UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

RENAN FLORET TURINI CLARO

AVALIAÇÃO DA NETOSE COMO MODULADORA DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Leonardo Antônio Mamede Zornoff
Coorientadora: Dra. Tatiana Fernanda Bachiega Pinelli

Botucatu
2019

RENAN FLORET TURINI CLARO

AVALIAÇÃO DA NETOSE COMO MODULADORA DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Leonardo Antônio Mamede Zornoff
Coorientadora: Dra. Tatiana Fernanda Bachiega Pinelli

Botucatu
2019

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

Claro, Renan Floret Turini.
Avaliação da netose como moduladora dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo exercício físico crônico / Renan Floret Turini Claro. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Leonardo Antônio Mamede Zornoff
Coorientador: Tatiana Fernanda Bachiega Pinelli
Capes: 40101002

1. Exercícios físicos. 2. Morte celular. 3. Remodelação ventricular.

Palavras-chave: exercício físico ; netose; remodelação cardíaca.

DEDICATÓRIA

À minha esposa querida esposa e companheira de vida CARLA, pela paciência e amor com que se dedicou à família na minha ausência.

Ao meu tão desejado e amado filho GABRIEL, que esses dias de lutas e superações sejam exemplos para suas condutas durante a vida.

Aos meus pais NORIVAL e RUTH por toda a sua dedicação em me fornecer além de condições para me desenvolver, lições de vida que serão levadas a diante.

Para meu irmão RODRIGO, amigo e companheiro, que possa seguir o caminho do saber e desenvolver a ciência da Educação Física.

Aos meus avós RUTH (*in memoriam*), OSMAR (*in memoriam*) e LIDIA (*in memoriam*), por terem sido fundamentais na minha formação e, mesmo distantes continuam me influenciando pela conduta honesta e digna. Minha mais absoluta reverência.

Aos meus sogros PAULO e MARIA HELENA, pelo apoio e dedicação em auxiliar nos afazeres diários, preenchendo a ausência que deixei para me dedicar ao trabalho.

Á toda minha família que é exemplo de união e amizade.

Aos amigos e aos colegas de docência na Faculdade de Educação Física das Faculdades Integradas de Jaú, meus mais profundos agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Á DEUS por proporcionar constantemente a essência que me guia pelos caminhos desta vida.

Aos meus amigos de laboratório Renata Cândido, Bruna Letícia, Priscila Portugal, Tatiana Bachiega, Amanda Della Coletta e Amanda Menezes que prontamente me ajudaram na realização deste trabalho e pelos vários momentos que passamos juntos. Vocês foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Katashi Okoshi pela realização das avaliações ecocardiográficas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio A. R. Paiva e Profa. Bertha Furlan Polegato, pela participação na banca de qualificação deste trabalho e pelos apontamentos realizados, esses fizeram a diferença na minha formação.

Ao Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci pelo pronto acompanhamento durante todo o processo de formação no doutoramento.

À Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiola pelo apoio e disponibilidade em ajudar em minha evolução acadêmica.

Aos funcionários da UNIPEX que me auxiliaram nos procedimentos durante o período de execução do trabalho: Mário Bruno (*in memoriam*), José Carlos Georgete, Sandra Fábio, Sueli Clara, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Aparecido de Souza, Elizangela Silva, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Andrade Câmara, Mario Augusto Dallaqua e Diego Generoso.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação que sempre foram solícitos às necessidades: Regina Spadin, Lílian Nunes, Andréa Devidé, Janete Nunes Silva e Nathanael Salles.

Às bibliotecárias Meire e Élida, pelo auxílio na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Titular Leonardo Antônio Mamede Zornoff pela competência, tranquilidade e sabedoria durante a orientação deste trabalho. Pela maestria em conduzir os ensinamentos, oferecendo oportunidade para que pudesse desbravar as entrelinhas da ciência. Este é minha referência na docência.

À Profa. Dra. Tatiana Fernanda Bachiega Pinelli pela participação na coautoria e coorientação dessa tese. Também pela brilhante apresentação de tema distinto e inovador na área da medicina e da educação física.

Ao Prof. Dr. Gustavo Ribeiro da Mota pela amizade, pelo exemplo profissional, por dividir seus conhecimentos de vida e por prontamente aceitar o convite para participar da banca de defesa deste trabalho.

EPÍGRAFE

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

Santo Agostinho

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – átrio esquedo

AERO – Grupo de animais submetidos ao treinamento aeróbio

ANCA – anticorpos contra citoplasma de neutrófilos

AO – Artéria Aorta

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

EROS – Espécies reativas de oxigênio

EF – exercício físico

FC – freqüência cardíaca

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

HIIT – High Intensity Interval Training

INF- γ – Interferon Gama

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-17 – Interleucina 17

LPS – Ligopolissacarídeo

MPO - mieoloperoxidade

NET – *Neutrophil Extracellular Traps*

OVER – Grupo de animais submetidos ao sobretreino (*overtraining*)

PAD4 – peptidil arginina deiminase

PC – peso corporal do rato

PMA - forbol-12-miristato-13-acetato

PR3 – proteinase 3

SED – Grupo de animais sedentários

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

$\dot{V}O_2$ – Volume de oxigênio

$\dot{V}O2$ Máx. – Volume Máximo de Oxigênio

SUMÁRIO

Sumário

Resumo ii
Abstract..... iv
1.INTRODUÇÃO 22
2.HIPÓTESE.....30
3.OBJETIVO...….....32
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 34
4.1. Delineamento Experimental.....34
4.2. Protocolo de Exercício Físico..... 35
4.3. Análise do Consumo Máximo de Oxigênio.....37
4.4. Estudo Ecocardiográfico.....41
4.5. Coleta de Material Biológico.....42
4.6. Avaliação das NETs.....43
4.7. Análise Estatística.....44
5. RESULTADOS.....46
5.1. Peso Corporal.....46
5.2. Consumo Máximo de Oxigênio.....48
5.3. Velocidade e Volume de Treinamento.....53
5.4. Ecocardiograma.....54
5.5. Peso dos Órgãos.....57
5.6. Quantificação das NETs.....58
6. DISCUSSÃO.....60
7. CONCLUSÃO..... 68
8. REFERÊNCIAS..... 70

RESUMO

RESUMO

A prática do exercício físico regular agrega inúmeros benefícios à saúde, principalmente ao sistema cardiovascular, em que se observa por exemplo o aumento da função contrátil do músculo cardíaco. Porém, a intensidade do exercício pode atuar como um estressor múltiplo, atingindo diretamente o metabolismo energético, oxidativo, neuro-hormonal, térmico e mecânico. Essas alterações resultam na mobilização e ativação de leucócitos, proteínas de fase aguda, bem como alterações na via fibrinolítica e cascata de coagulação. Em resposta às agressões causadas por infecções, respostas inflamatórias e estímulos fisiológicos como o exercício físico agudo, os neutrófilos realizam processo de morte celular chamado netose. Recentemente, a netose foi descrita, a princípio como terceira estratégia (juntamente da fagocitose e degranulação) de morte e controle de patógenos. Sua principal formação são as NETs (*neutrophil extracellular traps*), que são estruturas em formatos de fios, compostas por material citoplasmático e nuclear que são lançadas de maneira coordenada e programada para o meio extracelular. Considerando que as NETs podem estar envolvidas em efeitos deletérios e fisiológicos em diferentes sistemas, recentemente, trabalho pioneiro indicou que o exercício físico agudo extenuante de natação foi acompanhado por aumento de NETs. No entanto, os efeitos do exercício crônico e agudo em outra modalidade, com utilização de diferentes intensidades no processo da netose ainda não são conhecidos. Assim, este trabalho utilizou quatro protocolos de prescrição de corrida em esteira rolante em ratos, sendo eles: exercício físico agudo (AGUDO), exercício aeróbio (AERO), exercício intervalado de alta intensidade ou *High Intensity Interval Training* (HIIT), sobretreinamento ou *overtraining* (OVER) e grupo controle sedentário (SED). O tempo de exposição ao exercício físico foi de três meses para grupos submetidos ao processo de treinamento, com frequência de sessões de cinco vezes por semana. Os controles de intensidade do treinamento foram realizados por meio da velocidade correspondente ao percentual do consume máximo de oxigênio. Nas análises das medidas corporais dos animais, foi encontrada diferença significativa no peso final entre os grupos HIIT e AERO. Em relação ao consumo máximo de oxigênio no final do processo de treinamento, o grupo submetido ao treinamento intervalado de alta intensidade foi maior em comparação aos grupos AERO, AGUDO e SED. Na quantificação das NETs, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Como conclusão, o trabalho apresentou alterações de condicionamento físico dos animais condizentes com as expectativas do processo de treinamento, inclusive com modificações funcionais cardíacas. Porém, a prática da corrida, tanto em efeitos agudos como crônicos, não demonstrou diferença na produção de NETs.

ABSTRACT

ASTRACT

The practice of regular physical exercise adds numerous health benefits, mainly to the cardiovascular system, in which, for example, there is an increase in the contractile function of the heart muscle. However, exercise intensity can act as a multiple stressor, directly affecting energy, oxidative, neurohormonal, thermal and mechanical metabolism. These changes result in mobilization and activation of leukocytes, acute phase proteins, as well as changes in the fibrinolytic pathway and coagulation cascade. In response to the aggressions caused by infections, inflammatory responses and physiological stimuli such as acute physical exercise, neutrophils perform the process of cell death called netosis. Recently, netose has been described, initially as a third strategy (along with phagocytosis and degranulation) of death and pathogen control. Its main formation is the NETs (neutrophil extracellular traps), which are structures in yarn formats, composed of cytoplasmic and nuclear material that are released in a coordinated and programmed way into the extracellular environment. Considering that NETs may be involved in deleterious and physiological effects in different systems, recently, pioneering work indicated that strenuous acute physical exercise of swimming was accompanied by increased NETs. However, the effects of chronic and acute exercise in another modality, using different intensities in the netose process, are not yet known. Thus, this work utilized four treadmill running prescription protocols in rats: acute physical exercise (ACUTE), aerobic exercise (AERO), high intensity interval exercise or High Intensity Interval Training (HIIT), overtraining or overtraining (OVER) and sedentary control group (SED). The physical exercise exposure time was three months for groups submitted to the training process, with frequency of sessions five times a week. The training intensity controls were performed by means of the velocity corresponding to the percentage of the maximum oxygen consumption. In the analysis of the body measurements of the animals, a significant difference was found in the final weight between the HIIT and AERO groups. Regarding the maximum oxygen consumption at the end of the training process, the group submitted to the high intensity interval training was larger in comparison to the AERO, ACUTE and SED groups. In the quantification of NETs, no significant differences were found between groups. In conclusion, the work presented alterations in the physical condition of the animals according to the expectations of the training process, including with cardiac functional modifications. However, the practice of running, in both acute and chronic effects, showed no difference in the production of NETs.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos analisaram os efeitos do exercício físico no sistema cardiovascular. Em situações de função ventricular normal ou de disfunção ventricular, essa prática está associada ao aumento da: frequência cardíaca máxima, volume sistólico, débito cardíaco e enchimento diastólico do ventrículo esquerdo. Adicionalmente, também resultou em aumento do fluxo sanguíneo pela angiogênese e melhora do metabolismo oxidativo do músculo esquelético[1-3].

Aspecto relevante a ser considerado é que os benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular não se restringem apenas aos efeitos hemodinâmicos. O exercício físico atua no sistema nervoso autônomo, diminuindo a atividade simpática, com aumento da atividade parassimpática[4]. Atualmente, se aceita que as citocinas inflamatórias desempenham papel fisiopatológico na progressão da insuficiência cardíaca. Nessas condições, a atividade física reduz os níveis plasmáticos dessas citocinas como, por exemplo, o TNF-α e a interleucina 6[2]. Em consequência das ações citadas anteriormente, pacientes com insuficiência cardíaca submetidos à sessões de exercícios físicos, apresentam melhor qualidade de vida, com diminuição de hospitalizações cardiovasculares.

Em relação aos efeitos do exercício físico, com variações de intensidades como o de *endurance*, sobre as variáveis funcionais e morfológicas cardíacas, estudos em animais mostraram que o treinamento físico aumentou os índices de função contrátil, em situações in vivo, em preparações com músculo papilar isolado e em estudos com coração isolado de ratos[3,5,6]. Do mesmo modo, em humanos, o exercício induziu processo de hipertrofia cardíaca, com aumento das cavidades cardíacas, acompanhado de melhora de parâmetros funcionais, caracterizando

adaptação fisiológica ao treinamento físico[7].

Assim, os benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular são bastante consistentes. Por outro lado, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesses efeitos benéficos não estão completamente esclarecidos.

Nos últimos anos, no entanto, evidências sugerem que o exercício físico, quando praticado em alta intensidade, pode resultar em efeitos deletérios para o coração [8].

O sistema imunológico também está envolvido em reposta aos estímulos provocados pelo exercício físico. A intensidade, duração e frequência do exercício físico são variáveis que interferem na organização da defesa orgânica sistêmica [9].

Nesse contexto inclui-se respostas específicas durante a realização do esforço muscular e logo após seu término (efeito agudo). E também as respostas adaptativas crônicas que ocorrem após período de treinamento, que são responsáveis pelo tráfego, atividade e função de leucócitos em sítios inflamatórios [9].

Assim, a prescrição sobre a carga utilizada, com efeito na intensidade percebida no exercício físico, é fundamental no desfecho relacionado à redistribuição pós-exercício de leucócitos e organização da defesa celular [10]. Em situações de exercícios de alta intensidade (como os exercícios resistidos) foram descritas neutrofilia aguda [11,12], monocitose e linfocitose [13,14].

Além disso, respostas referentes à circulação de leucócitos são reguladas pela carga utilizada no estímulo que envolve o exercício físico, de forma análoga aos estímulos de predominância aeróbia [9,11].

Por outro lado, sinalizações imunológicas realizadas via produção de citocinas anti e pró inflamatórias, como as interleucinas, são oriundas da alteração encontrada

na população de neutrófilos [15]. Embora os mecanismos envolvidos desse fenômeno não estejam esclarecidos, mas, conforme comentado anteriormente, o papel da inflamação não pode ser descartado. Neste caso, aspecto importante a ser considerado é que um dos principais moduladores do processo inflamatório é o neutrófilo.

Os neutrófilos constituem cerca de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes na corrente sanguínea e são recrutadas para o sítio de infecção por sinais quimiotáticos. Inicialmente, através de interações transitórias entre moléculas de adesão da família das selectinas (presentes em células endoteliais e neutrófilos) ocorre o rolamento pela parede do vaso sanguíneo adjacente ao sítio de inflamação. Após firme adesão, os neutrófilos realizam a diapedese, processo pelo qual migram entre as células endoteliais para alcançar o sítio de infecção extravascular em que ocorrerá a resposta[16].

Após o contato com o patógeno, os neutrófilos podem fagocitar os microrganismos, que são aprisionados dentro destas células em vesículas chamadas fagossomos. Posteriormente, os grânulos intracelulares se fundem ao fagossomo, dando origem aos fagolisossomos, estruturas nas quais os patógenos são mortos pela combinação de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio[16].

No mecanismo dependente de oxigênio, a enzima NADPH-oxidase localizada na membrana e citoplasma celular se liga à membrana fagossomal e transfere elétrons ao oxigênio molecular, o que resulta na formação do ânion superóxido (O_2^-). O superóxido é decomposto através da enzima superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode atuar como substrato para ação da mieloperoxidase (MPO) que culmina na produção de ácido hipocloroso (HClO), o

mais importante composto oxidante com função bactericida dos neutrófilos[17]. Assim, o estresse oxidativo parece ser importante modulador da resposta inflamatória.

O mecanismo independente de oxigênio consiste na descarga direta do conteúdo dos grânulos presentes nestas células. Os grânulos primários, secundários e terciários possuem proteínas com funções microbicidas tais como: lactoferrina, lipocalina, lisozima, metaloproteinases, α-defensina, catepsina G, mieloperoxidase entre outras[17].

No ano de 2004, foi descrito por Brinkmann e colaboradores uma terceira função efetora de neutrófilos contra microrganismos. Esta nova estratégia se refere a capacidade dos neutrófilos lançarem redes extracelulares compostas por proteínas derivadas do citoplasma celular, e surpreendentemente, por DNA. O mecanismo de extrusão destas redes foi denominado NETose, e as redes em si, NETs (neutrophil extracelular traps). As NETs são estruturas complexas, compostas por milhares de filamentos de aproximadamente 15nm de diâmetro que se entrelaçam formando redes extracelulares[18]. Vários estímulos são capazes de induzir a liberação das NETs, entre eles citocinas como IL-8, IFN-γ, GM-CSF; PMA, LPS, *Mycobacteruim tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Leishmania amazonesis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* entre outros de uma lista crescente de indutores de NETs. Sabe-se que apenas um terço dos neutrófilos é capaz de lançar mão desta estratégia e sugere-se o envolvimento de receptores como os do tipo Toll, Fc e citocinas nesta via de ativação [12]. A formação das NETs aparenta ser uma nova forma de morte celular ativa que difere em muitos aspectos da necrose bem como da apoptose[18-20].

No processo de formação das NETs, um ponto de concordância entre os trabalhos é a importância da descondensação da cromatina devido a ação da enzima

peptidil arginina deiminase 4 (PAD4). A conversão de resíduos de arginina em citrulina no núcleo celular elimina a sua carga positiva, contribuindo para a destruição da ligação iônica entre o DNA e as histonas e permite que estas estruturas se dispersem para a formação das NETs[18].

Outro aspecto relevante é que as NETs podem funcionar como promotoras de doenças. Nesse sentido, muitas moléculas presentes nas NETs, tais como mieloperoxidase, histonas e DNA representam auto-antígenos em doenças autoimunes sistêmicas.

Em vasculites, muitos pacientes desenvolvem anticorpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA), os quais apresentam reatividade específica contra os marcadores moleculares desta doença: proteinase 3 (PR3) e MPO, constituintes das NETs. Sabe-se que durante a netose, há liberação de IL-17 por neutrófilos e mastócitos, e esta citocina é um fator chave para o desenvolvimento de psoríase [21], fato que correlaciona o desenvolvimento da doença e produção de NETs. Evidências indicam o desbalanço entre produção/degradação de NETs em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, sendo que a produção aberrante de NETs é responsável pelos danos teciduais e produção de auto antígenos [22]. A síndrome de *Felty* é uma doença autoimune caracterizada pela presença de artrite reumatóide, esplenomegalia e neutropenia. Nesta doença, auto anticorpos contra histonas deiminadas por PAD4 são marcadores moleculares, o que também relaciona a presença de NETs com a síndrome [23]. Também foi apresentada recentemente a ligação das NETs com processos metastáticos no câncer pulmonar por meio do equilíbrio redox do plasma como regulador endógeno da netose e das metástases com origem no tecido pulmonar[24]. As NETs, quando presentes em vasos sanguíneos podem representar

estímulo para a formação de trombos por promover adesão de hemácias à estas estruturas e concentrar proteínas e fatores envolvidos na coagulação.

Em exercício físico, a prescrição de variáveis como a intensidade e a duração das sessões que compõe o processo de treinamento ou um único estímulo tem um importante impacto sobre respostas imunes inatas e adaptativas. O número de linfócitos no sangue é influenciado pela intensidade do esforço, no mesmo momento que a duração do exercício exerce influência sobre o número de neutrófilos e na contagem total de leucócitos. Assim, a linfocitopenia é maior após estímulo de alta intensidade. Nessa sequência, a intensidade do exercício aumenta a contagem de monócitos durante a realização e após a realização de esforço prolongado. A atividade das células NK não sofre alteração com exercício agudo em intensidade mais amenas, porém aumenta quando o esforço é realizado de forma intensa e prolongada. Alterações na função das células T após exercício agudo parecem ser proporcional à intensidade e duração do exercício[25-31].

Os neutrófilos por sua vez, são mobilizados com estímulos físicos sendo a netose resultante do esforço de alta intensidade[25]. Também é possível notar que durante os estágios iniciais da recuperação após a sessão de exercício (dentro de 30 a 60 minutos após o exercício), ocorre neutrofilia sustentada (elevada contagem de neutrófilos no sangue). Desta maneira, o exercício agudo de intensidade moderada, embora aumente a quimiotaxia de neutrófilos, não contribui para sua capacidade de aderir ao endotélio (primeiro passo na migração de neutrófilos para locais de lesão ou infecção). Em conjunto com a netose, são encontradas atividades fagocitária e de degranulação[32].

Considerando que as NETs podem estar envolvidas em efeitos deletérios ou

fisiológicos em diferentes sistemas, recentemente, trabalho pioneiro indicou que o exercício físico agudo e extenuante foi acompanhado por aumento de NETs[25]. No entanto, os efeitos do exercício crônico, de diferentes intensidades, no processo de netose não são conhecidos.

2. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é de que os efeitos crônicos da exposição ao exercício com utilização do método intervalado de alta intensidade e sobretreino são responsáveis por influenciar o processo de netose e provocar repercussões cardíacas.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos cardiovasculares do processo de sobretreino e do exercício físico realizado em baixa, moderada e alta intensidades e relacionar esses efeitos com a netose, em modelo experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu e está aprovado sob o processo 1139-2015 conforme com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados para esse experimento 60 ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g no início do processo de treinamento. Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da USP. Esses foram mantidos em gaiolas para recuperação individual, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, com controle de luz (ciclos de 12 horas) com adaptação de duas semanas antes do início do protocolo, de temperatura (aproximadamente 25º C) e de umidade. O espaço utilizado para acomodação das caixas individuais foi disponibilizado de forma exclusiva com o objetivo de isolar o ambiente de outros animais.

Os animais foram divididos por sorteio em 5 grupos: SED, animais que permaneceram sedentários durante o transcorrer do experimento (n=12); AERO, submetidos a exercício físico moderado contínuo com ativação do metabolismo aeróbio (n=12); HIIT, animais que foram submetidos a treinamento intervalado de alta intensidade (*high intensity interval trainig*) (n=12); AGUDO, animais que foram submetidos a exercício físico de alta intensidade em apenas uma sessão (efeito agudo) (n=12) e OVER, animais que foram submetidos a sobretreino (*overtraining)* com aumento do volume do treinamento (n=12). Após 3 meses, os animais foram submetidos a estudo funcional, morfométrico e bioquímico.

4.2 Protocolo de Exercício Físico

Os animais foram submetidos ao exercício físico em esteira rolante, com controle de intensidade e duração digitais. As sessões de treinamento foram realizadas nos períodos da manhã e tarde (quando ocorreram mais sessões) em todos os dias de treinamento em sala com ciclo invertido e luz vermelha simulando ambiente de baixa luminosidade.

A intensidade foi controlada por meio da velocidade de deslocamento da lona e intervalos entre os estímulos no caso do treinamento intervalado. No grupo submetido ao sobretreinamento, os animais foram submetidos ao incremento de volume de treinamento com o acréscimo de mais uma sessão no período de 24 horas.

Na primeira semana de treinamento os animais foram submetidos ao exercício por trinta minutos. A partir da segunda semana de treinamento, os animais que se exercitaram, correram por uma hora de forma que as modificações referentes à intensidade tenham sido realizadas com acréscimo de velocidade. A frequência de treinamento foi de cinco dias por semana até o final do período experimental. Durante todo o período de execução do protocolo de exercício, os grupos controle e de exercício físico agudo permaneceram inativos, sendo que somente os ratos do grupo agudo realizaram sessão única até a exaustão. Os protocolos de treinamento estão representados no quadro 1.

SEMANA	Aeróbio N=12		HIIT N=12		Agudo N=12		Sobretreino N=12	
	%VO_2 Máximo	Duração (min)	%VO_2 Máximo	Duração (min)	%VO_2 Máximo	Duração (min)	%VO_2 Máximo	Duração (min)
1	50	30	50	30	-	-	50	30
2	50	60	50*/ 80**	60 (3*/2,5*)	-	-	60	60
3	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	70	60
4	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60
5	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60
6	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	--	80	60
7	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60
8	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60
9	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60
10	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60 (2xdia)
11	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	-	-	80	60 (2xdia)
12	50	60	50*/ ≥90**	60 (3*/2,5*)	100	Fadiga	80	60(3xdia)

Quadro 1 – Protocolo de treinamento realizado nos grupos submetidos ao exercício físico. * período de baixa intensidade; ** período de alta intensidade

4.3 . Análise de Consumo Máximo de Oxigênio

Na semana que antecedeu o período de treinamento, foram realizadas as primeiras avaliações do consumo de oxigênio em animais escolhidos aleatoriamente dentro dos grupos. Para realização dos testes, foram selecionados quatro animais por grupo com o objetivo de não prolongar o período das avaliações, pois cada período de teste teve duração de dois dias. Após o início do protocolo, foram realizadas avaliações a cada quatro semanas para atualização do percentual do consumo máximo do oxigênio e, consequentemente, as velocidades utilizadas no treinamento (Figura 1).

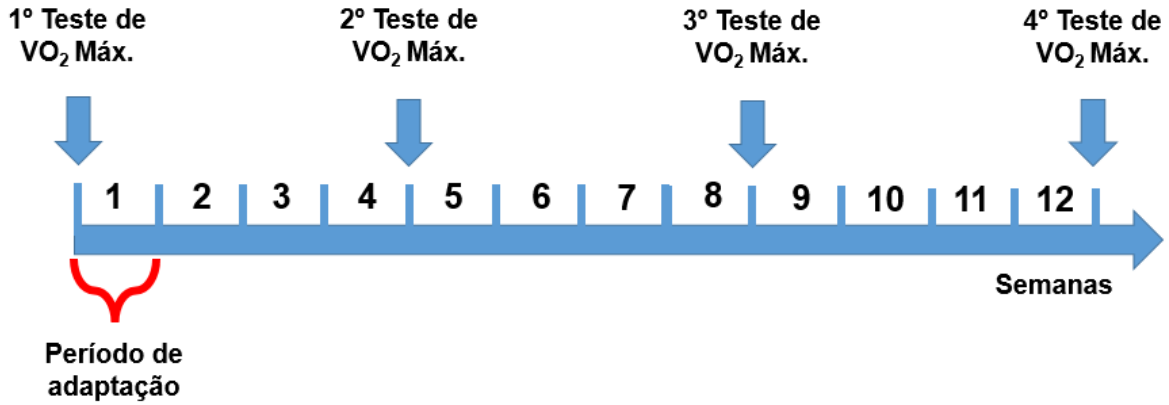

Figura 1 – Representação dos períodos (semanas) em que foram realizadas as avaliações de Consumo Máximo de Oxigênio (V̇O2 Máx.).

Os animais foram submetidos ao teste de esforço máximo para medir o consumo máximo de oxigênio (V̇O2 Máx.), com o objetivo de detectar a velocidade correspondente ao consumo de oxigênio utilizada em cada momento no desenvolvimento do protocolo. O V̇O2 Máx. foi medido por analisador de oxigênio, criado pela AVS Projetos®, localizado no interior de um modem conectado à um sistema que capta informações das concentrações de oxigênio com a frequência de 1Hz.

A esteira rolante se localiza dentro de uma caixa acrílica vedada com controle de velocidade digital. Embora o dispositivo para incremento de velocidade estivesse disponível no display da esteira, foi utilizado o software AQCAD da AVS Projetos® com programação própria no controle do incremento de velocidade por um tempo pré-programado. Todo os equipamentos foram anexados em computador responsável pelo controle do teste em tempo real e armazenar as informações coletadas.

O ar ambiente foi controlado por dispositivo responsável por bombear para a câmara fechada o ar com fluxo de 3,5 l/min. Amostras deste ar foram utilizadas para medir a variação de oxigênio dentro da câmara durante a corrida durante o protocolo. O analisador foi calibrado a cada teste novo com ar ambiente com o objetivo de equalizar as amostras de ar. Todas as avaliações foram realizadas na sala com luz vermelha simulando o ambiente de treinamento com ciclo invertido (Fig. 2).

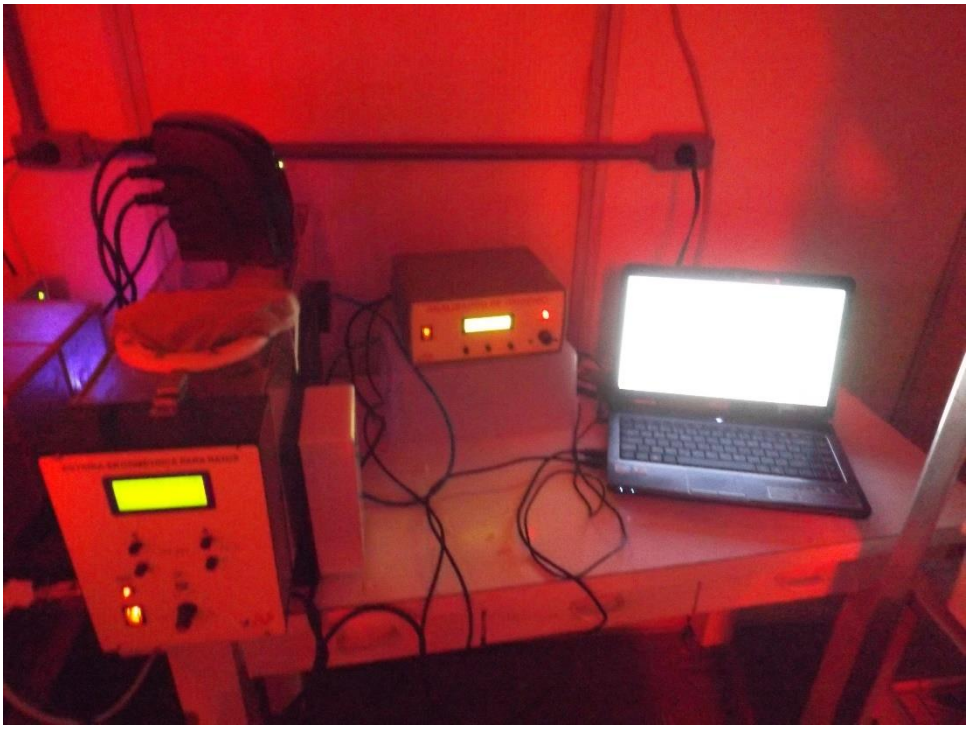

Figura 2 – Analisador de oxigênio (centro), esteira rolante (esquerda) e computador (direita) utilizados na quantificação do consumo de oxigênio dos animais em cada período do processo de treinamento.

Durante a corrida, uma grade de aço inoxidável foi alocada no final da pista e, quando tocada pelo animal, fornecia estímulo elétrico para mantê-lo correndo até o final do teste. Entretanto, a área total da pista garantia que o animal dispunha de espaço suficiente para correr sem ter contato constante com o aparato.

No procedimento de quantificação do consumo de oxigênio, os animais submetidos ao teste de esforço realizaram 5 minutos de aquecimento em velocidade de 8m/min antes do início do protocolo. A velocidade inicial do teste foi de 10m/min. Cada estágio continha 3 minutos de duração e acréscimo de 3m/min ao final deste período (tabela 1). Os critérios para obtenção do consumo máximo de oxigênio foram conquistados com a estabilização no consumo de oxigênio mesmo com acréscimo de velocidade e/ou presença de exaustão[33,34].

Para serem determinadas as velocidades utilizadas em cada estágio nos grupos submetidos ao treinamento, foram encontrados os percentuais descritos para cada treinamento e, posteriormente, analisada a velocidade correspondente à velocidade do percentual do consumo de oxigênio.

Estágio	Tempo (minutos)	Velocidade (m/min)	Distância (m)
1	3’	10	30
2	6’	13	108
3	9’	16	252
4	12’	19	480
5	15’	22	810
6	18’	25	780
7	21’	28	1038
8	24’	31	1332
10	27’	34	1662
11	30’	37	2028
12	33’	40	2430
13	36’	43	2868
14	39’	46	3342
15	42’	49	3852
16	45’	52	4398
17	48’	55	4980
18	51’	58	5598
19	54’	61	6198
20	57’	64	6831

Tabela 1. Protocolo com intensidade (velocidade) crescente utilizado na realização do teste de consumo máximo. A distância descrita é a registrada ao final de cada estágio.

4.4. Estudo Ecocardiográfico

Após três meses, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) via intramuscular. Após a sedação do animal, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico. A avaliação foi realizada em sala escura preparada para a realização do mesmo.

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. Todas as variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography*[35] e já validadas no modelo de ratos no nosso laboratório[36-41].

As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior do VE; espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV); e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) [42]. A espessura relativa do VE foi calculada pela fórmula [(2 x EDPP) / DDVE][43]. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo): [(DDVE – DSVE)/DDVE]; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 3) fração de variação das áreas sistólica e diastólica da cavidade ventricular; 4) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular. Adicionalmente foi calculado o índice de performance

miocárdica do VE (índice de Tei)[44]. 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) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E')[45,46].

4.5. Coleta de Material Biológico

Os animais foram sacrificados com dose excessiva de tiopental (100 mg/kg) e o sangue foi coletado antes da retirada do coração, fígado e pulmão. O sangue foi centrifugado a 20.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro que, posteriormente foi congelado a – 80º C. O fígado e pulmão foram colocados em soro fisiológico para retirada do excesso de sangue e em seguida secados com tecido apropriado e pesados. Após o estudo, o coração foi dissecado, separando-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD) e obtido o peso de ambos. Em seguida o VE foi seccionado a 4 mm da ponta em fragmento de 3 mm colocado em ambiente com baixa temperatura. Peso úmido do VE, VD, fígado e pulmão foram aferidos em balança de precisão. Após esse procedimento, os VE obtidos foram guardados em formol tamponado (formol 100%, água deionizada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico) por 24 horas, depois lavados em água corrente em mais 24h e posteriormente colocados em álcool 70%, antes de serem parafinizados. Os tecidos cardíacos e o plasma colhido foram congelados em equipamento com temperatura média de –80º C. O material foi congelado para que pudesse ser posteriormente

processado e submetido a determinações bioquímicas da formação das Redes Extracelulares dos Neutrófilos.

4.6. Avaliação das NETs

O sangue coletado no momento do sacrífio dos animais e posteriormente processado de forma a subtrair-se o plasma que foi utilizado para essa análise. O procedimento de ELISA para quantificação das NETs foi realizado por mensuração de fluorescência do complexo MPO-DNA (Nets) com auxílio do kit Pico Green®. No primeiro dia, uma placa anti-MPO (Abcam, cat no90810) foi sensibilizada na concentração de 5µg/ml e deixada em *overnight* em câmara úmida. No dia seguinte, a placa foi lavada por quatro vezes com solução de lavagem (PBS e Tween 20 a 0,05%). As reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS acrescido de BSA a 2% por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse procedimento, a placa foi lavada novamente por quatro vezes consecutivas. Então foi adicionada 50µl das amostras obtidas dos plasmas coletados. Foram adicionados também nos poços correspondentes à curva PBS com mesmo volume das amostras. Após este procedimento a placa foi incubada *overnight* na geladeira em câmara úmida. No terceiro dia, a placa foi novamente lavada por quatro vezes para eliminar o excesso de amostras não reagentes. Foram diluídos em tubo plástico as concentrações recomendadas no kit para formação das curvas padrões. O tampão foi adicionado nos poços onde se encontravam as amostras. Em seguida, foram adicionadas as sondas de detecção de material genético (DNA – kit Pico Green) e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, sob proteção de luz. A leitura foi realizada em leitor de fluorescência com emissão de 525 e excitação de 488.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores paramétricos obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, complementados pelo teste de Tukey.

Os dados que não apresentaram distribuição normal foram mostrados como mediana e intervalo interquartil e foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, complementados pelo teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Peso Corporal

Os animais dos grupos que realizaram exercício físico (grupos HIIT e AERO) apresentaram diferença estatisticamente significativa no peso corporal ao final do período de exposição aos tratamentos.

A diferença entre as médias dos pesos corporais dos animais submetidos ao exercício aeróbio dos que realizaram exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), bem como os valores obtidos em cada grupo estão demonstrados na figura abaixo:

PESO CORPORAL DOS ANIMAIS AO FINAL DO EXPERIMENTO

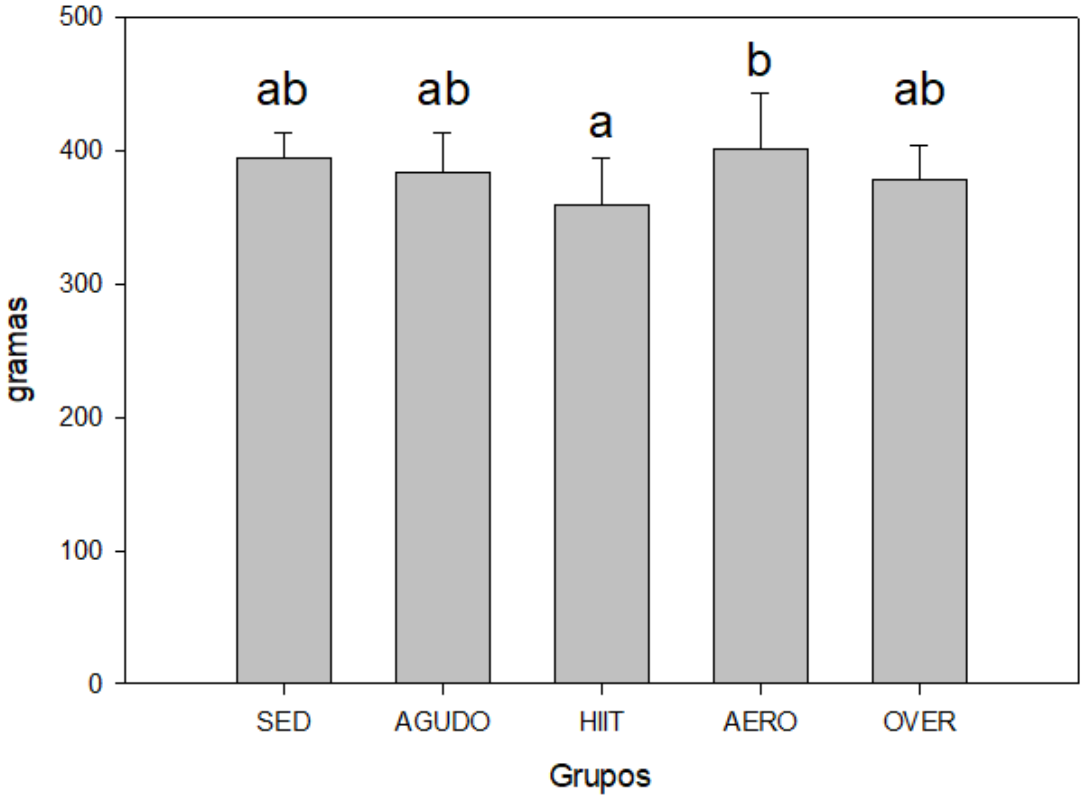

Figura 3 – Médias dos pesos corporais dos animais dos grupos: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. Valor da diferença entre os grupos HIIT e AERO com p=0,02. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

Para equalizar as medidas dos pesos corporais obtidos nos animais alocadaos em cada grupo, segundo a intervenção, foi realizado cálculo que considerou a medida média de peso corporal realizada no início do protocolo com a última medida após o protocolo de treinamento (Figura 4).

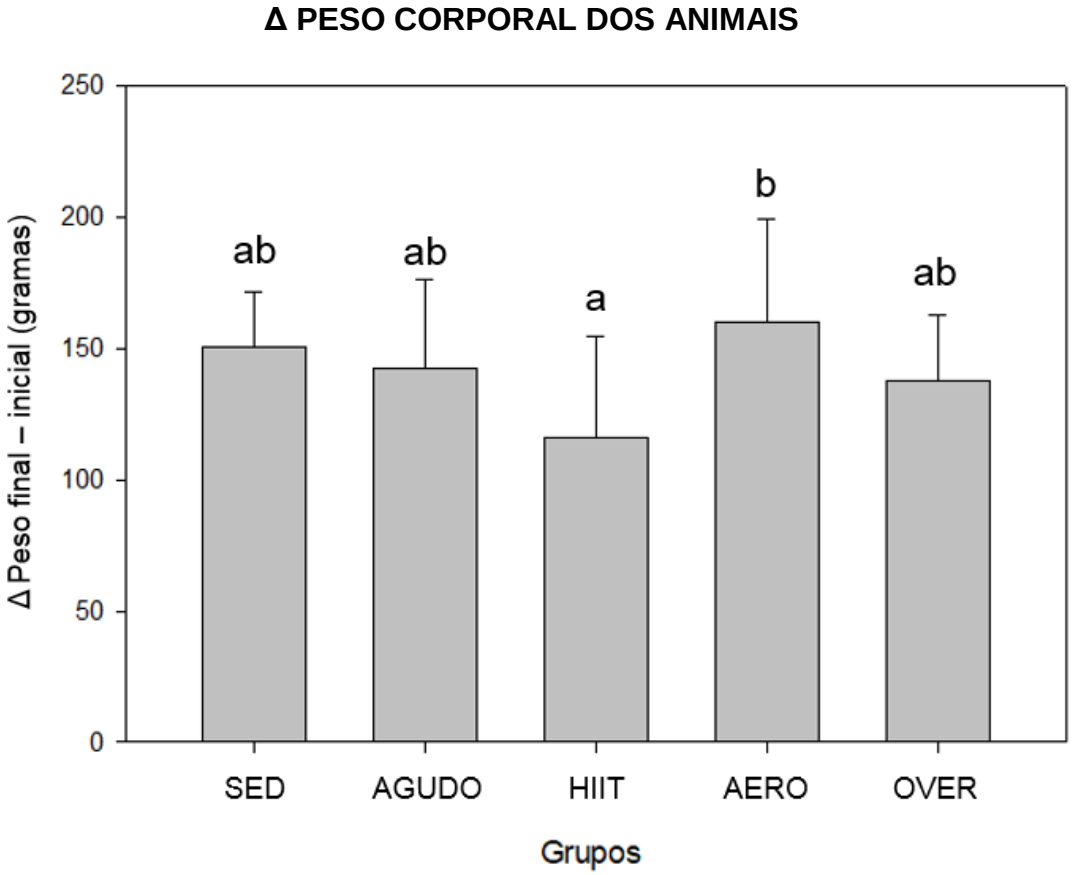

Figura 4 – Médias das diferenças dos pesos corporais dos animais obtidos no início e final do treinamento. Os grupos são: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. Valor da diferença entre os grupos HIIT e AERO com p=0,028. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

5.2. Consumo Máximo de Oxigênio

Para analisar as alterações do consumo de oxigênio nos treinamentos propostos e posteriormente utilizar esses parâmetros na atualização das velocidades dos treinamentos, foram avaliados o valor do consumo de oxigênio absolutos, relativo ao peso corporal do animal e velocidade final de cada teste.

A igualdade de consumo de oxigênio relativo (consumo de oxigênio corrigido pelo peso corporal) entre os grupos antes do início do protocolo (M0) de exercício físico está apresentada abaixo (Figura 5).

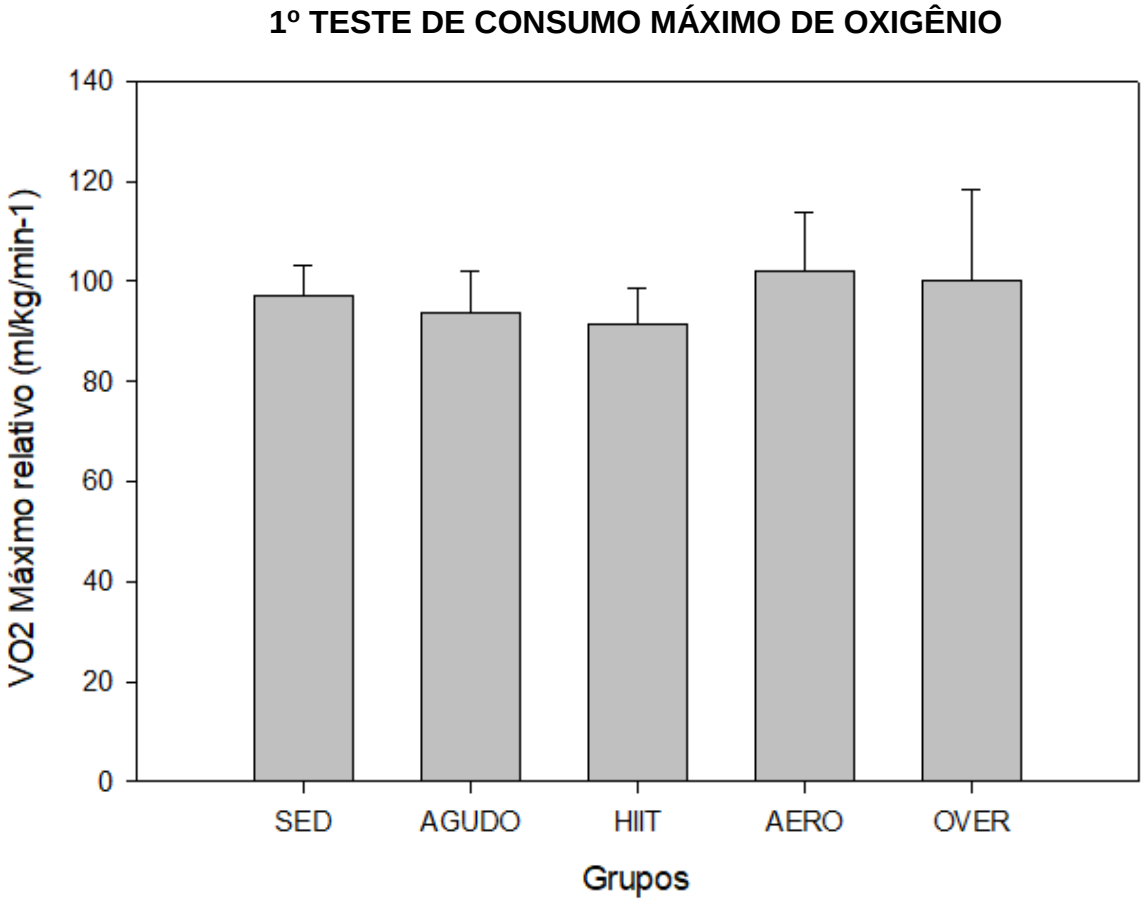

Figura 5 – Médias dos consumos máximos de oxigênio no início do experimento dos grupos: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. (p=0,698).

Na segunda avaliação foi encontrada diferença entre o grupo de exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) em comparação aos grupos sedentário e exercício agudo (sessão única ao final do experimento). Essas estão apresentadas abaixo (Figura 6).

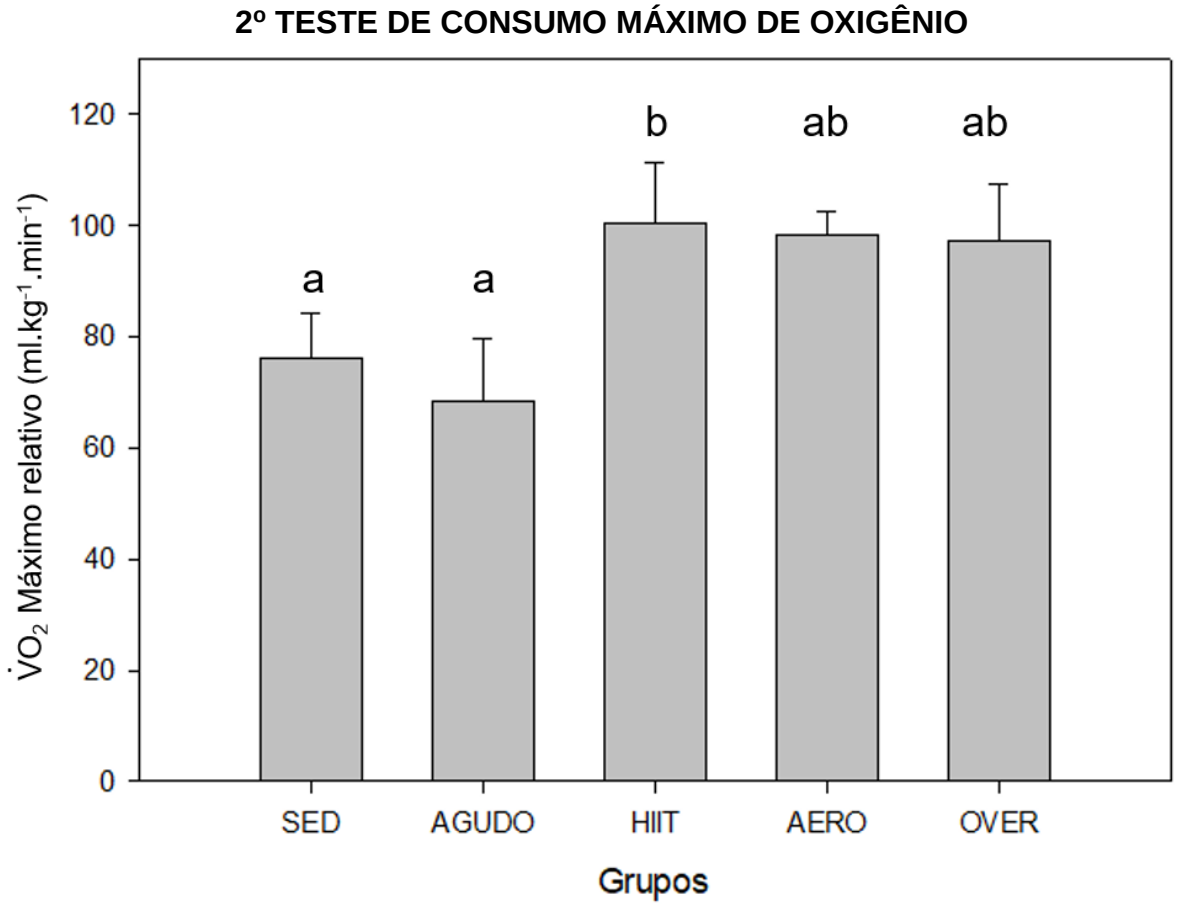

Figura 6 – Médias dos consumos máximos de oxigênio na avaliação realizada após trinta dias de treinanemento. Os grupos apresentados são: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. (p=0,698). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

Na terceira bateria de testes, as comparações entre os grupos que permaneceram ativos durante o processo apontaram maiores consumos de oxigênio máximo como mostra a figura a seguir (Figura 7).

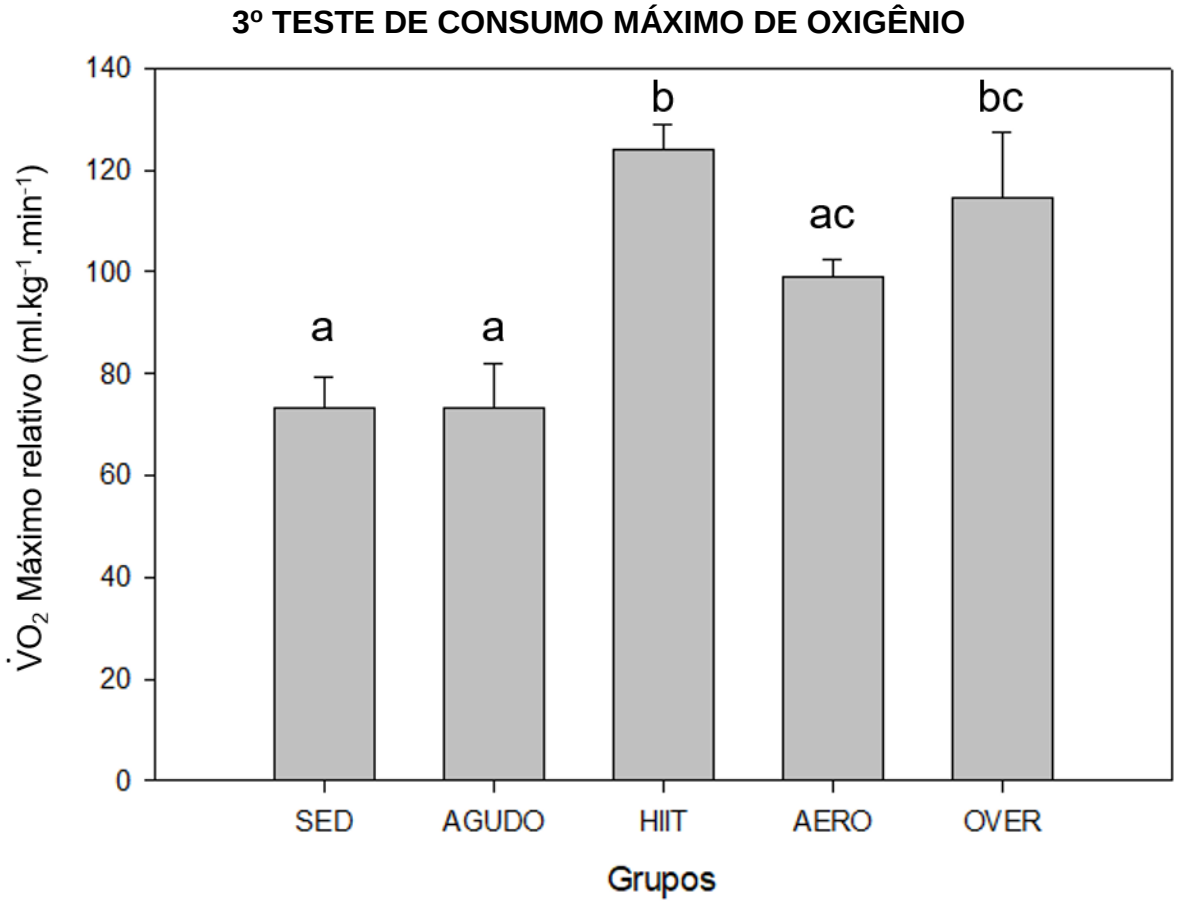

Figura 7 – Médias dos consumos máximos de oxigênio na avaliação realizada após trinta dias de treinanemento. Os grupos apresentados são: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. (p=0,698). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

Na avaliação final, após aplicação de treinamento em esteira rolante com duração de 3 meses, as comparações entre os grupos que permaneceram ativos durante o processo apontaram maiores consumos de oxigênio máximo como mostra a figura abaixo (Figura 8).

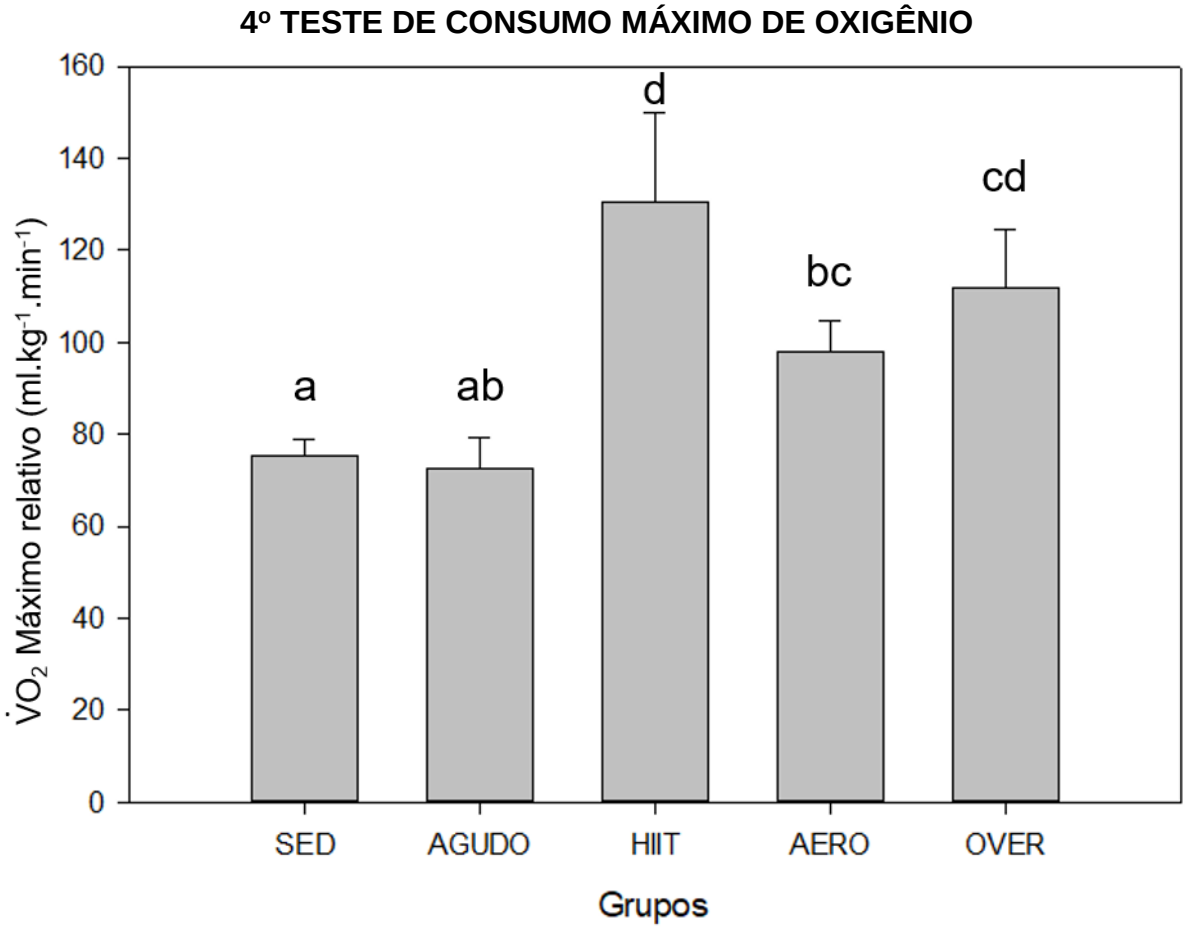

Figura 8 – Médias dos consumos máximos de oxigênio na avaliação realizada após o período de 90 dias de treinanemento. Os grupos apresentados são: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER). Ao final de três meses, foram encontradas as seguintes diferenças: (p=0,698). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

A comparação entre os períodos em que cada teste foi realizado, com os dados estatísticos aplicados em comparações entre os grupos em cada momento, está apresentado abaixo (Figura 9).

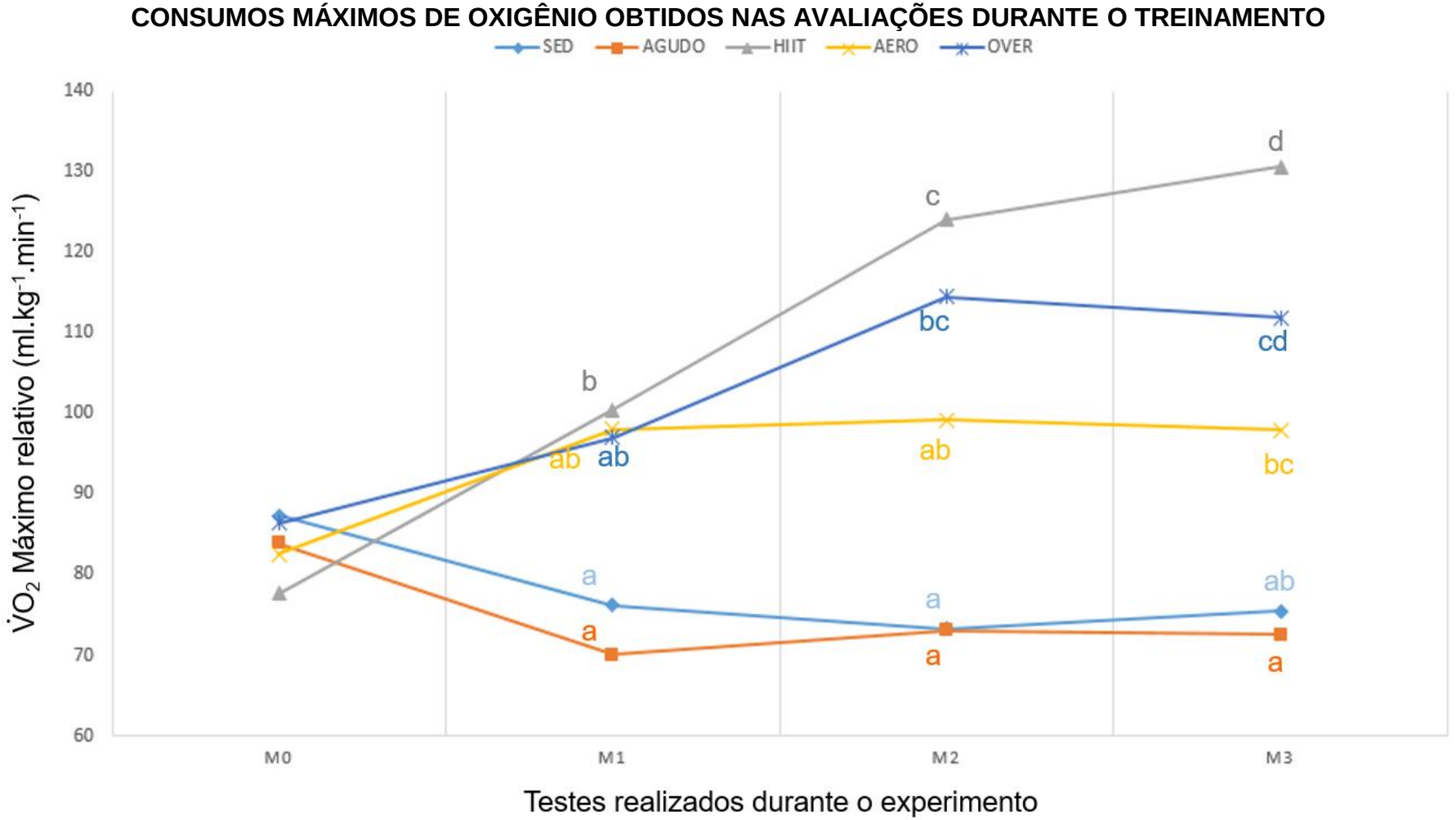

Figura 9 – Os resultados mostrados no gráfico acima são comparações realizadas apenas entre os resultados obtidos no mesmo período. Os grupos são: sedentário (SED); exercício físico agudo (AGUDO); exercício intervalado de alta intensidade (HIIT); exercício físico com predominância aeróbia (AERO); e sobretreino (OVER). A primeira avalição está representada como **M0**; a segunda como **M1**, a terceira como **M2** e a qaurta como **M3**. Os valores das diferenças entre os são em **M1**: HIIT x AGUDO (p=0,002); HIIT x SED (p=0,011). **M2**: HIIT x AGUDO (p<0,001); HIIT x SED (p<0,001); HIIT X AERO (p=0,003); OVER x AGUDO (p<0,001); OVER x SED (p<0,001); AERO x AGUDO (p=0,002); AERO x SED (p=0,002). **M3**: HIIT x AGUDO (p<0,001); HIIT x SED ((p<0,001); HIIT x AERO (p=0,007); (OVER x AGUDO (p=0,002); OVER x SED (p=0,003); AERO x AGUDO (p=0,041). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos.

5.3 Velocidade e Volume de Treinamento

Os ratos pertencentes ao grupo de animais sedentários não participaram do processo de treinamento. Mesmo assim, participaram das avaliações de consumo máximo de oxigênio com o objetivo de serem o padrão de comparação para animais não submetidos às alterações decorrentes da aplicação crônica da corrida. As velocidades utilizadas em cada fase do desenvolvimento dos protocolos de treinamento estão apresentadas abaixo (tabela 2).

	VELOCIDADE (m/min)		
GRUPOS	m0 – m1	m1 – m2	m2 – m3
AGUDO	X	X	24
HIIT	1a semana: 16 2a semana: 16 – 27 3a semana: 16 – 33	19 - 39	21 - 45
AERO	24	27	30
OVER	1a semana: 16 2a semana: 19 3a semana: 24 4a semana: 27	36	39

Tabela 2. Velocidades utilizadas nos grupos que passaram pelo processo de treinamento. Valores expressos em metros por minuto (m/min).

O grupo submetido à sessão única de treinamento realizou o exercício físico no final do experimento. O esforço único culminou na fadiga do animal durante aproximadamente 5 minutos de exercício. A fadiga foi detectada pela não permanência na pista do animal. A velocidade de 24 m/min utilizada na sessão foi calculada pelo resultado da média da velocidade obtida na última análise de consumo de oxigênio.

Os animais treinados com esforço dentro da zona de formação de energia pela via aeróbia tiveram aumento gradativo da velocidade correspondente à 50% do consumo máximo de oxigênio. Dessa forma, foram utilizadas as velocidades de 16 m/min na primeira semana. Nos primeiros trinta dias foram realizados acréscimos na velocidade para adaptação dos animais ao exercício físico. A velocidade de 27m/min

do trigésimo ao sexagésimo e 30/min do sexagésimo até o final do experimento.

Sobre o volume de treinamento realizado para cada grupo, a tabela 3 apresenta as distâncias percorridas em cada sessão de treinamento segundo o período de treinamento. Esses períodos demonstram um intervalo de 4 semanas, sendo que nas primeiras semanas os grupos HIIT e OVER passaram por adaptações de velocidade (tabela 3).

	VOLUME (m)		
GRUPOS	m0 – m1	m1 – m2	m2 – m3
AGUDO	X	X	360
HIIT	1a semana: 480 2a semana: 1210 3a semana: 16 – 33 1390	1645	1875
AERO	720	1620	1800
OVER	1a semana: 480 2a semana: 1140 3a semana: 1440 4a semana: 1620	2160	2340

Tabela 3. Distâncias percorridas pelos grupos que passaram pelo processo de treinamento. Valores expressos em metros (m).

5.4 Ecocardiograma

As diferenças das variáveis obtidas no exame de ecocardiograma estão apresentadas a seguir. Na tabela 4 estão apresentadas as variáveis morfológicas que demostraram alterações nas estruturas do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo peso corporal e índice de massa do ventrículo esquerdo. Na tabela 5 estão apresentadas as variáveis funcionais que demostraram alterações nas funções do percentual de encurtamento, fração de ejeção e velocidade de encurtamento da parede posterior.

Tabela 4 - Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma

Variáveis	Grupo SED (n=12)	Grupo AGUDO (n=12)	Grupo HIIT (n=12)	Grupo AERO (n=12)	Grupo OVER (n=12)	p
PC (g)	393,8±19,7	383,2±30,3	359±34,8 [a]	400,7±41,8 [b]	377,7±26,0	0,02
DDVE (mm)	7,4 (7,2-7,9)	7,2 (6,9-7,7)	7,2 (6,8-7,4)	6,9 (6,7-7,1)	7,2(6,6-7,6)	0,198
DSVE (mm)	3,6±0,6[a]	3,2±0,5[ab]	2,6±0,0,5[bd]	2,7±0,0,6[bd]	3,1±0,5[abd]	0,004
DDVE/PC (mm/kg)	19,1±1,5[a]	20,5±1,7[a]	18,8±1,6[ab]	17,7±1,8[b]	19,1±0,7[ab]	<0,001
EDSIV (mm)	1,2±0,08	1,2±0,03	1,2±0,06	1,2±0,03	1,2±0,06	0,360
EDPP (mm)	1,2±0,06	1,2±0,03	1,2±0,07	1,2±0,03	1,2±0,05	0,427
Esp. Rel.	0,3±0,02	0,3±0,01	0,3±0,02	0,3±0,01	0,3±0,02	0,572
IMVE (g/kg)	1,5±0,2[ab]	1,6±0,1[a]	1,4±0,1[ab]	1,3±0,1[b]	1,5±0,1[ab]	0,002
AE (mm)	5,2±0,1	5,2±0,1	5,3±0,3	5,3±0,1	5,2±0,3	0,561
AE/PC (mm/kg)	13,6 (13,0-13,8)	14,6 (13,6-15,9)	14,3 (13,1-14,9)	13,1 (11,8-14,3)	13,6 (13,3-14,5)	0,052
AO (mm)	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1	0,747
AE/AO	1,3±0,04	1,3±0,03	1,3±0,07	1,3±0,08	1,3±0,06	0,286

SED: sedentários; AGUDO: exercício físico agudo (sessão única); HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; AERO: exercício aeróbio; OVER: sobretreino (*overtraining*) PC: Peso corporal; DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDSIV: Espessura diastólica do septo intraventricular; EDPP: Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; Esp.Rel.: espessura relativa do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: Diâmetro do átrio esquerdo; AO: Diâmetro da artéria aorta. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de uma via complementado pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma

Variáveis	Grupo SED (n=12)	Grupo AGUDO (n=12)	Grupo HIIT (n=12)	Grupo AERO (n=12)	Grupo OVER (n=12)	p
FC (bpm)	307,0±64,3	332,2±54,5	364,1±65,5	354,4±36,8	352,0±46,5	0,116
% Enc. Endo (%)	$51,4±5,6^{a}$	$55,3±7,3^{ab}$	$63,6±7,7^{c}$	$61,4±8,0^{bc}$	$56,6±4,9^{b}$	0,034
Fração de Ejeção (%)	$89\ (84\text{-}91)^{a}$	$91\ (88\text{-}93)^{ab}$	$95\ (92\text{-}97)^{b}$	$94\ (90\text{-}96)^{ab}$	$92\ (89\text{-}93)^{ab}$	0,002
VEPP (mm/s)	$44,1±4,3^{a}$	$46,9±5,1^{ab}$	$53,0±9,1^{b}$	$46,4±7,7^{ab}$	$43,8±3,7^{a}$	0,013
TRIV (ms)	22 (18-26)	24 (22-24)	22 (20-22)	20(18-22)	24 (22-24)	0,080
TDE (ms)	49,1±5,0	46,8±2,9	47,2±9,8	40,2±7,0	39,5±6,5	0,056
E Mitral (cm/s)	76,0 (69,5-77,0)	74,5 (66,2-81,2)	71,0 (67,0-77,0)	76,0 (74,2-82,5)	71,0 (68,0-82,0)	0,654
A Mitral (cm/s)	51,0 (47,7-54,2)	49,5 (45,0-74,0)	60,0 (53,0-85,0)	60,5 (58,2-81,0)	49,0 (45,0-74,0)	0,075
E' Média (cm/s)	3,2 (2,9-3,9)	3,0 (2,9-3,6)	3,7 (3,4-3,9)	3,6 (3,2-4,0)	3,3 (3,0-4,2)	0,299
A' Média (cm/s)	4,7 (3,9-5,5)	4,9 (4,4-5,1)	5,5 (3,6-5,8)	5,1 (4,8-5,6)	4,8 (4,6-5,0)	0,593
S Média (cm/s)	3,5±0,3	3,7±0,4	3,8±0,2	3,8±0,3	3,7±0,2	0,101
E/A	22,4±3,2	23,4±2,4	20,6±2,2	21,7±3,2	21,4±4,5	0,617

SED: sedentários; AGUDO: exercício físico agudo (sessão única); HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; AERO: exercício aeróbio; OVER: sobretreino (*overtraining*) FC: frequência Cardíaca; % Enc. Endo: percentual de encurtamento; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onde E mitral; Os dados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de uma via complementado pelo teste de Tukey.

5.5 PESOS DOS ORGÃOS

A igualdade nos pesos dos orgãos (ventrículo esquerdo, ventrículo direito, pulmão e fígado) medidos após a eutanásia estão demonstrados na tabela abaixo:

Tabela 5- Pesos dos órgão dos animais

Variável	Grupo SED (n=12)	Grupo AGUDO (n=12)	Grupo HIIT (n=12)	Grupo AERO (n=12)	Grupo OVER (n=12)	P
VE (g)	0,894 (0,840-0,982)	0,939 (0,862-0,993)	0,922 (0,887-0,987)	1,057 (0,877-1,102)	0,921 (0,902-0,996)	0,283
VD (g)	0,221 (0,198-0,274)	0,238 (0,203-0,317)	0,252 (0,204-0,339)	0,244 (0,221-0,298)	0,237 (0,215-0,276)	0,820
PULMÃO (g)	2,2±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	2,2±0,3	2,0±0,1	0,498
FÍGADO (g)	14,0±0,7	14,0±0,6	13,6±0,9	14,6±0,7	13,7±1,0	0,114

SED: sedentários; AGUDO: exercício físico agudo (sessão única); HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; AERO: exercício aeróbio; OVER: sobretreino (*overtraining*); VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.Os dados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de uma via complementado pelo teste de Tukey.

5.6. QUANTIFICAÇÃO DAS NETs

A figura abaixo (Figura 10) apresenta igualdade da distribuição da formação de redes de DNA dos neutrófilos nos grupos que participaram do experimento.

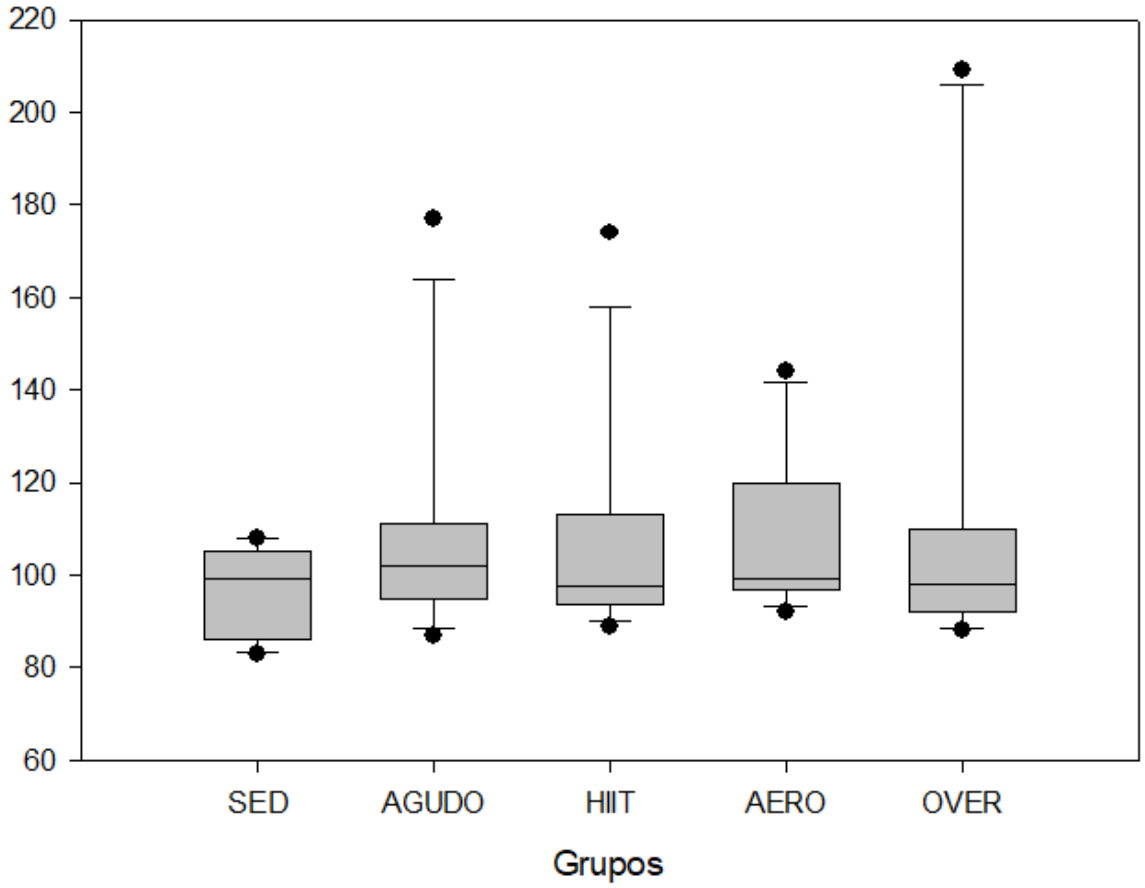

Figura 10 – Medianas e quartis das quantificações das NETs ao final do experimento dos grupos: sedentário (SED), exercício físico agudo (AGUDO), exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), exercício físico com predominância aeróbia (AERO) e sobretreino (OVER) ao final de três meses. (p=0,487).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos cardiovasculares do exercício físico em diferentes intensidades e relacionar esses efeitos com a netose, no modelo de rato. Nossos dados mostram que todas as modalidades de exercício apresentaram valores de netose semelhantes aos animais sedentários, independentemente do método de treinamento adotado ou dos protocolos de exercício físico experimentados.

O primeiro aspecto a ser considerado é que os animais submetidos aos protocolos aeróbico e intervalado apresentaram melhora da função cardíaca. Com o treinamento intervalado de alta intensidade, com duração de 3 meses, os animais apresentaram maior percentual de encurtamento do ventrículo esquerdo, fração de ejeção e velocidade de encurtamento de parede posterior em comparação com o treinamento sedentário. Por outro lado, no grupo submetido ao treinamento agudo e ao processo de sobretreinamento, os animais não apresentaram efeito benéfico funcional relacionado ao percentual de encurtamento. Esses dados corroboram com alterações cardíacas encontradas em pesquisa que descreve protocolos de treinamento promotores de adaptações cardíacas agudas e crônicas saudáveis segundo a predominância metabólica do esforço[47].

O nível de treinamento alcançado em cada protocolo de treinamento foi determinado pelo consumo máximo de oxigênio durante o transcorrer do tempo, chamado efeito crônico. Essa avaliação é utilizada como fonte de informações sobre as adaptações cardiorrespiratórias ao longo do processo adaptativo dos animais e também para prescrições das velocidades utilizadas nas sessões subsequentes. Dessa forma, as adaptações crônicas

inerentes à melhora do condicionamento físico dos animais utilizando o consumo de oxigênio como forma de regular a intensidade, estão condizentes com dados apresentados em estudo anterior[48].

Além disso, valores descritos em todas as avaliações são similares aos encontrados em estudos com animais utilizando os mesmos métodos de obtenção do consumo máximo de oxigênio[33,34].

No mesmo trabalho, o grupo que realizou esforço único seguiu o modelo desenvolvido em pesquisas que mostraram o aumento do número de NETs. Nele, indivíduos sedentários com atividade realizada em cicloergômetro apresentaram aumento na produção das redes de DNA oriundas dos neutrófilos. Apesar deste estudo apresentar a mesma solicitação metabólica em para ratos, as alterações que levaram o aumento na formação das NETs não foram suficientes para demonstrar aumento significativo no modelo experimental. As alterações descritas como a elevação nos estresse oxidativo no citosol, diminuição na concentração de glutationa, inibição da NADPH oxidase e na supressão do potencial de membrana da mitocôndria ocorrida pela menor expressão da enzima citrato sintase não foram suficientes para elevarem significativamente a produção da redes extracelulares dos neutrófilos. Adicionalmente, esta mesma pesquisa que testou a colaboração das NETs na composição do material genético encontrado no meio extracelular. O protocolo com intensidades crescentes, mostrou diferença de produção entre sedentários e ativos, sendo que a netose foi detectada apenas em animais sedentário expostos ao exercício. Seguindo este modelo, nosso estudo utilizou animais sedentários

e submetidos ao processo de treinamento com adaptações crônicas que não demonstraram diferenças na formações da NETs[49].

Em outro estudo, o exercício de alta intensidade realizado de forma aguda promovem modificações na atividade de enzimas antioxidantes no plasma sanguíneo. Na fase inicial da recuperação pós exercício, a atividade das enzimas antioxidantes diminuem. No período de 24 horas após o exercício anaeróbico, a atividade da glutationa peroxidade no plasma sanguíneo é maior do que antes do exercício. Assim, os períodos que são realizadas as coletas para quantificações podem demonstrar modificações importantes. Em nosso estudo, as coletas foram realizadas ao final da aplicação do protocolo de treinamento, assim determinando a similaridade das quantificações das NETs seguindo as ocorrências no momento[50].

A mieloperoxidade (MPO), além de compor as substância da rede de sinalização do estresse oxidativo, é importante na formação da NETs. Em Pesquisa realizada com cultura de células, foi encontrada ligação entre a formação das redes de DNA extracelulares e o aumento do estresse oxidative, principalmente pela MPO. Dessa forma, desarranjos no balanço oxidativo são promotoras de netose, principalmente em situações deletérias[51].

Conforme citado anteriormente, o exercício físico praticado com intensidade crescente até a exaustão provoca aumento da DNA extracelular e pode ser utilizado como marcador de sobretreinamanto[52]. Essa produção ocorre por associação entre a produção de DNA extracelular e de MPO em exercício físico. Essas modificações são explicadas principalmente pela maior produção de inteleucinas (IL-6, IL-8, IL-10 e IL-16), hormônio do

crescimento e metaloproteinases (MMP2, MMP3 e MMP9). Nessas situações, os níveis elevados de componentes do marcadores inflamatórios podem estão associados com condições patológicas[49]. Embora nosso estudo não tenha estudado os componentes das vias inflamatórias, a respostas pela produção das NETs não condizem com quadro importantes no dessaranjo da imunidade inata que findam em estado patológico.

Sobre o sistema imunológico, em seres humanos submetidos ao estresse agudo, foram mobilizados subconjuntos de monócitos nos protocolos que executaram exercícios com predominâncias metabólicas diferentes (anaeróbicos e aeróbicos). Em exercício agudo de alta intensidade com característica pró-inflamatória e aumentada o estresse oxidativo, no entanto, o estímulo pode produzir o estresse necessário para estimular adaptações crônicas, se continuado o processo de treinamento, que condizem com parâmetros benéficos[53-54], incluindo a redução da inflamação resposta[55] e estresse oxidativo, aumentando o sistema antioxidante[56]. Estas respostas mediadas pelo exercício parecem depender de fatores, como a intensidade, duração e massa muscular envolvida[57]. Dessa forma, as alterações no sistema imunológico podem ter ocorrido como descrito sem a participação efetiva das NETs.

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), como apresentado neste experimento, é caracterizado por compor em seu protocolo intervalos breves e repetidos de estímulos intensos, de aproximadamente de 85 a 100% das intensidades encontradas com o percentual do consumo máximo de oxigênio, seguidos de curtos períodos de descanso passivo ou ativo como exercícios de baixa intensidade[58-61]. Esse

método de treinamento é considerado promissor para a redução dos fatores de riscos cardiometabólicos[62-65], embora aumente o estresse oxidativo e promova desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante intracelular[66-69]. Em nossa pesquisa, os efeitos deletérios provocados pela formação das NETs em consequências à produção e liberação exacerbadas de EROS geradas pelo exercício físico que perturbam a homeostase redox intracelular[70], provocam danos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica[71], bem como lesões em células cardíacas[69] foram descartadas, eliminando assim as consequências às respostas celulares com danos significativos não reparados que provocam apoptose ou senescência que contribuem para o surgimento de doenças cardiovasculares e a síndrome metabólica[72-74]

Contrapondo pesquisas que demonstraram a presença de situações condizentes com a formação das NETs, estudo recente que analisou sobretreinamento em ratos, mostrou que os marcadores de estresse oxidativo e inflamação podem não representar condições de sobretreinamento. Para isso, foram avaliadas mudanças nos níveis de citocinas e parâmetros do estado redox em animais submetidos ao treinamento moderado e sobretreinamento em natação[75]. Considerando esse achado e a necessidade da presença desses desfechos para a produção das NETs, em nosso trabalho, a manutenção dos níveis de redes de material genético oriunda dos neutrófilos podem não ter sido estimuladas. Vale ressaltar que, nas sessões de treinamento do grupo submetido ao sobretreinamento, os animais tiveram dificuldade em manter a velocidade

após o incremento do volume (mais sessões ao dia) o que caracterizou exaustão.

Para caracterizar situações patológicas, além da MPO, a elastase, a peptidilarginina deiminase 4 (PAD4) e as quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 / 6) são fundamentais na formação das redes. Especificamente, a elastase que demonstrou degradar a F-actina para impeder a dinâmica de actina, translocando-se posteriormente para o núcleo, onde ele degrada parcialmente histonas específicas, promovendo a descondensação da cromatina. Por outro lado, também os neutrófilos knockout de elastase são mais propensos para formar NETs. A MPO, nessa condição, age em conjunto com a elastase na condução da descondensação da cromatina, independente da sua atividade enzimática. O PAD4, essencial para um efeito antibacteriano nessa situação, também contribui para a descondensação da cromatina pela histona hipercultulinemia[76]. Embora essas descrições apresentem situações com desfecho desfavorável, em exercício físico, ainda não foi testada e podem apresentar condições positivas do ponto de vista fisiológico.

Pelo demonstrado, o processo de treinamento provocou alterações cardíacas condizentes com a melhora funcional. Vale ressaltar que nos modelos testados, parece ocorrer uma tendência a diminuição da netose quando comparado aos outros protocolos de exercício, assemelhando-se ao grupo de animais sedentários, o que pode ser explicado pela imunodeficiência a nível celular provocada pela sobrecarga de exercícios, o que explicaria a baixa de netose uma vez que os neutrófilos estariam com a contagem prejudicada nesta situação. Também ocorre afirmar que vários

outros mecanismos podem participar do processo de formação das NETs, porém não foram avaliados neste estudo. Assim, é relevante a execução de outros estudos sobre os efeitos do exercício físico na netose.

7. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O processo de treinamento leva à remodelação cardíaca alterando a função cardíaca e tornando o músculo cardíaco mais eficiente para a demanda utilizada nas sessões de exercício físico.

Embora as alterações cardíacas ocorram em intervenções crônicas, a quantidade de NETs em situações de sedentarismo e exercício físico agudo foram iguais.

Da mesma forma, a produção de NETs não é alterada nos protocolos de exercício físico crônico em comparação comparação às condições encontradas no sedentarismo e no exercício físico agudo executado em esteira rolante em ratos.

8.REFERÊNCIAS

8.**REFERÊNCIAS**

1) Mezzani A, Corrà U, Giannuzzi P. Central adaptations to exercise training in patients with chronic heart failure. Heart Fail Rev. 2008; 13: 13-20.

2) Mckelvie RS. Exercise training in patients with heart failure: clinical outcomes, safety, and indications. Heart Fail Rev. 2008; 13: 3-11.

3) Kemi OJ, Wisløf U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. Acta Physiol. 2011; 199(4):425-39.

4) Billman GE. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009; 297: H1171–H1193.

5) Molé PA. Increased contractile potential of papillary muscles form exercise-trained rat hearts. Am J Physiol. 1978; 234: H421-425.

6) Bersohn MM, Scheuer J. Effects of physical training on end-diastolic volume and myocardial performance of isolated rat hearts. Cir Res. 1977; 40: 510-516.

7) Atchley AF, Douglas P. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. Cardiol Clin. 2007; 25: 371-382.

8) King G & Wood MJ. The Heart of the Endurance Athlete Assessed by Echocardiography and Its Modalities: “Embracing the Delicate Balance”. Curr Cardiol Rep. 2013; 15:383.

9) Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. Prog Mol Biol Transl Sci. 2015; 135: 355-80.

10) J.A. Potteiger, M.A. Chan, G.G. Haff, S. Mathew, C.A. Schroeder, M.D. Haub, C. Chirathaworn, S.A. Tibbetts, J. Mcdonald, O. Omoike, S.H. Benedict, Training status influences T-cell responses in women following acute resistance exercise, J. Strength. Cond. Res. 2001; 15(2):185-191.

11) D.L. Mayhew, J.P. Thyfault, A.J. Koch, Rest-interval length affects leukocyte levels during heavy resistance exercise, J. Strength. Cond. Res. 2005; 19(1):16-22.

12) A. Ramel, K.H. Wagner, I. Elmadfa, Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men, Br. J. Sports. Med. 2004; 38(5):E22.

13) M.P. Miles, W.J. Kraemer, B.C. Nindl, D.S. Grove, S.K. Leach, K. Dohi, J.O. Marx, J.S. Volek, A.M. Mastro, Strength, workload, anaerobic intensity and the immune response to resistance exercise in women, Acta. Physiol. Scand. 2003; 178(2):155-163.

14) V.M. Natale, I.K. Brenner, A.I. Moldoveanu, P. Vasiliou, P. Shek, R.J. Shephard, Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. Sao Paulo Med. J. 2003; 121(1):9-14.

15) Liu H, Pope RM. Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction. Rheum Dis Clin North Am. 2004; 30(1):19-39.

16) Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006; 6(3):173-82.

17) Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. 1998; 92(9):3007-17.

18) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss

DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; 303(5663):1532-5.

19) Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood. 2009; 114(13):2619-22.

20) Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(16):6748-53.

21) Lim MB, Kuiper JW, Katchky A, Goldberg H, Glogauer M. J Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. Leukoc Biol. 2011; 90(4):771-6.

22) Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Riccieri V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med. 2011; 3(73):73ra19.

23) Dwivedi N, Upadhyay J, Neeli I, Khan S, Pattanaik D, Myers L, Kirou KA, Hellmich B, Knuckley B, Thompson PR, Crow MK, Mikuls TR, Csernok E, Radic M. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. Arthritis Rheum. 2012; 64(4):982-92.

24) M. Inouu, R. Nakashima, M. Enomoto, Y. Koiko, X. Zhao, S.H. Huang, J.N. Waldron, M. Ikura, F.F. Liu, S.V. Bratman, Plasma redox imbalance caused by albumin oxidation promotes lung-predominant NETosis and pulmonary cancer metastasis. Nat Commun. 2018; 9(1):5116.

25) Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC,

Niess AM. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. J Appl Physiol. 2014;117(3):325-33.

26) Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al. Position statement. Part one: immune function and exercise. Exerc Immunol Rev. 2011;17:6–63.

27) Campbell JP, Riddell NE, Burns VE, et al. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. Brain Behav Immun. 2009; 23(6):767–775.

28) Simpson RJ, Florida-James GD, Whyte GP, Black JR, Ross JA, Guy K. Apoptosis does not contribute to the blood lymphocytopenia observed after intensive and downhill treadmill running in humans. Res Sports Med. 2007; 15(3):157–174.

29) Beiter T, Fragasso A, Hartl D, Nieß AM. Neutrophil Extracellular Traps: A Walk on the Wild Side of Exercise Immunology. Sports Med. 2015; 45(5):625-40

30) Rossi FE, de Freitas MC, Zanchi NE, Lira FS, Cholewa JM. The Role of Inflammation and Immune Cells in Blood Flow Restriction Traini ngAdaptation: A Review. Front Physiol. 2018; 9;9:1376.

31) He F, Chuang CC, Zhou T, Jiang Q, Sedlock DA, Zuo L. Redox correlation in muscle lengthening and immune response in eccentric exercise. PLoS One. 2018; 13(12): 1-19.

32) Ortega E, Collazos ME, Maynar M, Barriga C, De la Fuente M. Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1993; 66(1):60–64.

33) Afanasiev SA, Egorova MV, Kutsykova TV, Popov SV. Influence of Fatty Acids on Oxygen Consumption in Isolated Cardiomyocytes of Ratswith

Ischemic or Diabetic Heart Disease. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2016; (2):97-101.

34) Conti FF, Sanches IC, Bernardes N, Shimojo GL, Figueroa DMT, Wichi RB et al . Influência dos hormônios sexuais no consumo de oxigênio de ratos. Rev Bras Med Esporte. 2014; 20(6): 421-423.

35) Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr. 2005;18:1440-1463.

36) Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Cloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 1979. 44:503-512.

37) Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. Arch Pathol Lab Med. 1980;104:179-183.

38)Sjaastad I, Sejersted O, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. J Appl Physiol. 2000;89:1445-1454.

39)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 Endocrinol Metab. 2002;282:H1327-1333.

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

41) 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.

42)Mezzani A, Corrà U, Giannuzzi P. Central adaptations to exercise training in patients with chronic heart failure. Heart Fail Rev. 2008; 13: 13-20.

43)Mckelvie RS. Exercise training in patients with heart failure: clinical outcomes, safety, and indications. Heart Fail Rev. 2008; 13: 3-11.

44) 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.

45)Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. J Am Soc Echocardiogr. 2004; 17:161-167.

46)Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 289:H1131-1136.

47) Fulghum K[1,2], Hill BG[1]. Metabolic Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Remodeling. Front Cardiovasc Med. 2018; 11;5:127.

48) Fergal Grace F, Herbert P, Elliott AD, Richards J, Beaumont A, Sculthorpe NF. High intensity interval training (HIIT) improves resting blood pressure, metabolic (MET) capacity and heart rate reserve without compromising cardiac function in sedentary aging men. Experimental Gerontology 2018; 109 (1): 75-81.

49) Syu GD, Chen HI, Jen CJ. Acute severe exercise facilitates neutrophil extracellular trap formation in sedentary but not active subjects. Med Sci Sports Exerc. 2013; Feb; 45(2):238-44.

50) Wiecek M, Szymura J, Maciejczyk M, Kantorowicz M, Szygula Z. Anaerobic Exercise-Induced Activation of Antioxidant Enzymes in the Blood of Women and Men. Front Physiol. 2018; 9:1006.

51) Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extrac ellular trapformation differ depending on the stimulus. J Leukoc Biol. 2012; 92(4):841-9.

52) Vittori LN, Tarozzi A, Latessa PM. Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities. Methods Mol Biol. 2019; 1909:183-197.

53) Landers-Ramos RQ, Jenkins NT, Spangenburg EE, Hagberg JM, Prior SJ. Circulating angiogenic and inflammatory cytokine responses to acute aerobic exercise in trained and sedentary young men. Eur J Appl Physiol 2014; 114: 1377–1384.

54) Falone S, Mirabilio A, Pennelli A, Cacchio M, Di Baldassarre A, Gallina S, et al. Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. Physiol Res 2010; 59: 953–961.

55) Pedersen BK. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. Med Sci Sports Exerc. 2012; 44: 392–396.

56) Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. Exp Diabetes Res. 2012; 2012: 941868.

57) Pedersen BK. Muscles and their myokines. J Exp Biol. 2011; 214 (Part

2): 337–346.

58) Haram, P. M., Kemi, O. J., Lee, S. J., Bendheim, M. Ø., Al -Share, Q. Y., & Waldum, H. L. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabol ic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovascular research. 2009; 81:723-32

59) Gillen, J.B., & Gibala, M.J. Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? Appl Physiol Nutr Metab. 2014; 201439(3):409-12.

60) Songstad, N. T., Kaspersen, K. H., Hafstad, A. D., Basnet, P., Ytrehus, K., & Acharya, G. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. PLoS One. 2015; 13;10(11):e0143095.

61) Gillen, J.B., Martin, B.J., MacInnis, M.J., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., & Gibala, M.J. Twelve weeks of sprint interval training improves indices of cardiometabolic health similar to traditional endurance training despite a fivefold lower exercise volume and time commitment. PLoS ONE. 2016; 11: e0154075.

62) Kessler, H.S., Sisson, S.B., & Short K. The potential for high-intensity interval training to reduce cardiometabolic disease risk. Sports Med. 2012; 42(6):489-509.

63) Evangelista, AL, Evangelista, R.A.G.T., Machado, A.F., Miranda, J.M.Q., Teixeira, C.V.L.S., Lopes, C.R., & Bocalini, D.S. Effects of High-Intensity Calisthenic Training on Mood and Affective Responses. JEPonline. 2017; 20(6):15- 23.

64) Hoshino, D., Yoshida, Y., Kitaoka, Y., Hatta, H., & Bonen, A. (2013). High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid

oxidation in rat red and white skeletal muscle. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism,38:326-33.

65) Holloway, T. M., Bloemberg, D., da Silva, M. L., Quadrilatero, J., & Spriet, L. L. High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2015; 308:R927-R34.

66) Powers, S.K., & Jackson, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev. 2008; 88(4): 1243-76.

67) Balcı, S. S., Pepe, H. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. Chin J Physiol, 2012; 55(4): 236-44.

68) Parker, L., Trewin, A., Levinger, I., Shaw, CS, Stepto, & Nigel K. Exercise intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. J Sci Med Sport. 2018; 21(4):416-421.

69) Silva, F. B., Romero, W. G., Carvalho, A. L. R. A., Souza, G. A. A., Claudio, E. R. & G., Abreu, G. R. Effects of treatment with chemotherapy and/or tamoxifen on the biomarkers of cardiac injury and oxidative stress in women with breast cancer. Medicine. 2017; 96(47): e8723.

70) Rosa-Lima, F.L., Lannes, L., Viana-Gomes, D., Pierucci, A.P., & Salerno, V.P. (2015). Protein carbonyl levels correlate with performance in elite field hockey players. Appl Physiol Nutr Metab. 2014; 40(7):683-8.

71) Jiji, R.S., Kramer, C.M., & Salerno M. Non-invasive imaging and monitoring cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. J Nucl Cardiol; 2012;

19:377–88.

72) Floc'h N, Kolodziejski J, Akkari L, et al. Modulation of Oxidative Stress by Twist Oncoproteins. Weitzman JB, ed. PLoS ONE. 2013; 8(8): e72490.

73) Maruoka H, Fujii K, Inoue K, Kido S. Long-term Effect of Ubiquinol on Exercise Capacity and the Oxidative Stress Regulation System in SAMP1 Mice. Journal of Physical Therapy Science. 2014; 26(3):367-371.

74) Jenni-Eiermann S, Jenni L, Smith S, Costantini D. Oxidative Stress in Endurance Flight: An Unconsidered Factor in Bird Migration. PLoS ONE. 2014; 9(5): e97650.

75) Stanojevic D, Jakovljevic V, Barudzic N, Zivkovic V, Srejovic I, Parezanovic Ilic K, Cubrilo D, Ahmetovic Z, Peric D, Rosic M, Radovanovic D, Djordjevic D. Overtraining does not induce oxidative stress and inflammation in blood and heart of rats. Physiol Res. 2016;65(1):81-90.

76) Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formationof neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2019 Jan 8. doi: 10.1038/s41418-018-0261-x. [Epub ahead of print]