuação da atividade da MMP-2.

No nosso estudo, parecem existir outros mediadores da sinalização hipertrófica que podem estar envolvidos no crescimento dos cardiomiócitos além das proteínas da via das MAPK, uma vez que o grupo SHR exercitado apresenta atenuação dessa via, mas apresenta diâmetro dos miócitos aumentados da mesma forma que o SHR-SED. Nota-se que a via de sinalização das MAPK está ligada aos mecanismos responsáveis pelas alterações que ocorrem no músculo cardíaco durante processos inflamatórios e/ou estímulos como o exercício físico. Essas descobertas podem ser importantes para entender como o exercício pode ter efeito cardioprotetor.

O NF- κ B é uma proteína de transcrição com regiões de ligação ao DNA que está envolvido na regulação de genes da cascata inflamatória (Mayo *et al.*, 1997). O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 e p50. Quando não estimulado o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. A fosforilação do I κ B libera o NF- κ B de forma que ele possa atuar sobre um gene alvo no núcleo enquanto o I κ B é degradado (Baeuerle *et al.*, 1998). Os nossos dados mostram que a subunidade p65 não foi diferente entre os grupos, e que o I κ B total está aumentado nos grupos hipertensos sem influência do exercício físico. Esse aumento do I κ B normalizou a expressão da subunidade p65 nos grupos hipertensos. O aumento do I κ B nos grupos hipertensos pode ser uma tentativa de inibir a ativação de genes envolvidos nos processos inflamatórios e hipertróficos. O NF- κ B pode ser ativado pelas proteínas das MAPK (ERK e p38) porém, em nossos dados, o aumento dessas proteínas no grupo SHR-SED não interferiu na ativação do NF- κ B.

O processo de remodelamento cardíaco decorrente da sobrecarga de pressão a longo prazo traz prejuízos funcionais ao coração. Esse processo é complexo e envolve diferentes mecanismos e vias de sinalização. No entanto, o remodelamento cardíaco pode ser atenuado pelo exercício físico, como demonstrado por Locatelli *et al.* (2017). Esses autores relatam que ratos hipertensos apresentaram atenuação do remodelamento adverso do VE, melhora da eficiência da contração e diminuição da pressão arterial após seis semanas de natação de baixa intensidade. Da mesma forma, Giannuzzi *et al.* (2003) observaram

melhora do remodelamento cardíaco patológico do VE e melhora da qualidade de vida de pacientes com IC. Esses achados reforçam a importância e a relevância clínica do exercício físico como terapia não farmacológica para o remodelamento cardíaco.

Em resumo, a melhora de alguns parâmetros estruturais cardíacos e da função miocárdica observada no grupo SHR-EX, pode estar associada à redução da expressão da p38, ERK e da ERK fosforilada, atenuação da atividade da MMP-2 e atenuação da fibrose cardíaca assim como o aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. O mau funcionamento dessas vias está relacionado à hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose, disfunção contrátil e inflamação. Estes processos contribuem para o dano no músculo cardíaco com consequente remodelamento cardíaco. Os nossos achados demonstram resposta adaptativa positiva ao treinamento físico no remodelamento cardíaco dos animais hipertensos na fase que antecede o desenvolvimento de IC.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o exercício físico em ratos espontaneamente hipertensos atenua o remodelamento cardíaco que está associado à melhora da tolerância ao esforço físico e redução da frequência de sinais de insuficiência cardíaca. Além disso, associa-se ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes, atenuação da expressão proteica da ERK total e diminuição da fosforilação da ERK e da atividade da MMP-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation*. 2005;112:3115-3121.
- Albuquerque DC, Souza Neto JD, Bacal F, Rohde LEP, Bernardez-Pereira S, Berwanger O, *et al*. I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical aspects, care quality and hospitalization outcomes. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104:433-442.
- Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Remodelação cardíaca: conceitos, impacto clínico, mecanismos fisiopatológicos e tratamento farmacológico. *Arq Bras Cardiol*. 2015;106:62-69.
- Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: A specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. 1988;242:540-546.
- Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH, Coatney RW, Woods TN, Sulpizio A. Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation*. 2001;104:1292-1298.
- Bellafore M, Battaglia G, Bianco A, Farina F, Palma A, Paoli A. The involvement of MMP-2 and MMP-9 in heart exercise-related angiogenesis. *J Transl Med*. 2013;11:283.
- Bertaglia RS, Reissler J, Lopes FS, Cavalcante WL, Carani FR, Padovani CR, *et al*. Differential morphofunctional characteristics and gene expression in fast and slow muscle of rats with monocrotaline-induced heart failure. *J Mol Histol*. 2011;42:205-215.
- Bertagnoli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Bello-Klein A, *et al*. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008;21:1188-1193.
- Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, *et al*. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:383-396.

Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev.* 2002;7:71-88.

Boluyt MO, Bing OH. Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model. *Cardiovasc Res.* 2000;46:239-249.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, *et al.* The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30:604-610.

Brum PC, Rondon MUPB, Silva GJJ, Krieger EM. Hipertensão arterial e exercício físico aeróbio. In: Negrão CE, Barretto ACP. *Cardiologia do Exercício - Do atleta ao cardiopata*. 2ª ed. Barueri: Manole, 2006. p. 173-184.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-310.

Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Amadeu MA, *et al.* Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47: 960-965.

Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: Lições Aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:190-197.

Cezar MD, Damatto RL, Pagan LU, Lima AR, Martinez PF, Bonomo C, *et al.* Early spironolactone treatment attenuates heart failure development by improving myocardial function and reducing fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36:1453-1466.

Cezar MDM, Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Campos DHS, Rosa CM, *et al.* Aldosterone blockade reduces mortality without changing cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32:1275-1287.

Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, *et al.* Low intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension.* 2008;51:1096-1102.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci.* 2000;320:244-248.

Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OH. Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of the heart hypertrophy to failure. *Arq Bras Cardiol.* 1997;69:381-384.

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;35:569-582.

Costa Rebelo RM, Schreckenber R, Schluter KD. Adverse cardiac remodelling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity *J Physiol.* 2012;21:5389-5400.

Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 2001;89:201-210.

Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2011;123:327-334.

Dunn FG. Left ventricular hypertrophy in hypertension. *N Engl J Med.* 1999;340:1279-1280.

Emter CA, McCune SA, Sparagna GC, Radin MJ, Moore RL. Low-intensity training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2030-H2038.

Fernandes AA, Faria TO, Ribeiro Júnior RF, Costa GP, Marchezini B, Silveira EA, *et al.* A single resistance exercise session improves myocardial contractility in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Re.* 2015;48:813-821.

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;34:760-765.

Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol.* 2002;282:H1327-H1333.

Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med.* 2009;8:1.

Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8:125-142.

Garg S, Drazner MH. Refining the classification of left ventricular hypertrophy to provide new insights into the progression from hypertension to heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 2016;31:387-393.

Giannuzzi P, Temporelli PL, Corrà U, Tavazzi L. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure - results of the exercise in left ventricular dysfunction and chronic heart failure (ELVD-CHF) Trial. *Circulation.* 2003;108:554-559.

Ghorayeb, N., Batlouni, M. Hipertrofia ventricular: mecanismos envolvidos na indução e possibilidade de regressão. *Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo*, 1998; 8:298-301.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, *et al.* American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129:e28-e292.

- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:111-122.
- Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res.* 2003;23:911-919.
- Huang CY, Yang AL, Lin YM, Wu FN, Lin JA, Chan YS, *et al.* Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. *J Appl Physiol.* 2012;112: 883-891.
- Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt CA, Benbow U, Slingluff Jr CL, *et al.* Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells. *J Biol Chem.* 2004;279:33168-33176.
- Ichihara S, Noda A, Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara G, *et al.* Pravastatin increases survival and suppresses an increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure. *Cardiovasc Res.* 2006;69:726-735.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26:853-856.
- Langen B, Dost R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2011;3:1-12.
- 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.
- 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;187:42-49.

- López B, Querejeta R, González A, Beaumont J, Larman M, Díez J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension*. 2009;53:236-242.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
- Lu J, Hao J, Du H, Xiao B, Li Y, Yang X, *et al*. Amlodipine and atorvastatin improved hypertensive cardiac remodeling through regulation of MMPs/TIMPs in SHR rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39:47-60.
- Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012. p. 487-504.
- Marber MS, Rose B, Wang Y. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway—A potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:485-490.
- Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, Oliveira SA Jr, Damatto RL, Cezar MDM, *et al*. Modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways by antioxidante therapy in skeletal muscle of heart failure rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39:371-384.
- Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1534-1539.
- Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ, *et al*. Requirement of NF κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*. 1997;278:1812-1815.
- Meerson FZ. Development of modern components of the cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1974;35 suppl. II:58-63.
- Mill JG, Novaes MAS, Galon M, Nogueira JB, Vassallo DV. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous

hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76:387-394.

Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8:63-75.

Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, *et al*. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:325-330.

Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, *et al*. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22:1353-1364.

Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Dal Pai-Silva M, Gut AL, Padovani CR, *et al*. Myocardial remodeling and dysfunction are induced by chronic food restriction in spontaneously rats. *Nutr Res*. 2006;26:567-572.

Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Bonomo C, Campos DHS, *et al*. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:61-74.

Palma RK, Moraes-Silva IC, Dias DS, Shimojo GL, Conti FF, Bernardes N, *et al*. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *J Appl Physiol*. 2016;121:1032-1038.

Panza, JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein E. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323:22-27.

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;78:957-962.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237:H461-468.

Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction. *Can J Cardiol.* 2007;23:727-733.

Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, *et al.* Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol.* 2011;151:18-33.

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka. Cardioprotective Effects of Voluntary Exercise in a Rat Model: Role of Matrix Metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 805-876.

Richer C, Vacher E, Fornes P, Giudicelli JF. Antihypertensive drugs in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens.* 1997;19:925-936.

Robinson AM, Hopkins ME, Bucci DJ. Effects of physical exercise on ADHD-like behavior in male and female adolescent spontaneously hypertensive rats. *Dev Psychobiol.* 2011;53:383-390.

Rosa CM, Gimenes R, Campos DHS, Guirado GN, Gimenes C, Fernandes AAH, *et al.* Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:126.

Rossoni LV, Oliveira RAF, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, *et al.* Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011;29:2349-2358.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58:1072-1083.

Schenk S, Horowitz JF. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2007;117:1690-1698.

- Schreckenber R, Horn A-M, da Costa Rebelo RM, Simsekyilmaz S, Niemann B, Li L, *et al.* Effects of 6-months' exercise on cardiac function, structure and metabolism in female hypertensive rats - the decisive role of lysyl oxidase and collagen III. *Front Physiol.* 2017;8:556.
- 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;50:410-416.
- Smart N, Haluska B, Jeffriess L, Marwick TH. Exercise training in systolic and diastolic dysfunction: effects on cardiac function, functional capacity, and quality of life. *Am Heart J.* 2007;153:530-536.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol.* 2017;107 supl. 3:1-103.
- Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002;90:520-530.
- Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res.* 1998;82:482-495.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88 supl.1:1-19.
- Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem.* 1993;26:191-198.
- 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;10:169-178.

- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44:248-252.
- Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension man and rat. *Circ Res*. 1981;48:309-319.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;30:2181-2190.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Goulart MAM, Gomes ACM. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. *Rev Bras Hipertens*. 2007;14:269-274.
- 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;22:1477-1484.
- Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*. 2007;116:1413-1423.
- Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42:346-354.
- Zhang W, Elimban V, Nijjar MS, Gupta SK, Dhalla NS. Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Exp Clin Cardio*. 2003;8:173-183.
- Zannad F, Rossignol P, Iraqi W. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2010;15:319-329.