

JOEL ALVES RODRIGUES

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE A CONTRATILIDADE
DE CARDIOMIÓCITOS E A EXPRESSÃO DE MICRORNAS 214 e 208
NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS SHR**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

JOEL ALVES RODRIGUES

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE A CONTRATILIDADE
DE CARDIOMIÓCITOS E A EXPRESSÃO DE MICRORNAS 214 e 208
NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS SHR**

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

APROVADA: 26 de julho de 2016.

Mauro Cesar Isoldi

Maria do Carmo Goveia Peluzio

Antônio Jose Natali
(Orientador)

A Deus, por cada segundo de vida.

À minha guerreira mãe, por todos os desafios superados.

À Jaqueline, por sempre acreditar nas vitórias.

A todos os meus amigos, pela companhia.

“Os aventureiros realizam suas conquistas e as demais pessoas os aplaudem. Saia sempre do lugar-comum.” (Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pois sem Ele meu caminho até aqui não teria sido possível.

À minha mãe e à minha irmã, pelo apoio, amor, carinho e pela motivação por todos os momentos desde o Vestibular até aqui.

À Jaqueline Salgado, namorada na graduação, noiva e esposa no mestrado, pela parceria em todos esses anos, por ser a minha maior motivadora e me fazer acreditar cada dia que posso ser alguém melhor.

Ao meu Professor e Orientador Antônio José Natali, por ter me iniciado no mundo da pesquisa, pelos ensinamentos, pela humildade, por ser preocupado com os alunos e por ser o exemplo de profissional no qual me espelho.

Ao meu amigo Leôncio Soares, por ter estado comigo quase todo esse período, em especial no último ano de treinamento, isolamento, transiente, escuro, claro e por todas as conversas.

Ao meu “filho” Danilo, bolsista de IC, por todo o suporte e trabalho.

Ao meu parceiro do Mestrado Leonardo Rezende, por todos os trabalhos das disciplinas, pelas conversas e pela amizade.

Ao Professor Thales Nicolau Prímola Gomes, por todos os conselhos, pelas oportunidades de novos conhecimentos, principalmente sobre a termorregulação e, por fim, pela “perseguição” em quase todas as minhas entrevistas e bancas, desde a minha primeira monitoria na graduação.

Ao pós-doutorando e meu amigo Tiago Leal, por ter dado um “up” no meu processo, pelos ensinamentos, pelas conversas e pelos risos.

Aos meus amigos e colegas da Turma do Mestrado de 2014, por terem feito esses dois anos serem de aprendizagem e de muitos risos (Robson, Romulo, Gustavo, Marina, Renata).

A Josi, Zezinha e Zé Horta, por todo apoio, carinho e paciência nos momentos de estresse e por dividirem momentos tão especiais nesses dois anos.

À doutoranda Deyliane Pereira, por todo suporte nas organizações documentais e pela torcida durante todo esse processo.

A todos os colaboradores do BioEX que estiveram comigo e me ajudaram de alguma forma (Samuel, Alexandre, Miguel, Judson, Marcinha, Filipe Drummond, Felipe Dambroz, Juliano, Paulo Skin, Aurora, Ana, Fran).

Às técnicas Claudia Moreira e Meilene Fidélis, pelo cuidado, carinho com nossas soluções e pelas conversas e amizade.

À Professora Edilamar Menezes de Oliveira, por abrir as portas do seu Laboratório e nos apresentar a Clarinha.

À Clara Nobrega, que nos recepcionou de forma especial, pelo trabalho e paciência em nos mostrar cada passo do processo da PCR na USP.

A todos os funcionários do DES, por, de alguma forma, terem participado desse processo, em especial ao Luís e à Maísa.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O coração	1
1.2. O cardiomiócito e a contração.....	3
1.3. Acoplamento excitação-contração.....	5
1.4. Hipertensão arterial.....	8
1.5. MicroRNAs e hipertensão.....	10
1.6. Exercício físico, hipertensão e microRNA	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Animais de experimentação e tratamentos.....	15
3.2. Treinamento físico	16
3.3. Desenho experimental	18

	Página
3.4. Medida da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca de repouso (FCR)	19
3.5. Isolamento dos cardiomiócitos.....	19
3.6. Soluções de isolamento.....	20
3.7. Solução de perfusão-tampão HEPES.....	21
3.8. Contratilidade celular.....	21
3.9. Medidas do transiente de cálcio	23
3.10. Expressão gênica de mRNA e miRNA	25
3.10.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	25
3.11. Quantificação de mRNA e microRNAs por PCR em tempo real.....	26
3.11.1. Genes relacionados com hipertrofia cardíaca	26
3.11.2. MicroRNAs.....	27
3.12. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Peso corporal, dos ventrículos, do ventrículo esquerdo e razões.....	29
4.2. Micro RNA 208 e expressão gênica de miosina de cadeia pesada (α e β -MCP)	31
4.3. Pressão arterial sistólica	32
4.4. Capacidade de exercício	34
4.5. Propriedades mecânicas.....	35
4.6. Transiente intracelular global de Ca^{2+}	37
4.7. MicroRNA - 214	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Peso corporal, dos ventrículos, do ventrículo esquerdo e razões ...	30
2. Micro RNA-208, α -MCP, β -MCP e α/β -MCP	31
3. Pressão Arterial Sistólica Final	33
4. Contração de cardiomiócitos.....	36
5. Transiente intracelular global de cálcio	38
6. Níveis de miRNA-214 no ventrículo esquerdo	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação do coração e sua integração com o sistema circulatório.....	2
2. Representação da estrutura do sarcômero	4
3. Representação da formação das pontes cruzadas e o deslizamento dos miofilamentos Fonte: Adaptado de HINKEN; SOLARO, 2007.....	5
4. Esquema representativo do processo de acoplamento excitação- contração. (BERS, 2014)	6
5. Registros das contrações dos cardiomiócitos isolados.....	22
6. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz.....	23
7. Gráficos representativos do transiente de Ca^{2+}	25
8. Expressão de microRNAs-208, α -MCP, β -MCP e α/β -MCP dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas).....	32
9. Pressão arterial sistólica dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas).....	34
10. Tempo total até a fadiga dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas).....	35

	Página
11. Contração de cardiomiócitos dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas).....	37
12. Transiente intracelular global de cálcio dos cardiomiócitos de animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas).....	39
13. Expressão de microRNAs no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). Nível de miRNA-214 (% do controle).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

ATPASE – Enzimas que catalisam a hidrólise do ATP

Ca²⁺ – Íon cálcio

% c.c.r – percentual de comprimento celular de repouso

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

Cl – Íon cloreto

EPM – Erro-padrão da média

EGTA – *Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) –N, N, N', N'-tetraacetic acid*

FURA2AM – Fura-2-acetoxymethyl ester

H – Grupo hipertenso (HT + HS)

HEPES – *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid*

HS – Grupo hipertenso sedentário

HT – Grupo hipertenso treinado

HZ – Hertz

K⁺ – Íon potássio

KCL – Cloreto de potássio L – Metro

m – Metro

µm – Micrômetro

min – Minuto

miR – MlcroRNA

mmHg – Milímetro de mercúrio
μM – Micromolar
mg – Miligrama
mL – Mililitro
ms – Milissegundo
mM – Milimolar
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
M – Molar
μL – Microlitro
Mg²⁺ – Íon magnésio
N – Grupo normotenso (NT+ NS)
NCX – Trocador de sódio-cálcio
NaCl – Cloreto de sódio
Na⁺ – Íon sódio
NS – Normotenso Sedentário
NT – Normotenso Treinado
PAS – Pressão arterial sistólica
PC – Peso corporal
PKA – Proteína quinase dependente de AMPc
pL – Picolitro
PLB – Fosfolambam
PV – Peso dos ventrículos
PV/PC – Peso dos ventrículos em relação ao peso corporal
PVE/PC – Peso dos ventrículos esquerdo em relação ao peso corporal
RyR2 – Canais receptores de rianodina
SED – Grupo sedentário (HS + NS)
SERCA2 – Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*
TREI – Grupo treinado (HT+NT)
TTF – Tempo total de exercício até a fadiga
VD – Ventrículo direito
VE – Ventrículo esquerdo
VMC – Velocidade máxima de corrida
α-MCP – Alpha miosina de cadeias pesadas de miosina (MCP)
β-MCP – Beta miosina de cadeias pesadas de miosina (MCP)

RESUMO

RODRIGUES, Joel Alves, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão de microRNAs 214 e 208 no ventrículo esquerdo de ratos SHR.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientador: Thales Nicolau Prímola Gomes.

Neste estudo, investigaram-se os efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão de microRNAs (miRNAs) no ventrículo esquerdo (VE) de ratos hipertensos. Ratos espontaneamente hipertensos e Wistar normotensos (idade de 16 semanas) foram separados aleatoriamente em quatro grupos: hipertenso sedentário (HS), hipertenso treinado (HT), normotenso sedentário (NS) e normotenso treinado (NT). Os animais dos grupos HT e NT foram submetidos ao treinamento de corrida em esteira, cinco dias/semana, uma hora/dia, em intensidade de 60-70% da velocidade máxima de corrida, durante oito semanas. Após esse período, avaliaram-se: capacidade física, pressão arterial sistólica (PAS), pesos corporal (PC), dos ventrículos (PV) e do VE (PVE), contratilidade e transiente intracelular de cálcio de cardiomiócitos do VE, expressão gênica de mRNA de miosinas de cadeia pesada (α e β -MCP) e miRNAs-214 e 208 no VE. Os resultados indicaram que a hipertensão aumentou o PVE, as relações PV/PC e PVE/PC, a expressão de miR-208, β -MCP e miR-214, mas

reduziu a relação α/β -MCP nos animais hipertensos em relação aos normotensos. O programa de exercício aumentou a capacidade física dos normotensos e hipertensos e reduziu a PAS nos animais hipertensos. Adicionalmente, melhorou a contratilidade celular nos animais normotensos, pois diminuiu o tempo de 50% de relaxamento celular e demonstrou tendência em reduzir o tempo para pico de contração. Também, diminuiu o tempo para o pico nos animais normotensos e o tempo para 50% de decaimento do transiente de Ca^{2+} nos animais hipertensos. Além disso, aumentou a expressão de miR-208 e de miR-214, independentemente da hipertensão. Concluiu-se que o exercício aeróbico de intensidade moderada intensidade melhorou discretamente o transiente global de cálcio e não causou nenhum dano à contratilidade dos cardiomiócitos de ratos hipertensos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Joel Alves, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2016. **Effects of aerobic training on the contractility of cardiomyocytes and on the expression of microRNAs 214 and 208 in the left ventricle of SHR rats.** Adviser: Antônio José Natali. Co-Adviser: Thales Nicolau Prímola Gomes.

This study investigated the effects of aerobic training on the contractility of cardiomyocytes and on the expression of microRNAs in the left ventricle (LV) of hypertensive rats. Sixteen-week old spontaneously hypertensive and normotensive Wistar rats, were randomly divided into four groups: sedentary hypertensive (HS); trained hypertension (HT); sedentary normotensive (NS); normotensive trained (NT). Animals of HT and NT groups were subjected to a running training program on a treadmill, 5 days/week, one hour/day at 60-70% of maximum running velocity, for 8 weeks. After this period, physical capacity, systolic blood pressure (PAS), body (BW), ventricles (VW) and LV (LVW) weights, cell contractility and the calcium transient of left ventricular myocytes, and the gene expression of myosin heavy chain mRNA (α and β -MCP) and miRNAs- 214 and 208 in the left ventricle were assessed. The results showed that hypertension increased LVW, PV/BW, LVW/BW, and the expression of miR -208, and of β -MCP as well as the α / β -MCP, however, it increased the expression of miR-214 independently of exercise training. The

exercise program increased the physical capacity of normotensive and hypertensive rats. In addition, it reduced PAS in hypertensive rats. Moreover, exercise training improved cell contractility in normotensive animals, as it reduced the time to 50% cell relaxation and there was a tendency to reduce the time to peak of contraction. Furthermore, exercise training also reduced the time to peak of the calcium transient in normotensive animals, and reduced the time to 50% decay in hypertensive animals. Exercise training also increased the expression of miR-208 and miR-214 independently of hypertension. In conclusion, the moderate-intensity exercise training improved slightly the global calcium transient and caused no damage to the contractility of LV myocytes in hypertensive rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O coração

O coração funciona com uma bomba contrátil-propulsora do aparelho circulatório, um sistema fechado, sem comunicação externa. O sistema circulatório é composto pelo coração e pulmões e por uma rede de capilares, arteríolas, veias e vênulas por onde o sangue circula (GRAAFF, 2001; VALE, 2013).

O coração possui quatro câmaras (Figura 1), dois átrios e dois ventrículos. Os átrios são responsáveis por receber e impulsionar o sangue para os ventrículos. O sangue venoso advindo do corpo é recebido pelo átrio direito, já o átrio esquerdo recebe sangue oxigenado (arterial) dos pulmões. Os ventrículos recebem sangue dos átrios e têm a função de distribuí-lo para a circulação pulmonar (ventrículo direito) e para a circulação sistêmica, todo o corpo (ventrículo esquerdo) (MCARDLE et al., 2011).

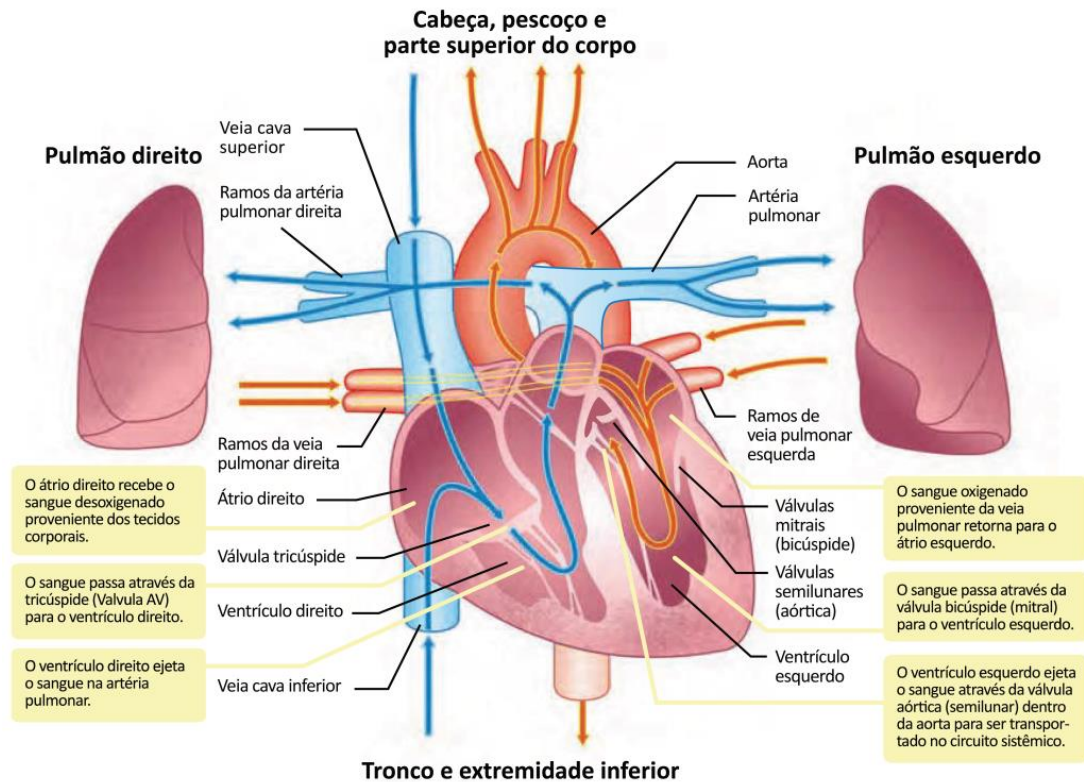


Figura 1 – Representação do coração e sua integração com o sistema circulatório.

Fonte: VALE, 2013.

O bombeamento do sangue pelo coração é um evento cíclico, em que ocorrem a contração e o relaxamento muscular ou vice-versa.

O ciclo cardíaco inicia-se com a geração espontânea do potencial de ação no nódulo sinoatrial e se propaga através dos átrios até o nódulo atrioventricular (nódulo AV). Ocorrerá retardo de 0,10 segundo depois que o impulso elétrico se propaga através dos átrios, para que estes se contraiam e impulsionem sangue para os ventrículos. O nódulo AV dá origem ao feixe de His, e este transmite o impulso rapidamente através dos ventrículos por intermédio de fibras condutoras especializadas chamadas de fibras de Purkinje. Essas fibras formam ramos distintos do feixe que penetram nos ventrículos direito e esquerdo. As fibras de Purkinje transmitem o impulso cerca de seis vezes mais rapidamente que a velocidade de transmissão das fibras musculares dos ventrículos normais. Cada célula ventricular é estimulada dentro de 0,06 segundo após a penetração do impulso dentro

dos ventrículos, permitindo, assim, contração subsequente unificada e simultânea de ambos os ventrículos. Após a contração e esvaziamento, os ventrículos relaxam e todo o processo reinicia (MCARDLE et al., 2011).

1.2. O cardiomiócito e a contração

O miocárdio é constituído por tecido muscular, vasos, fibroblastos, fibras colágenas e material amorfo e intersticial. O principal constituinte do tecido muscular cardíaco é o cardiomiócito, constituído de células estriadas contráteis (MACLEOD et al., 2011; QUINTÃO JÚNIOR et al., 2012) ligadas entre si e à matriz extracelular, por meio de discos escalariformes, junções comunicantes e fibras de colágeno que permitem a transmissão de sinais bioquímicos e elétricos e a realização de força durante a contração (MOLINARO, 2010).

As unidades contráteis do cardiomiócito são denominadas sarcômeros. A estrutura do sarcômero é apresentada na Figura 2. Os filamentos de actina (finos) são ancorados nos discos Z em cada extremidade. A actina é uma proteína globular com duas cadeias helicoidais de filamento fino, sendo o principal sítio para regulação do comprimento do sarcômero (HALL; GUYTON, 1997; MCARDLE et al., 2011). É composta por dois componentes denominados complexo troponina-tropomiosina. A tropomiosina é um filamento longo flexível em α -hélice aderido em forma espiral ao filamento de actina, responsável por “cobrir” pontos ativos nos filamentos de actina. Esses filamentos em estado de repouso bloqueiam os pontos ativos da actina em conjunto com a troponina, impedindo a ligação actina-miosina (contração). A troponina é composta por três subunidades: Troponina-C (afinidade pelos íons de Ca^{2+} - TnC), Troponina-I (afinidade com a actina – TnI) e a Troponina-T (afinidade com a tropomiosina –TnT) (FLICKER et al., 1982).

Os filamentos de miosina (grossos) são ancorados na banda M ao centro e nos discos Z em cada extremidade pela titina. A miosina é um transdutor químico-mecânico da contração. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas (MHC) e quatro cadeias leves (MLC) (MORKIN, 1993). Essas cadeias apresentam duas isoformas, a alfa,

denominada miosina de cadeia pesada rápida (α - MHC), que é consumidora de mais energia de ATP e desenvolve força rápida; e a beta, chamada de miosina de cadeia pesada lenta (β - MHC), isoforma com menor gasto energético e de característica lenta (RAFALSKI et al., 2007).

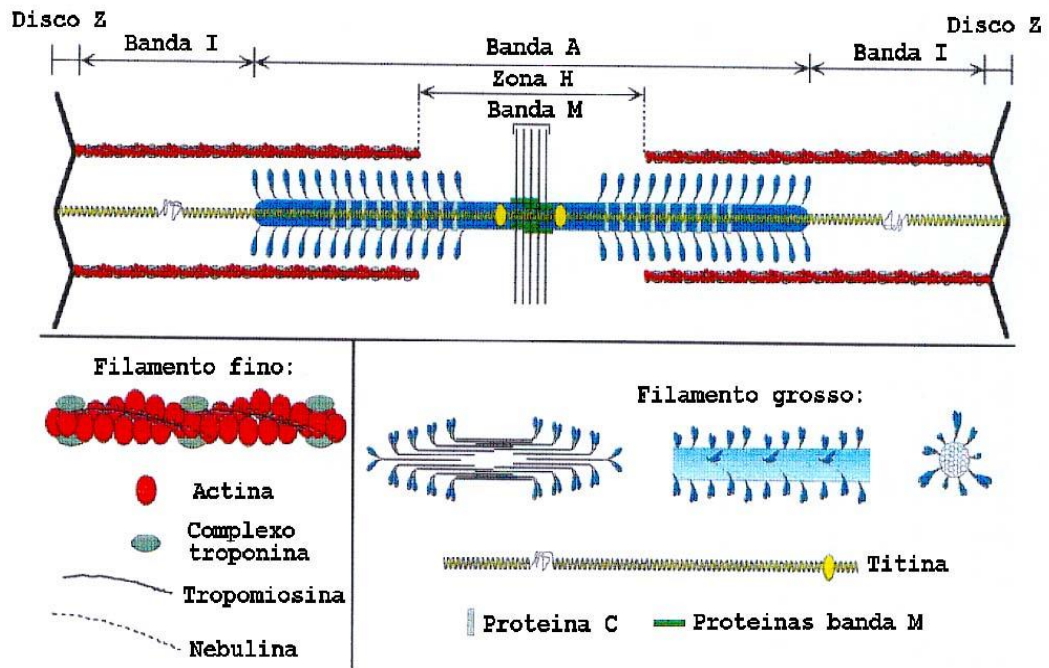


Figura 2 – Representação da estrutura do sarcômero.
 Fonte: Fisiologia humana: Um enfoque integrado (2008).

A contração é o resultado da interação entre os filamentos de actina e miosina, esta dependente de ATP, que provoca o encurtamento do sarcômero (MACLEOD et al., 2011). A Figura 3 ilustra a interação entre miosina/actina, a formação das pontes cruzadas e o deslizamento dos miofilamentos (HAMDANI et al., 2008).

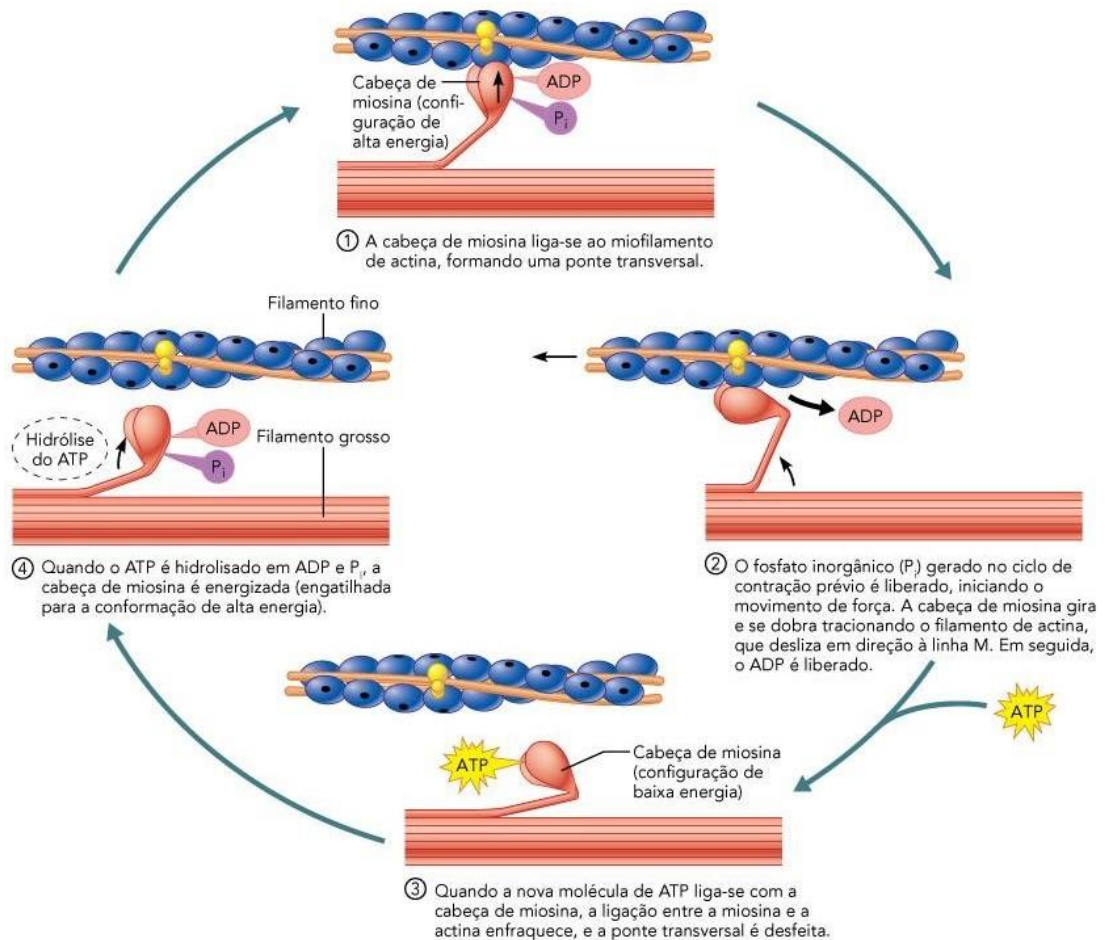


Figura 3 – Representação da formação das pontes cruzadas e o deslizamento dos miofilamentos
 Fonte: Adaptado de HINKEN; SOLARO, 2007.

1.3. Acoplamento excitação-contração

Acoplamento excitação-contração, ilustrado na Figura 4, é o processo que envolve a excitação elétrica dos miócitos para gerar a contração do coração. O segundo mensageiro essencial para a atividade elétrica cardíaca e para a ativação dos miofilamento é o cálcio (Ca^{2+}), que está envolvido em todo o processo de excitação-contração (BERS, 2001a).

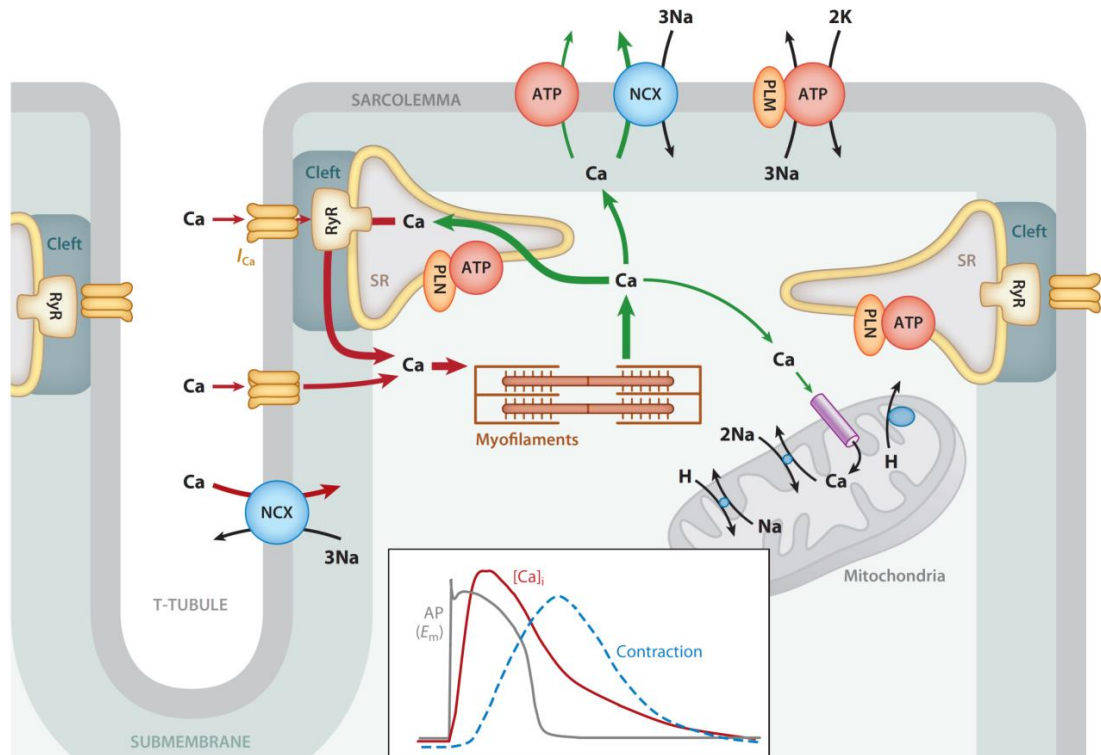


Figura 4 – Esquema representativo do processo de acoplamento excitação-contracção. As setas vermelhas representam o processo de entrada de Ca^{2+} no citosol (canais do tipo L e RyR2) até a contracção muscular. As setas verdes representam o recolhimento de Ca^{2+} pelas proteínas SERCA2a (ATP/PLN), NCX e pela via mitocondrial. O quadro no meio do esquema representa de cinza o potencial de acção, de vermelho a concentração de Ca^{2+} ou transiente de Ca^{2+} e azul representa a contracção muscular (BERS, 2014).

Durante o potencial de acção cardíaco ocorre a despolarização do sarcolema, que levará Ca^{2+} para o interior dos cardiomiócitos por meio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (tipos L e do tipo T) e de pequena quantidade entre via canais trocadores de sódio e cálcio (NCX) (BERS, 2002). Com influxo de Ca^{2+} , os canais de Ca^{2+} induzidos por Ca^{2+} chamados de receptores de rianodina (RyR2) são ativados e iniciam liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). E pequena quantidade do influxo Ca^{2+} pode contribuir na ativação dos miofilamentos diretamente (BERS, 2001b). Com a sincronia rápida de entrada Ca^{2+} mais a quantidade liberada pelo RS, ocorre aumento de Ca^{2+} sistólico, levando o Ca^{2+} a fazer múltiplas ligações.

Uma das mais importantes funções do Ca^{2+} sistólico é a ligação com a proteína TnC. No momento em que o Ca^{2+} se liga à TnC, os miofilamentos são ativados de forma cooperativa, resultando na contração do cardiomiócito (BERS, 2000). Para que ocorra o relaxamento muscular, é necessária a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , permitindo que o Ca^{2+} desassocie dos miofilamentos. Esse processo de declínio na concentração intracelular de Ca^{2+} ocorre com o transporte de Ca^{2+} por quatro vias: 1) a cálcio ATPase do RS (SERCA2a), que é responsável por cerca de 93% do recolhimento de todo Ca^{2+} para o interior do retículo sarcoplasmático; 2) NCX, responsável por 6% de extrusão do Ca^{2+} do citosol; 3) via cálcio ATPase do sarcolema, responsável por 0,5%; e 4) via uniporte mitocondrial, com 0,5% (BERS, 2014). Esses percentuais são mensurados em ratos.

A SERCA2a, o RyR2 e o NCX são as principais proteínas reguladoras de Ca^{2+} no processo de acoplamento excitação-contração. A SERCA2a é responsável pelo controle do Ca^{2+} intracelular no músculo cardíaco, transportando esse íon do citosol para o interior do RS e levando o músculo cardíaco ao relaxamento. A SERCA2a é regulada pela proteína fosfolambam (PLB). Quando a PLB se liga à SERCA2a, forma-se um complexo PLB-SERCA2a e, assim, ocorre a inibição da bomba, isto é, não há transferência de Ca^{2+} citosólico para o interior do RS. No momento que PLB sofre fosforilação, há desacoplamento do complexo PLB-SERCA2a, causando a ativação da bomba de recolhimento de cálcio (ARAI et al., 1994; RESENDE et al., 2012).

Os canais de RyR2 localizam-se no retículo sarcoplasmático com a função de liberar Ca^{2+} . A liberação pode ser discreta com poucos canais abertos, chamados de *sparks* de Ca^{2+} (CHENG et al., 1993), ou em maiores eventos, como o transiente intracelular global de Ca^{2+} que representa a diferença do valor de Ca^{2+} basal para o Ca^{2+} final no momento da contração, valor esse variando de 100 nM no momento da diástole para 1 μM na fase final, chamada de sístole. O resultado desse aumento de Ca^{2+} no citosol levará à ligação de Ca^{2+} aos miofilamentos e ocorrerá a contração dos cardiomiócitos (BERS, 2001ac; CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013).

Os canais NCX representam o segundo canal mais importante no controle do Ca^{2+} intracelular por fazer o transporte ativo secundário de Ca^{2+}

para fora do citosol. Os NCX fazem a troca de um íon de Ca^{2+} para fora da célula em troca de três íons Na^+ . Com essa troca, os NCX auxiliam a retirada do Ca^{2+} , contribuindo para o relaxamento do músculo cardíaco (BERS, 2001d; SCHILLINGER et al., 2003).

O processo de acoplamento excitação-contração é muito bem coordenado para promover a contração e relaxamento dos cardiomiócitos. Caso ocorra alguma desregulação de alguma das proteínas envolvidas, todo o processo pode ser prejudicado, levando, por exemplo, a arritmias e falhas cardíacas (WEHRENS et al., 2005; GEORGE, 2008; CHEN et al., 2013).

1.4. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é considerada condição clínica multifatorial e é diagnosticada quando os valores de pressão sistólica ≥ 140 mmHg e de pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg são atingidos. Em grande parte, a hipertensão arterial está associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais/estruturais de órgão-alvo, sendo agravados por outros fatores de risco, como diabetes melito, obesidade, tabagismo. No Brasil, cerca de 32,5% (36 milhões) dos indivíduos adultos são hipertensos. Juntamente com a diabetes melito, a hipertensão arterial provoca complicações que têm impacto elevado na sociedade, a exemplo de perda de produtividade no trabalho e da renda familiar (MALACHIAS et al., 2016).

A hipertensão arterial causa remodelação cardíaca, mais especificamente hipertrofia ventricular concêntrica, que é caracterizada por aumento da massa contrátil, fibrose intersticial, morte celular, disfunção cardíaca, desregulação de proteínas e por reexpressão de genes fetais: [ex.: fator natriurético atrial (FNA), α -actina esquelética e β -miosina de cadeia pesada (β -MCP)]. Em seu estágio inicial, o ventrículo hipertrofiado é capaz de compensar um aumento de carga de trabalho, no entanto, em fases mais avançadas, as propriedades diastólicas e sistólicas do ventrículo esquerdo se tornam prejudicadas, o que causa descompensação, levando à insuficiência cardíaca. A hipertrofia concêntrica é causada por sobrecarga pressórica, causada pelo aumento da pós-carga (elevado pico de tensão sistólica). A resposta para esse aumento pressórico ocorre com incremento

do diâmetro dos miócitos, no formato de sarcômeros em paralelo, o que leva a aumento na espessura da parede do VE, gerando menor cavidade. Essa menor cavidade ocasionará, entre outros danos: menor débito cardíaco e maior trabalho do sistema cardiovascular (DOGGRELL, 1998; DOGGRELL; BROWN, 1998; LORELL; CARABELLO, 2000; MILL; VASSALLO, 2001; KAHAN, 2005; BERNARDO et al., 2010)

A hipertensão arterial causa vários danos ao miocárdio. Em nível celular, por exemplo, a hipertrofia patológica pode causar morte celular (apoptose, necrose), e os miócitos podem ser substituídos por colágeno, especificamente do tipo 1. O acúmulo excessivo de colágeno enrijece os ventrículos, ocorrendo diminuição das funções de contração e relaxamento (RITTER; NEYSES, 2003; ALMEIDA et al., 2012). Ainda, em nível celular, a hipertensão aumenta a duração do potencial de ação, “Sparks” de Ca^{2+} , amplitude, tempo total até o pico e de relaxamento do transiente de cálcio em animais SHR (BROOKSBY et al., 1993; RITTER; NEYSES, 2003; CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2014). Em nível molecular, a expressão do cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e de fosfolambam (FLBser16), que são proteínas reguladoras do cálcio e moduladoras do ciclo contração-relaxamento, são diminuídas pela hipertensão. A expressão do trocador sódio-cálcio (NCX) parece ser aumentada e ocorre redução da fosfolambam total (FLBt), e receptores de ryanodina (RyR2) parecem não sofrer modificações na hipertensão arterial (RITTER; NEYSES, 2003; BERNARDO et al., 2010; CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013, 2014).

Os primeiros estudos sobre hipertensão arterial usando modelos animais foram feitos com coelhos hipertensos (ALEXANDER et al., 1954) e hipertensão hereditária em ratos (SMIRK; HALL, 1958). O rato espontaneamente hipertenso (*Spontaneously Hypertensive Rat* – SHR) é o modelo de hipertensão arterial mais utilizado na literatura para pesquisa sobre hipertensão. Tal modelo foi criado através de cruzamento entre irmão-irmã (*Brother-Sister Breeding*) de animais sensíveis ao sódio até surgir uma raça 100% hipertensa (OKAMOTO; AOKI, 1963). Os animais SHR começam a desenvolver hipertensão arterial com aproximadamente cinco semanas de vida. Entre a 7^a e a 15^a semana já apresentam níveis de alterações

com hipertensão espontânea, mas o platô é atingido entre 20 e 28 semanas (OKAMOTO; AOKI, 1963; TRIPPODO et al., 1981). A partir dos três meses de idade, os animais SHR iniciam a fase de hipertensão arterial com hipertrofia cardíaca que progride para insuficiência cardíaca do 18° aos 24° meses de vida (DOGGRELL; BROWN, 1998).

1.5. MicroRNAs e hipertensão

Há pouco mais de 20 anos, descobriu-se que alguns ácidos ribonucleicos (RNAs) auxiliavam no controle da tradução de proteínas. Foram chamados de microRNAs (miRNAs) esses novos RNAs que agiam ligando-se ao RNAm, diminuindo sua expressão e, conseqüentemente, a síntese da proteína (LEE et al., 1993).

Os MicroRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos que funcionam como silenciador gênico pós-transcricional em plantas e animais. Os miRNAs exercem sua regulação ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros (RNAm). Esse processo leva à redução de níveis das proteínas-alvo (KIM, 2005).

Especificamente falando do tecido cardíaco, muitos são os miRNAs envolvidos em todos os estágios de desenvolvimento do coração. No coração adulto saudável existem alguns miRNAs que são altamente expressos e possuem papel fundamental para manutenção do estado normal ou doente. Esses miRNAs incluem: miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143, miR-208 e miR-499 (NEVES et al., 2014; ROMAINE et al., 2015).

Na hipertrofia cardíaca fisiológica ou patológica, os miRNAs sofrem alterações na sua expressão, as quais estão relacionadas ao remodelamento cardíaco (ROMAINE et al., 2015). Na hipertensão arterial, que é uma das causadoras de hipertrofia patológica, também ocorre desregulação de vários miRNAs, como miR-214, miR-133, miR-21, miR-29c, miR-23, miR-18b, miR-1, miR-195, miR-199, miR-208, entre outros (DONG; YANG, 2011). Os miRNAs 208 e 214 têm papel fundamental na hipertensão arterial e sofrem modificações com a hipertrofia patológica. O miR-208 é específico do tecido cardíaco e regula o gene da miosina de cadeia pesada

do tipo alfa (α -MCP). A expressão de α -MCP é inversamente proporcional à β -MCP (DONG; YANG, 2011). Por exemplo, a inibição do miR-208a induziu reversão nas cadeias pesadas de miosina (MCP) durante falha cardíaca em animais hipertensos, minimizando o remodelamento deletério e prevenindo a deterioração da função cardíaca e morte (MONTGOMERY et al., 2011).

O miR-214 é uma estrutura genômica altamente conservada entre os vertebrados. Quando altamente expresso, o miR-214 é resposta para estresse cardíaco, incluído sobre carga de pressão, infarto do miocárdio e superexpressão de cálcio/calmodulina sensível à fosforilação de calcineurina (AURORA et al., 2012). Um estudo com camundongos transgênicos com superexpressão de miR-214 indicou que esses animais desenvolveram hipertrofia cardíaca a partir do 3º mês, apresentando maior razão entre peso do coração pelo peso corporal (Pc/Pc) e maior razão entre peso do coração pelo peso da tibia (Pc/Tb) em relação ao grupo normal. Com a superexpressão de miR-214, ainda foi observado aumento na expressão de genes fetais, como ACTA1, MYH7 e NPPA, e cerca de 30% dos animais morreram por volta de 6 a 12 meses de vida (YANG et al., 2014). Esse resultado reforça a função deletéria da superexpressão de miR-214 no coração. O miR-214 também está envolvido no processo de contração muscular do tecido cardíaco. Estudo recente indicou que há grande correlação negativa entre SERCA2a e miR-214 em animais com insuficiência cardíaca (MELO et al., 2015a).

Todavia, pouco se sabe sobre a expressão dos miRs 208 e 214 na hipertensão arterial de animais SHR. É possível que a hipertensão arterial promova aumento da expressão do miR-208, provocando desregulação na expressão de α/β -MCP. Em relação ao miR-214, até o momento o seu comportamento em animais SHR não é conhecido.

1.6. Exercício físico, hipertensão e microRNA

A recomendação de atividade física para hipertensos, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010), é manter a prática regular de atividade física aeróbica, como caminhadas por, pelo menos, 30 minutos por dia três vezes/semana para prevenção e diariamente para tratamento. A

intensidade deve ser até 70% da frequência cardíaca máxima ou de pico, recomenda-se a faixa entre 60% e 70%, sendo considerada a faixa ideal para o treinamento aeróbio que visa à prevenção e ao tratamento da hipertensão arterial. A prática de exercício de baixa intensidade (40% a 50% da frequência cardíaca) por um ano, por exemplo, foi capaz de reduzir em até 7 mmHg a pressão sistólica durante o dia e de 4 mmHg durante a noite, em um prazo de 24 horas após o exercício, contudo nenhuma mudança na pressão arterial diastólica foi observada (SEALS; REILING, 1991).

Trabalhos realizados com exercício aeróbico de baixa intensidade em animais SHR têm mostrado a capacidade de reduzir a pressão arterial, a frequência cardíaca, a deposição de colágeno através do aumento do óxido nítrico e a redução do estresse oxidativo (HORTA et al., 2005; ROQUE et al., 2013). Em nível celular, CARNEIRO-JÚNIOR et al. (2013) demonstraram melhora nos parâmetros de contratilidade e do transiente de cálcio em animais SHR submetidos ao treinamento de baixa intensidade. Observaram aumento da velocidade de encurtamento e relaxamento celular e da amplitude do transiente de cálcio e redução do tempo até o pico do transiente de cálcio e aumento da velocidade de decaimento do transiente de cálcio.

Existem poucos trabalhos que evidenciam o efeito do exercício físico de alta intensidade na hipertensão. Em animais SHR, esse exercício é capaz de reduzir a PAS com treinos diários de 25-30 minutos (ALMEIDA et al., 2012; PETRIZ et al., 2015), todavia não alterou a quantidade de óxido nítrico (NO) no endotélio (BATTALUT et al., 2016). No entanto, esse mesmo exercício físico pode ser considerado importante fator de risco em vez de intervenção terapêutica (DA COSTA REBELO et al., 2012), se executado em níveis extremos prejudiciais ao coração (BENITO et al., 2011). Entretanto, parece ainda haver algumas contradições sobre exercício físico de moderada a alta intensidade.

Alguns trabalhos têm evidenciado relação entre microRNAs, exercício físico e coração (CALLIS et al., 2009; BANZET et al., 2013; MOOREN et al., 2014; FERNANDES et al., 2015; SOCI et al., 2016). O exercício aeróbico de natação causou decréscimo na fibrose cardíaca e inibição de colágeno

através de aumento de miR-29c, aumento na angiogênese através da inibição de miR-216 e modulação do sistema renina-angiotensina através dos miR-27a/b e 143. A natação também foi capaz de aumentar o crescimento de cardiomiócitos através da regulação de miR-1, -21, -27a/b, -29a/c, -30e, -124, -126, -133, -143, -150 e -222. Já o exercício aeróbico de esteira influenciou no remodelamento cardíaco e na angiogênese, através da regulação da expressão dos miR-1, -26, -27a, -133, -143, -150 e -222 (FERNANDES et al., 2015). Em outro estudo, mostrou-se que o exercício aeróbico também promove redução na expressão de miR-208a, protegendo o coração de hipertrofia patológica (NEVES et al., 2014). Em animais Wistar normotensos, foram observadas melhoras nas funções cardíacas, como menor tempo de relaxamento e contração, melhora da captação de Ca^{2+} , com aumento da proteína SERCA-2a e redução da expressão de miR-214 (MELO et al., 2015b). Em outro estudo com exercício resistido de moderada intensidade, mostrou-se que ele foi capaz de restaurar e reduzir a expressão do miR-214, bem como normalizar a concentração intracelular de Ca^{2+} em animais pós-infarto do miocárdio (MELO et al., 2015a). Portanto, apesar de alguns trabalhos na literatura mostrarem as alterações dos microRNAs no coração em resposta ao exercício físico, pouco se sabe sobre a expressão desses microRNAs em animais SHR em resposta ao treinamento físico de intensidade moderada em esteira.

Assim, este estudo foi desenhado para investigar os efeitos do treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão dos microRNAs miR- 214 e miR-208 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos.

A hipótese deste estudo é de que o treinamento aeróbico de intensidade moderada é capaz de reverter os danos causados pela hipertensão na contratilidade de miócitos do VE e diminuir a expressão dos miR- 214 e miR-208 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar os efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão de microRNAs 214 e 208 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos.

2.2. Objetivos específicos

Verificar se um programa de treinamento aeróbico com corrida em esteira de intensidade moderada aplicado a ratos hipertensos por oito semanas afeta:

- Os níveis de pressão arterial sistólica.
- As massas cardíaca e ventricular.
- A contratilidade de miócitos isolados do ventrículo esquerdo.
- O transiente intracelular global de cálcio de miócitos isolados do ventrículo esquerdo.
- A expressão dos microRNAs -214 e 208 no ventrículo esquerdo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação e tratamentos

Foram utilizados 32 animais (*Rattus norvegicus*), sendo 16 ratos Wistar e 16 SHR, com 16 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 29/2014).

Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola), onde receberam água e ração comercial *ad libitum*, sendo mantidos em ambiente com temperatura média de 22 °C e regime de luminosidade de 12 horas de escuridão e 12 de claridade.

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos, com oito animais em cada, conforme a seguir:

- NS (normotenso sedentário Wistar): ratos normotensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por oito semanas.
- NT (normotenso treinado Wistar): ratos normotensos que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por oito semanas.

- HS (hipertenso sedentário SHR): ratos hipertensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por oito semanas.
- HT (hipertenso treinado SHR): ratos hipertensos treinados que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por oito semanas.

3.2. Treinamento físico

O programa de treinamento físico com corrida foi realizado em uma esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), cinco dias por semana, uma hora por dia, durante oito semanas, no Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Antes do início do treinamento, os animais foram adaptados à esteira rolante durante cinco dias, 10 min/dia, 0° de inclinação, na velocidade de 5 m/mim. Após 48 horas, todos os animais foram submetidos a um teste progressivo em esteira rolante, para determinar a velocidade máxima de corrida (VMC), começando a 5 m/mim, 0° de inclinação, com incrementos de 3 m/mim a cada três minutos até a fadiga de cada animal. O momento da fadiga foi definido, sendo o teste interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira.

A intensidade do protocolo de treinamento foi monitorada através do aumento progressivo do tempo e da velocidade de corrida, atingindo uma hora/dia, 0° de inclinação e 60% da VMC dos animais dos grupos NT (normotenso treinado) e HT (hipertenso treinado) a partir da terceira semana de treinamento até o final da oitava semana (adaptado de MELO et al., 2003; MORAES-SILVA et al., 2010).

Os animais iniciaram o programa de exercício correndo a uma intensidade de 5 a 6 m/min, 0° de inclinação, durante 10 minutos, no primeiro dia. Na primeira semana, a duração foi aumentada em cinco minutos por dia, sendo mantida a intensidade. Na segunda semana, a duração continuou sendo aumentada em cinco minutos e à intensidade de 2% da VMC por dia, de maneira que a partir do primeiro dia da terceira até o

final da quarta semana os animais correram a uma intensidade de 60% (~ 18 a 22 m/min) da VMC, durante 60 minutos.

Os testes na esteira rolante para determinação da VMC foram realizados em cada animal dos grupos experimentais antes do treinamento e, no final da quarta semana, nos animais dos grupos treinados (NT e HT) para avaliação do tempo total de exercício até a fadiga (TTF) e redefinição da intensidade de treinamento.

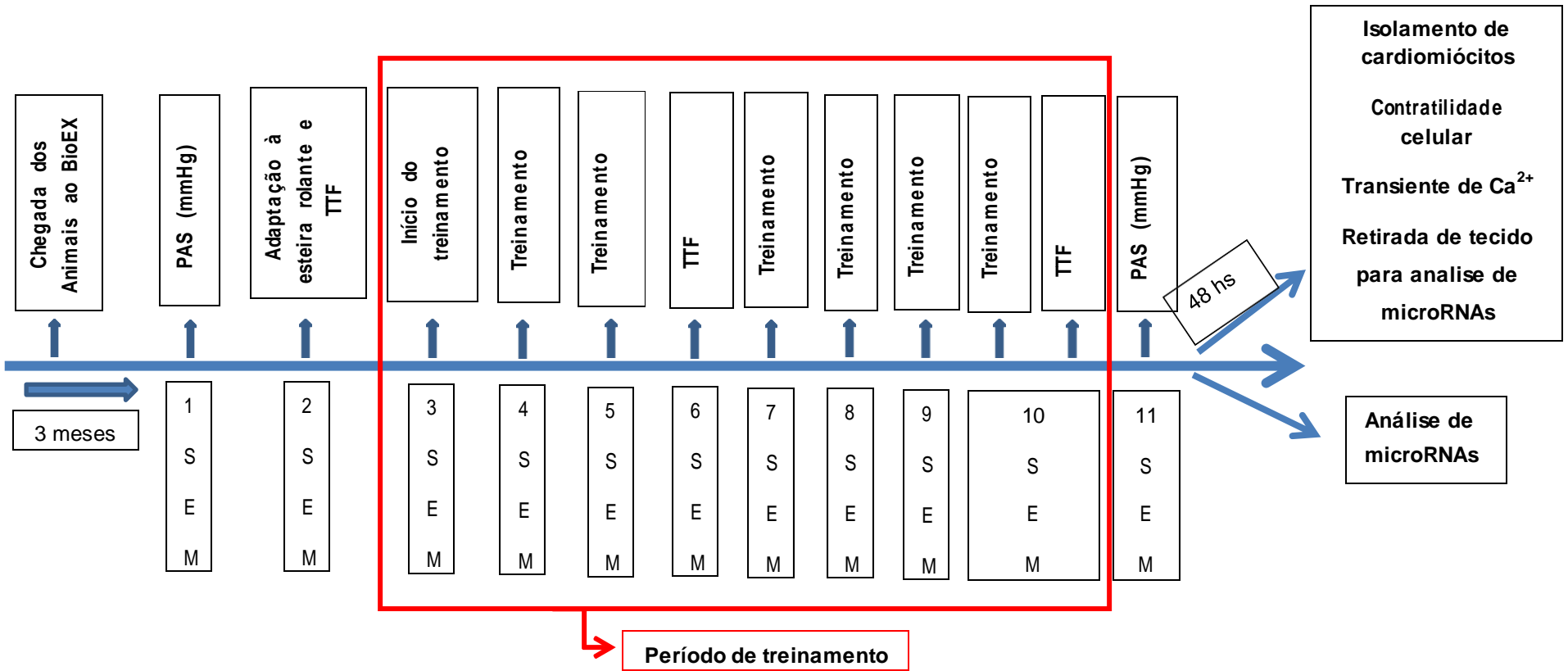
Quarenta e oito horas após a última sessão de treino, os testes foram repetidos em todos os animais dos grupos experimentais, para avaliação dos efeitos do treinamento físico sobre a capacidade de corrida (TTF).

O TTF foi realizado em esteira rolante com estímulo elétrico. O teste iniciou com os animais na esteira com a velocidade de 5 m/min por 3 min. A partir dessa fase, foi aumentada a velocidade a 3 m/min a cada três minutos, sendo o término do teste constatado quando o animal não reagisse por 10 segundos sobre a plataforma elétrica.

Durante o período experimental, os animais dos grupos sedentários NS e HS foram manuseados e colocados na esteira rolante três dias/semana, 10 min/dia, 0° de inclinação, a uma intensidade de 5 m/min. Esse procedimento foi realizado com os animais dos grupos sedentários para expô-los a condições experimentais similares àquelas dos grupos treinados, sendo a duração e intensidade utilizadas não insuficientes para provocar adaptações (BALDWIN, 1977).

3.3. Desenho experimental

18



3.4. Medida da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca de repouso (FCR)

A aferição da PAS de todos os animais foi realizada no final de cada período experimental e no início para os grupos experimentais treinados NT e HT, por meio de sistemas não invasivos, sem a utilização de nenhum método anestésico. Por um período de cinco dias antes da realização das medidas cardiovasculares, todos os ratos foram aclimatados aos aparatos e às condições utilizadas para as medidas da PAS. Os registros da PAS foram realizados em dias diferentes, sempre no mesmo horário do dia, em sala específica, ambiente calmo, com temperatura e luminosidade devidamente controladas, sem influência de nenhum agente externo.

A medida da PAS foi realizada por meio da pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo devidamente calibrado e apropriado para medidas em ratos (LE 5001, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). Para a medida da PAS, cada rato foi colocado em um dispositivo de contenção com aeração constante e aquecido a 29-32 °C durante 10 minutos, para que ocorresse vasodilatação no animal. O manguito de pressão foi colocado aproximadamente 2-3 cm da ponta da cauda, onde o tecido possui menos massa muscular e a sensibilidade de pulso é maior. Regulou-se o ganho de precisão do transdutor de pulso até o nível adequado, sendo o manguito acionado para inflar até ocluir a passagem de sangue pela artéria da cauda e o sinal de pulso desaparecer. A seguir, o manguito desinflou-se automaticamente, sendo a PAS determinada a partir do momento da recaptação do sinal de pulso. Durante as avaliações, foram realizadas três medidas da PAS em cada rato, sendo considerada para registro a de valor intermediário.

3.5. Isolamento dos cardiomiócitos

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Natali et al. (2001). A eutanásia de cada animal dos grupos experimentais foi realizada por deslocamento cervical, 48 horas após o final de cada tratamento.

Após a eutanásia, o coração foi removido e lavado em solução contendo 750 mM de CaCl_2 para retirar o excesso de sangue, imediatamente antes da perfusão das soluções de isolamento. A seguir, a aorta foi fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e o coração isolado foi colocado em um sistema de perfusão (*Langendorff* adaptado) e perfundido com a solução de isolamento, contendo 750 mM de CaCl_2 (solução A, item 3.5), em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos. Em seguida, trocou-se a perfusão para a solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (solução B, item 3.5), durante seis minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os cardiomiócitos e quelação do Ca^{2+} . Por fim, o coração foi perfundido com a solução contendo 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA), protease 2 mg e 100 mM de CaCl_2 (solução C, item 3.5), durante 25 minutos, para a digestão da matriz extracelular. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O_2 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 35-37 °C.

Após a perfusão, os ventrículos (direito e esquerdo) foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). Em seguida, os ventrículos direito e esquerdo foram removidos e pesados separadamente. As amostras do ventrículo esquerdo foram colocadas em frascos identificados contendo 5 ml da solução enzimática (colagenase + protease). Os frascos foram agitados moderadamente durante cinco minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37 °C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O_2 100% – White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3.000 rpm) por 10 segundos. O sobrenadante foi removido, e os cardiomiócitos foram suspensos na solução de 750 mM de CaCl_2 (solução A, item 3.5). Esse processo foi repetido até três vezes. Os cardiomiócitos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5 °C) até serem utilizados.

3.6. Soluções de isolamento

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos foram feitas usando-se uma solução básica com água deionizada ultrapura (Milli-

Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl₂ (1,43) – 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; ácido etanossulfônico-hidroxietil piperazina (HEPES) (5) – 0,062 g/l; glicose (10) – 1,8 g/l; taurina (20) – 2,38 g/l; creatina (10) – 1,3 g/l; pH = 7,4; e temperatura ambiente.

Solução A

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

Solução B

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

Solução C

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase e 2 mg de protease em 20 mL da solução básica.

3.7. Solução de perfusão-tampão HEPES

Para a mensuração da contratilidade celular e do transiente de [Ca²⁺]_i, os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram banhados com uma solução fisiológica contendo (em mM): solução estoque: NaCl (113) – 65,99 g/l; HEPES (5) – 11,9 g/l; NaH₂PO₄ (1) – 1,42 g/l; MgSO₄ (1) – 2,46 g/l; KCl (5) – 3,72 g/L; solução sopa: acetato de Na (20) – 16,4 g/100 mL; glicose (10) – 18,1 g/100 mL; e insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL. Para fazer um litro da solução de perfusão-tampão HEPES, foram adicionados 100 mL da solução-estoque, 10 mL da solução sopa e 1 mL de CaCl₂ (1) em água deionizada ultrapura (Milli-Q). Essa solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

3.8. Contratilidade celular

As contrações dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA)

montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito por Roman-Campos et al. (2009). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro montada no microscópio e banhados pela solução de perfusão-tampão HEPES (item 3.6) em temperatura ambiente (~ 25 °C). Foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

Os cardiomiócitos foram estimulados externamente à frequência de 1 Hz (20 V, duração de 5 ms), utilizando-se um par de eletrodos de aço acoplado nos dois lados internos da câmara, através de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA).

As bordas dos cardiomiócitos foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) e definidas através do ajuste do contraste (preto e branco) da imagem dos cardiomiócitos. As contrações dos cardiomiócitos após a estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 5).

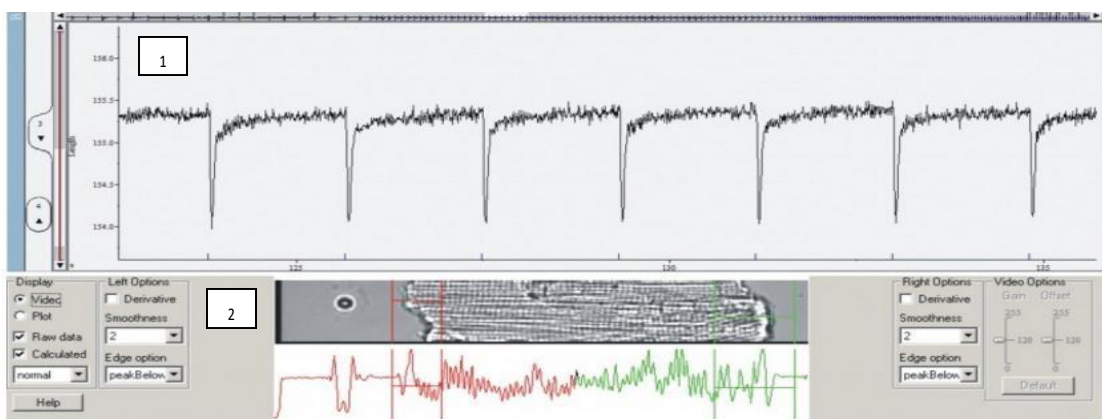


Figura 5 – Registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. No primeiro quadro (1) está representada a imagem de traços de contração. No quadro abaixo (2) estão a imagem representativa de um cardiomiócito e as bordas direita (pico verde) e esquerda (pico vermelho).

Somente foram utilizados para os experimentos os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos.

A partir dos registros obtidos, foram analisadas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a tempo da máxima contração (tempo de encurtamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) e a tempo de 50% de relaxamento (tempo do pico até 50% de relaxamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$). Esses parâmetros foram obtidos através do programa Ionwizard (Ionoptix, EUA). Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 6.

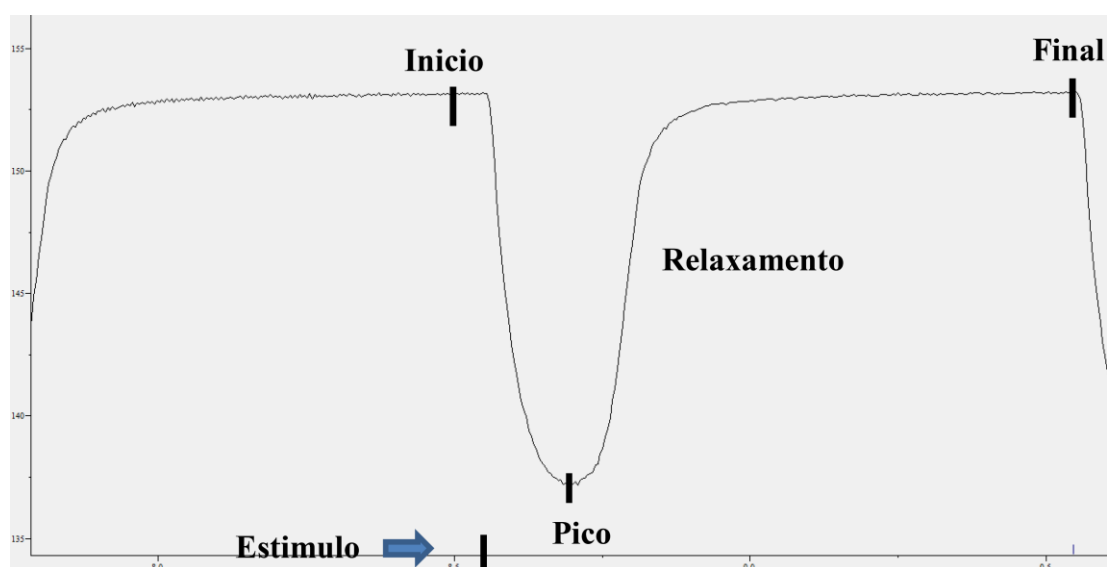


Figura 6 – Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz.

3.9. Medidas do transiente de cálcio

As medidas do transiente do transiente intracelular global de cálcio nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram realizadas por meio de sistema de fluorescência (Ionoptix, EUA) montado em um

microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Os cardiomiócitos foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} permeável à membrana plasmática Fura-2 (Fura-2AM, Thermo Fisher, Waltham, EUA).

O Fura-2 AM (5 μM) foi preparado em uma solução de estoque à base de dimetilsulfóxido – DMSO (50 μl de DMSO em 50 μg de Fura-2 AM). Adicionaram-se 10 μL dessa solução de Fura-2 AM/DMSO em 4 mL de meio celular, em tubo falcon envolvido em papel-alumínio. O tubo foi levemente agitado em superfície plana por 10 minutos (velocidade ~ 120x/mim). Em seguida, a solução foi centrifugada (3.000 rpm) por 10 segundos, o sobrenadante removido e os cardiomiócitos resuspendidos em 4 mL de solução contendo cálcio (solução B, item 3.5). Após esse procedimento, o tubo contendo os cardiomiócitos foi colocado em refrigerador por 30 minutos. Todo procedimento foi realizado em ambiente escuro.

O transiente de Ca^{2+} foi medido utilizando-se um sistema de excitação dupla que detecta a fluorescência excitada por luz UV com 340 e 380 nm (lonoptix – EUA). Os cardiomiócitos incubados com Fura-2 foram colocados em uma câmara experimental, montada em um microscópio invertido, e foram banhados com solução HEPES (item 3.6). Em seguida, um cardiomiócito foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e foram estimulados eletricamente (Myopacer, Field Stimulator, lonoptix, EUA) por um par de eletrodos de platina acoplado nos dois lados internos da câmara, com um pulso supralimiar de 0,2 ms (20 V), na frequência de 1 Hz. A emissão de fluorescência foi detectada entre 340 e 380 nm, por um tubo fotomultiplicador. A fluorescência registrada é a razão entre as excitações de 340 e 380 nm.

Somente foram utilizados cardiomiócitos que possuíam bordas regulares e estrias definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas. Os registros foram feitos respeitando até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e na temperatura ambiente (~ 25 °C).

Os parâmetros do transiente de cálcio foram analisados usando o software IonWizard (IonWizard, 6.3, IonOptix, Milton, EUA). Foram analisados: amplitude do transiente (fluorescência máxima – cálcio sistólico, unidade abstrata); o tempo para o pico do transiente (tempo da estimulação elétrica até a fluorescência máxima, ms); e o tempo para 50% do decaimento do transiente (tempo entre a fluorescência máxima e a metade do tempo de retorno à fluorescência basal, ms). Todas as medidas estão representadas na Figura 7.

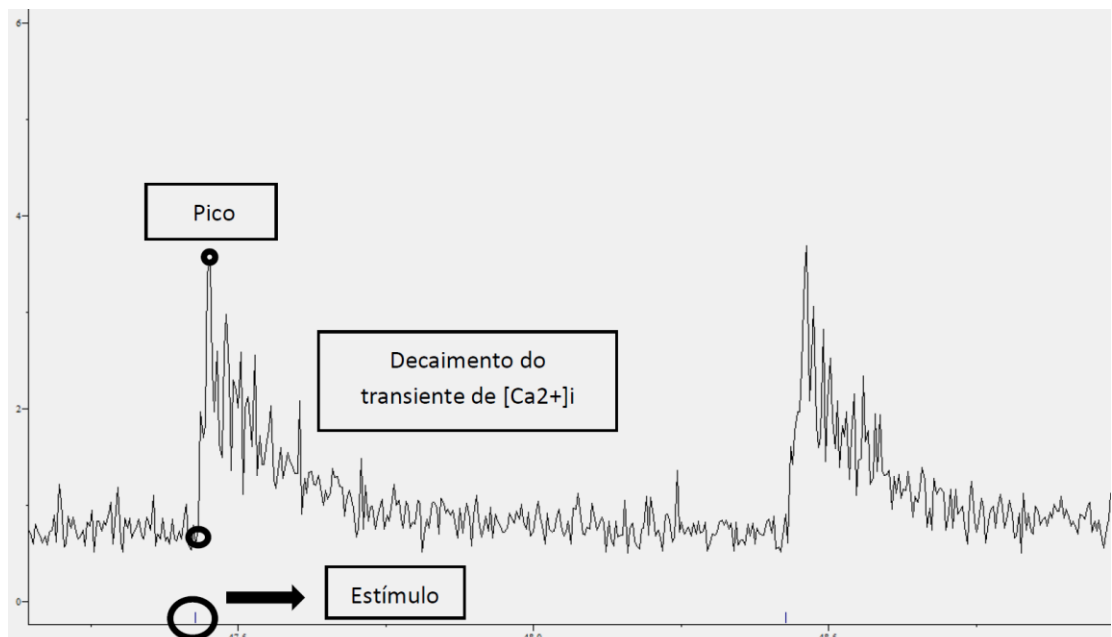


Figura 7 – Gráficos representativos do transiente de Ca^{2+} . (A) Amplitude do transiente; (B) Tempo para o pico do transiente; e (D) Tempo para 50% de decaimento do transiente.

3.10. Expressão gênica de mRNA e miRNA

3.10.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Após a eutanásia, o coração foi removido e foram retirados fragmentos do ventrículo esquerdo, que foram colocados em tubos Eppendorf (polietileno) e imediatamente armazenados em Freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cerca de 50-100 µg de tecido foi homogeneizado em 1 mL de Trizol® Reagent (Invitrogen Life Technologies, USA), conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, durante 40 min a 100 V, e avaliada pela intensidade das bandas RNA ribossomal 28S e 18S. Na sequência, foi realizada a síntese de cDNA com 2 µg de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5 µg/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65 °C por 5 min, para obter o cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima e 2,5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Life Technologies, USA) pelo período de uma hora a 42 °C; subsequentemente, a temperatura foi elevada a 95 °C por cinco minutos, sendo as amostras rapidamente colocadas em gelo. As reações de real-time PCR foram realizadas pelo sistema de detecção do produto específico amplificado, no equipamento ABI 7700 (Applied-Biosystems, USA) e com o composto fluorescente SYBR-Green I, conforme instruções do fabricante.

3.11. Quantificação de mRNA e microRNAs por PCR em tempo real

3.11.1. Genes relacionados com hipertrofia cardíaca

A expressão gênica relativa para α -MHC, β -MHC no VE foi analisada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (real-time PCR). Os *primers* foram desenhados usando o programa *Primer 3 software* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi), sendo utilizados: α -MHC: sense: 5'- CgT gTC CCA ggT CAA CAA g-3', antissense: 5' – Agg CTC TTT CTg gAC C-3'; β -MHC: sense: 5' – CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3', antissense: 5' – Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-3'; Ciclofilina: sense: 5' – AAT gCT ggA CCA AAC ACA AA-3'; e antissense: 5' – CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3'. A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da ciclofilina (Δ CT). A expressão gênica foi calculada usando as diferenças em valores de Δ CT entre as amostras ($\Delta\Delta$ CT) e a equação $2^{-\Delta\Delta ct}$.

3.11.2. MicroRNAs

Foram utilizados o MirvanaT-QRT-PCR miRNA *detection kit* e SuperTaq™ Plus Polymerase (Applied Biosystem, PE, Foster City, CA), bem como *primers* específicos para serem utilizados com esses *kits* (RT *Primers* e PCR *Primers*).

Para ensaios com TaqMan MiRNA Assay foi utilizado o *kit* TaqMan MiRNA *Reverse Transcriptase* da *Applied Biosystems* para miRNA-214 (ID000517) e miRNA-208(463567_mat). Foram utilizados 1-10 ng de RNA em 1 μ l. Foi preparada uma RT máster mix com dNTPs 100 mM, transcriptase reversa multiscript 50 U/mL, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20 U/mL e água livre de nucleasse para completar o volume de 15 μ l de reação. A reação de PCR foi realizada a 16 °C por 30 minutos, 42 °C por 30 minutos, 85 °C por cinco minutos e, depois, as amostras foram mantidas a 4 °C. Para a reação de Real Time – PCR, o produto da reação de PCR foi diluído 1:15 e realizada uma nova máster mix com TaqMan miRNA Assay 20x, TaqMan 2x universal PCR máster mix, No Amp Erase, UNG e água livre de nucleases para completar o volume de 20 μ l. A reação da transcriptase reversa foi realizada por 30 min a 16 °C; 30 min a 42 °C; 5 min a 85 °C e, na sequência, as amostras foram mantidas a 4 °C. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystems*). Essa reação é específica para ser lida a fluorescência nessa geração de equipamentos da *Applied Biosystems* (ABI PRISM 7000, 7500,7900). Uma curva de dissociação foi gerada ao final da reação, para verificar que um único produto foi amplificado. Cada amostra de VE foi analisada em duplicada. As quantidades relativas de expressão dos miRNAs dos ratos NS *versus* NT, HS e HT foram comparadas depois da normalização com os valores de expressão de U6 (mudanças no *cycle threshold*, Δ CT). A quantificação da alteração na expressão dos miRNAs foi feita usando as diferenças nos valores de Δ CT entre duas amostras ($\Delta\Delta$ CT) e a equação $2^{-\Delta\Delta$ CT}. Os dados estão expressos em valores percentuais, comparados com o grupo NS (Normotensos controles).

As amostras de RNA foram diluídas na proporção de 1:100 em água e analisadas por espectrofotometria em 260 a 280 nm.

3.12. Análise estatística

As pressuposições da Análise de Variância (ANOVA), homogeneidade, de variâncias entre os grupos e de normalidade das observações foram checadas, mas não foram detectadas violações que merecessem atenção. Foram utilizados os testes de Levene, qui quadrado e Kolmogorov-Smirnov.

As comparações entre os valores iniciais e finais de pressão arterial sistólica e de TTF dos grupos experimentais foram feitas usando-se o teste t de Student pareado. Para verificar a diferença entre todos os grupos, utilizou-se ANOVA *one-way*.

As comparações entre as médias dos grupos para as variáveis PAS, peso corporal, peso dos ventrículos, peso do ventrículo esquerdo, peso relativo dos ventrículos, peso relativo do ventrículo esquerdo, contratilidade celular, transiente de cálcio e expressão de microRNAs 214 e 208, obtidas no final do experimento, sendo realizadas através de ANOVA *two-way*, seguida do *post-hoc* de Tukey. Esse procedimento foi adotado para mostrar os efeitos independentes dos fatores exercício físico [sedentários (NS e HS)] *versus* treinados (NT e HT)] e hipertensão [normotensos (NS e NT) *versus* hipertensos (HS e HT)], assim como a interação entre esses fatores.

Os procedimentos estatísticos foram realizados através do programa SigmaPlot (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA), e todos os gráficos foram feitos no programa GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média (EPM). Para todas as análises, adotou-se o nível de significância até 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal, dos ventrículos, do ventrículo esquerdo e razões

Os resultados referentes aos efeitos do treinamento físico sobre o peso corporal, frequência cardíaca, peso dos ventrículos, peso dos ventrículos esquerdo e peso relativo dos ventrículos e ventrículos esquerdo de animais normotensos e hipertensos estão apresentados na Tabela 1, juntamente com os efeitos independentes da hipertensão, do exercício físico e da interação entre os fatores.

O efeito independente da hipertensão é visto em quatro variáveis: o grupo hipertenso (H) apresenta menor peso corporal em relação ao grupo normotenso (N) (N: $429,2 \pm 11,56$; H: $344,7 \pm 9,30$ g), maior peso de ventrículo esquerdo em relação ao grupo normotenso (N: $1,10 \pm 0,04$; H: $1,21 \pm 0,05$ mg/g), maior peso relativo em relação ao grupo normotenso (N: $3,71 \pm 0,18$; H: $4,56 \pm 0,22$ mg/g) e maior peso relativo em relação ao grupo normotenso (N: $2,58 \pm 0,11$; H: $3,55 \pm 0,15$ mg/g). O efeito independente do exercício físico é visto na variável peso corporal, em que o grupo sedentário (SED) apresenta menor peso corporal em relação ao grupo treinado (TREI) (SED: $380,95 \pm 7,65$; TREI: $393,00 \pm 9,25$ g).

Houve interação entre os fatores nas variáveis PV/PC e PVE/PC. Os animais do grupo HT apresentou maior PV/PC que os dos grupos NS e NT. Os animais dos grupos HS e HT apresentaram maiores valores de PVE/PC que os dos grupos NS e NT.

Tabela 1 – Peso corporal, dos ventrículos, do ventrículo esquerdo e razões

	NS	NT	HS	HT	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre fatores
Peso corporal (PC, g)	411,30±7 ^a	447,10±15 ^a	350,60±7 ^b	338,90±10 ^b	p <0,0001	p = 0,037	p = 0,064
PV (g)	1,62±0,07 ^a	1,49±0,08 ^a	1,47±0,06 ^a	1,66±0,08 ^a	p = 0,954	p = 0,682	p = 0,049
PVE (g)	1,12±0,04	1,08±0,04	1,18±0,05	1,25±0,05	p = 0,028	p = 0,801	p = 0,265
PV/PC (mg/g)	3,97±0.21 ^a	3,46±0.16 ^a	4,19±0.16 ^{ab}	4,93±0.28 ^b	p = 0,0005	p = 0,596	p = 0,007
PVE/PC (mg/g)	2,75±0.15 ^a	2,42±0.08 ^a	3,39±0. ^{ab}	3,72±0.17 ^b	p <0,0001	p = 0,986	p = 0,024

Dados são apresentados como média ± EPM de oito animais de cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. PV, peso dos ventrículos. PVE, peso do ventrículo esquerdo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

4.2. Micro RNA 208 e expressão gênica de miosina de cadeia pesada (α e β -MCP)

Na Tabela 2 são apresentados os efeitos independentes dos fatores hipertensão e exercício, assim como a interação entre fatores para a expressão do mirRNA-208, α -MCP, β -MCP e α/β -MCP. Houve efeito do fator hipertensão para β -MCP, em que os animais normotensos apresentaram valores menores que os hipertensos (N: $250,8 \pm 37,89$; H: $721,3 \pm 126,28$), assim como para α/β -MCP, em que os animais normotensos obtiveram maior relação que os hipertensos (N: $85,59 \pm 14,19$; H: $26,8 \pm 7,07$). O fator hipertensão não causou efeito independente no miR-208. No entanto, o valor de p (0,064) sugere uma tendência, em que o grupo hipertenso apresentou níveis de mirRNA-208 maiores que os normotensos (H: $230,55 \pm 22,8$; N: $119,52 \pm 0,06$). Houve efeito do fator exercício também no miR-208, e os animais treinados apresentaram maiores níveis de mirRNA-208 que os sedentários (SED: $82,46 \pm 0,06$; TREIN: $267,61 \pm 22,81$).

Tabela 2 – Micro RNA-208, α -MCP, β -MCP e α/β -MCP

	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre fatores
mirRNA-208 (% do controle)	p = 0,064	p = 0,004	p = 0,019
α -MCP (% do controle)	p = 0,708	p = 0,578	p = 0,112
β -MCP (% do controle)	p = 0,002	p = 0,972	p = 0,007
α/β -MCP(% do controle)	p = 0,000	p = 0,111	p = 0,041

São apresentados dados de cinco animais de cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado.

Observa-se também que houve interação entre os fatores hipertensão e exercício para mirRNA, β -MCP e α/β -MCP (Figura 8). O grupo HT apresentou maiores níveis de mirRNA-208 que os grupos NS, NT e HS. Os grupos HT e HS tiveram maiores níveis de β -MCP que NS e NT. Os grupos HT e HS apresentaram menor relação de α/β -MCP que NS.

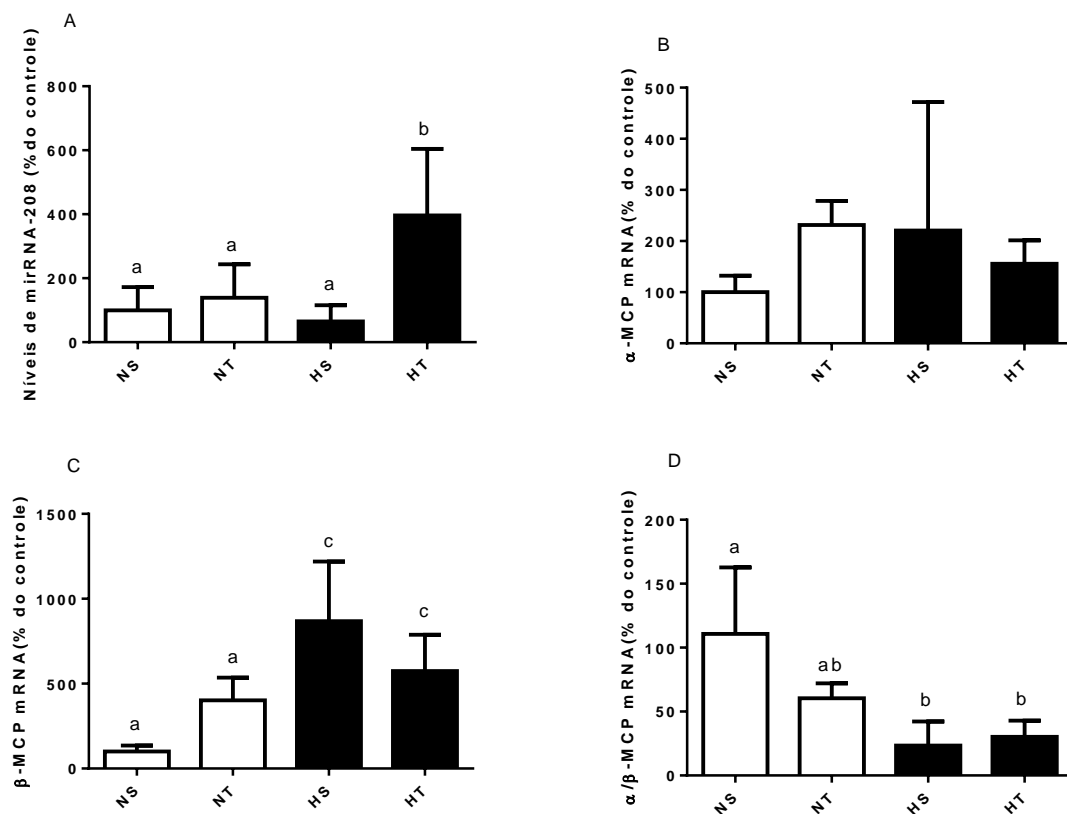


Figura 8 – Expressão de microRNAs-208, α -MCP, β -MCP e α/β -MCP dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Níveis de mirRNA-208 (% do controle). (B) α -MCP mRNA (% do controle). (C) β -MCP (% do controle). (D) α/β -MCP (% do controle). NS, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Todos os resultados são apresentados em média \pm EPM de cinco animais em cada grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.3. Pressão arterial sistólica

Na Tabela 3 são apresentados os efeitos independentes, do exercício físico, da hipertensão e as interações entre os fatores para pressão arterial sistólica final. Primeiramente, houve efeito independente da hipertensão, pois a PAS foi maior nos animais hipertensos em relação aos normotensos (N: $104 \pm 3,24$; H: $128 \pm 7,88$ mmHg). Observa-se também, nessa tabela, o efeito independente do fator exercício físico, em que os grupos treinados apresentam menores valores de PAS que os sedentários (SED: $158,35 \pm$

5,30; TREI: 129,1 ± 5,82 mmHg). Observou-se, ainda, que existe interação entre os fatores (Figura 2). Na PAS final de todos os grupos experimentais, nenhuma diferença foi observada entre os grupos NS e NT, mas os grupos HS e HT apresentaram menor PAS que os grupos NS e NT. Ainda, o grupo HT exibiu menor PAS que o HS ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Pressão Arterial Sistólica Final

	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre
Pressão Arterial Sistólica Final (mmHg)	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,0030$

Dados são apresentados de oito animais de cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado.

Os resultados referentes à PAS (pré e pós) e PAS (pós) dos grupos experimentais de exercício físico de moderada intensidade são mostrados na Figura 9AB, respectivamente.

O programa de exercício físico de intensidade moderada não alterou a PAS nos animais normotensos em relação ao pré-treinamento (Figura 9). Entretanto, no grupo experimental hipertenso, o treinamento físico de intensidade moderada reduziu a PAS em relação ao pré-treinamento ($p < 0,05$).

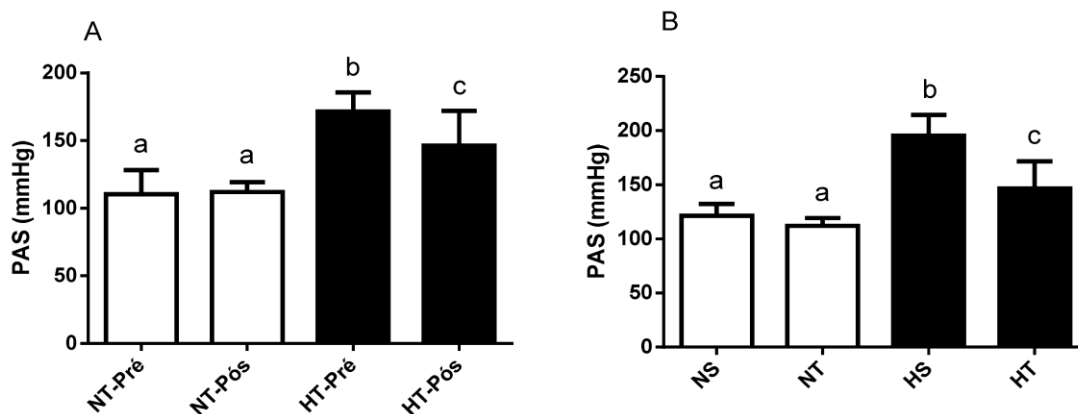


Figura 9 – Pressão arterial sistólica dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Pressão arterial sistólica inicial e final dos grupos treinamento (mmHg). (B) Pressão arterial final de todos os grupos experimentais. NT-Pré, normotenso treinado antes do treinamento. NT-Pós, normotenso treinado pós-treinamento. HT-Pré, hipertenso treinado antes do treinamento. HT-Pós, hipertenso treinado pós-treinamento. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Para PAS (pré-pós), foi realizado o teste T pareado e, para verificar a diferença entre todos os grupos, foi utilizado o teste *one way* com *post hoc* Tukey. Para PAS final, foi realizado *two way* com *post hoc* de Tukey para verificação de diferença entre os grupos e fatores. Todos os resultados são apresentados em média \pm EPM de oito animais de cada grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.4. Capacidade de exercício

Na Figura 10 estão apresentados os dados do tempo total até a fadiga (TTF) e velocidade de corrida dos grupos experimentais.

O programa de treinamento com corrida de intensidade moderada aumentou o TTF dos grupos experimentais (Figura 10), comparando-se o antes com o depois do treinamento ($p \leq 0,05$). É interessante observar que os grupos pré-treinamento não se diferem estatisticamente, e o mesmo é visto nos grupos pós-treinamento. A velocidade de corrida durante todo o experimento apresentou a mesma relação que o TTF, com aumento da velocidade do início do experimento para o final em ambos, normotensos e hipertensos ($p \leq 0,05$). A média de velocidade total do protocolo de treinamento foi de 26,22 m/min para os animais normotensos e de 25,36 m/min para os animais hipertensos.

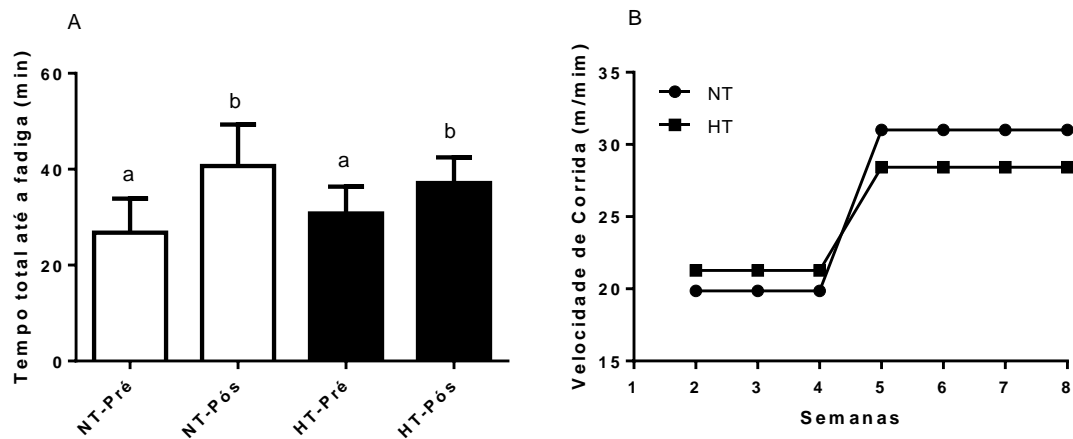


Figura 10 – Tempo total até a fadiga dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) TTF nos grupos treinados (pré e pós) treinamento. (B) Velocidade de corrida dos grupos treinados durante o período de treinamento. NT-Pré, normotenso treinado antes do treinamento. NT-Pós, normotenso treinado pós-treinamento. HT-Pré, hipertenso treinado antes do treinamento. HT-Pós, hipertenso treinado pós-treinamento. NT, normotenso treinado. HT, hipertenso treinado. Para TTF, foi realizado o teste T pareado e ANOVA *one-way* seguida do *post hoc* de Tukey.

4.5. Propriedades mecânicas

Na Tabela 4 são apresentados os efeitos independentes, do exercício físico, da hipertensão e a interação entre os fatores para a amplitude de contração, o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% de relaxamento. O efeito independente do fator hipertensão é observado somente na amplitude de contração, em que os hipertensos apresentam maior amplitude de contração em relação aos normotensos (H: $7,99 \pm 0,25$; N: $6,94 \pm 0,24$ % c.c.r.). O efeito independente do exercício foi observado no tempo para 50% de relaxamento, pois os animais treinados mostraram menor tempo que os sedentários (SED: $7,57 \pm 0,24$; TREI: $7,36 \pm 0,24$ ms). Houve interação entre os fatores para o tempo para 50% de relaxamento.

Tabela 1 – Contração de cardiomiócitos

	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre fatores
Amplitude de contração (% c.c.r.)	p = 0,003	p = 0,536	p = 0,701
Tempo para o pico de contração (ms)	p = 0,539	p = 0,081	p = 0,145
Tempo para 50% de relaxamento (ms)	p = 0,356	p = 0,001	p = 0,012

Dados são apresentados em média \pm erro-padrão da média de 50-70 células em cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado.

A Figura 11 mostra o tempo para o pico de contração, o exercício físico aeróbico de intensidade moderada não alterou o tempo para a contração em nenhum dos grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Apesar de não apresentar valor estatístico diferente, o grupo NT obteve um valor estatístico muito próximo da diferença ($p = 0,064$). Já os grupos hipertensos se mantiveram com quase nenhuma variação ($p = 0,99$).

O protocolo de treinamento físico foi capaz de diminuir o tempo para 50% de relaxamento (3C) dos animais do grupo NT em relação aos do grupo NS ($p < 0,001$). No grupo HT, o tempo para 50% de relaxamento diminuiu, mas não foi bastante para ser diferente estatisticamente ($p = 0,41$).

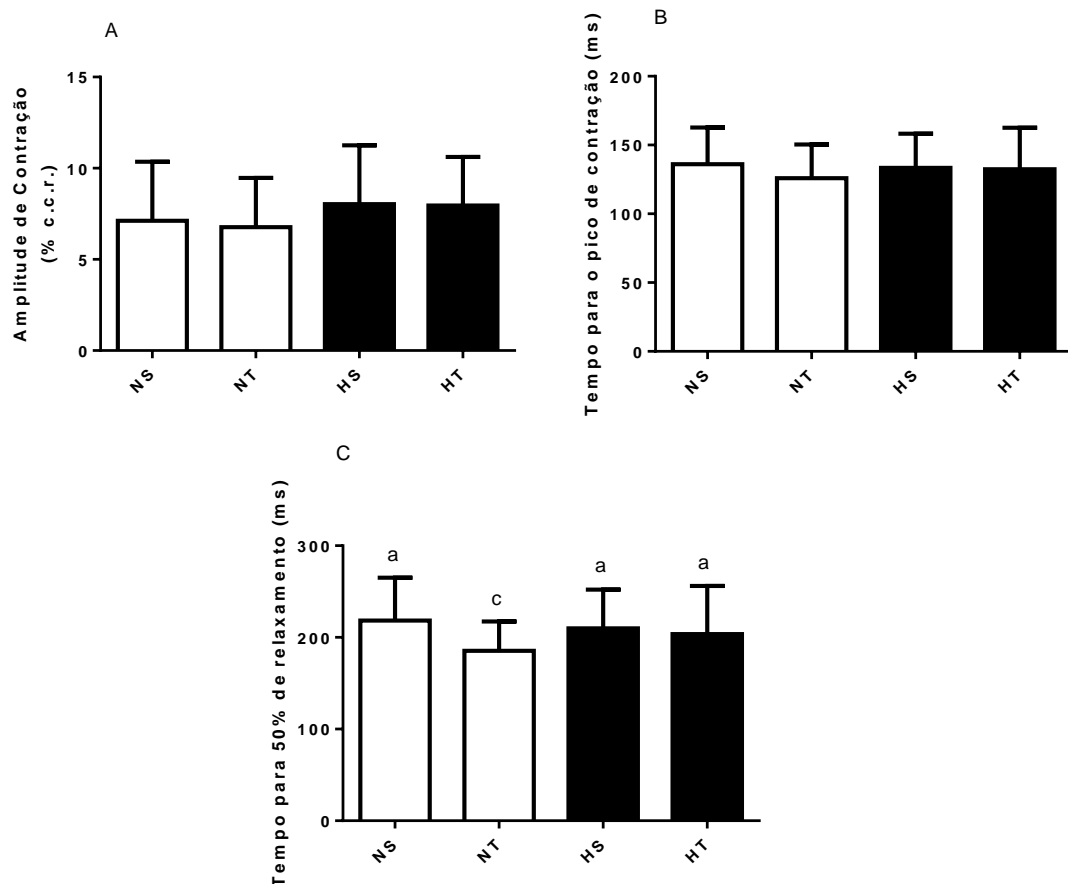


Figura 11 – Contração de cardiomiócitos dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude de contração (% c.c.r.). (B) Tempo para contração (ms). (C) Tempo para 50% de relaxamento (ms). NS, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Todos os resultados são apresentados em média \pm EPM de 60-80 células (oito animais de cada grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.6. Transiente intracelular global de Ca^{2+}

Na Tabela 5 são apresentados os efeitos independentes do exercício físico, da hipertensão e as interações entre os fatores para amplitude do transiente de cálcio, tempo para o pico do transiente de Ca^{2+} e tempo para 50% de decaimento do transiente de Ca^{2+} . O efeito independente do fator hipertensão é observado somente no tempo para 50% de decaimento do transiente de Ca^{2+} , e os animais hipertensos obtiveram maior tempo de relaxamento que os normotensos (H: $194,7 \pm 3,08$; N: $185,7 \pm 3,20$ ms).

Houve efeito independente do fator exercício físico na amplitude do transiente, em que os animais treinados obtiveram maior amplitude em relação aos sedentários (SED: $0,427 \pm 0,03$; TREI: $0,565 \pm 0,03$ Fura 340/380); e no tempo para o pico do transiente, em que menor tempo para o pico ocorreu nos animais treinados em relação aos sedentários (SED: $49,08 \pm 1,07$; TREIN: $43,25 \pm 1,01$ ms). Todas as variáveis apresentaram interação entre os fatores, como mostrado na Figura 4.

Tabela 2 – Transiente intracelular global de cálcio

	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre fatores
Amplitude do transiente (Fura 340/380)	$p = 0,723$	$p = 0,009$	$p = 0,003$
Tempo para o pico do transiente (ms)	$p = 0,774$	$p = 0,001$	$p = 0,001$
Tempo para 50% de decaimento (ms)	$p = 0,043$	$p = 0,686$	$p = 0,001$

Dados são apresentados de 40-60 células de cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado.

Na Figura 12, observa-se que o treinamento físico de intensidade moderada não modificou a amplitude do transiente de cálcio nos animais normotensos. Diferente resultado é visto no grupo hipertenso, em que o treinamento físico em esteira de moderada intensidade aumentou em 87% a amplitude do transiente no grupo HT, em comparação com o HS ($p \leq 0,05$).

O protocolo de treinamento físico diminuiu o tempo para o pico do transiente (Figura 12B) nos animais do grupo NT, em relação aos do grupo NS. Nos grupos hipertensos, não foi vista nenhuma diferença estatística entre os HS e os HT, no entanto fato interessante é que existe diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre NT e HS, mas não há diferença de NT para HT, evidenciando-se que o exercício físico não causou diferença ($p > 0,05$) nos grupos HS e HT, mas foi capaz de igualar o grupo HT ao NT ($p \leq 0,05$).

O tempo para 50% de decaimento (Figura 4C) apresentou resultado inesperado, pois o protocolo de exercício físico aeróbico aumentou o tempo para 50% de decaimento no grupo NT em relação ao NS. Nos animais

hipertensos, esse exercício reduziu o tempo de 50% de decaimento no grupo HT em reação ao HS e o igualou aos valores do grupo normotenso ($p \leq 0,05$).

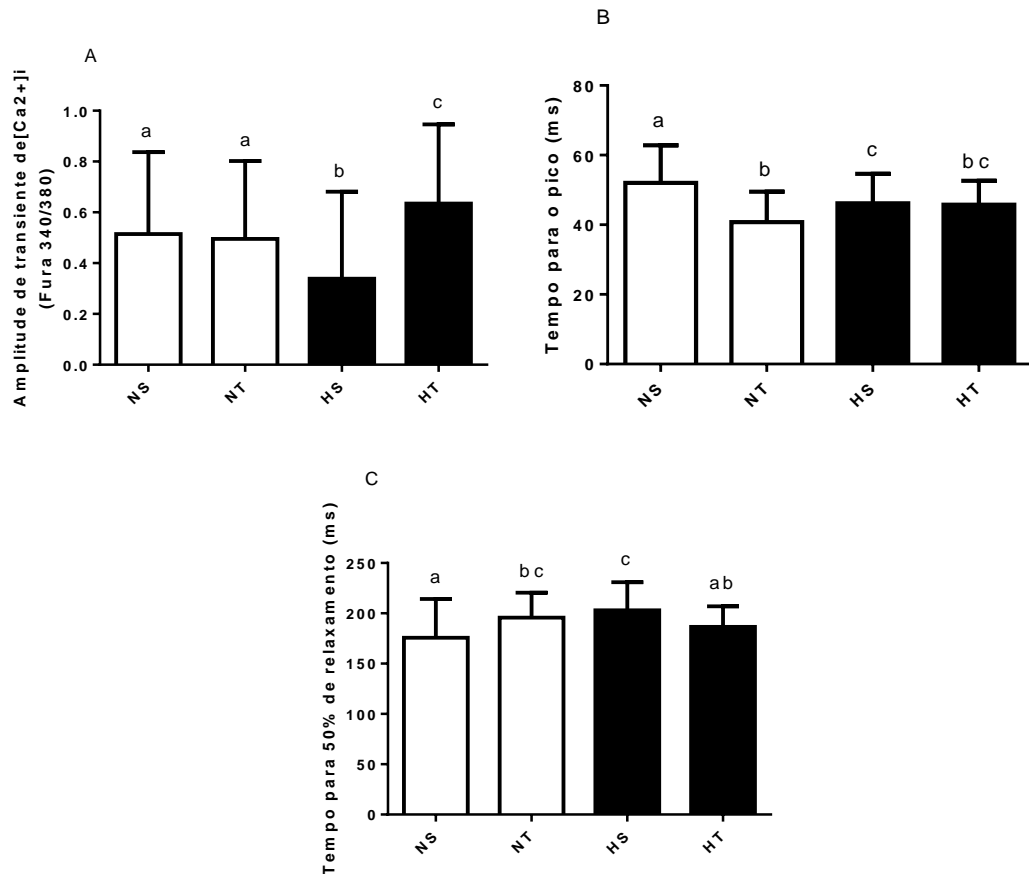


Figura 12 – Transiente intracelular global de cálcio dos cardiomiócitos de animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude do transiente de cálcio. (B) Tempo para o pico de transiente de cálcio. (C) Tempo para 50% de decaimento do transiente de cálcio. NS, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Todos os resultados são apresentados em média \pm EPM de 40-50 células (oito animais de cada grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.7. MicroRNA - 214

Na Tabela 6 são apresentados os efeitos independentes do exercício físico, da hipertensão e as interações entre os fatores para os níveis de miRNA-214. Houve efeito independente do fator hipertensão, pois os

animais hipertensos apresentaram maiores níveis de miRNA-214 que os normotensos (H: 274,15 ± 24,0; N: 103,55 ± 0,01). Houve efeito independente do exercício físico, pois os níveis de miRNA-214 foram maiores nos animais treinados do que nos sedentários (SED: 115,4 ± 0,02; TREI: 262,3 ± 23,5). Por fim, ocorreu interação entre os fatores (Figura 13).

Tabela 6 – Níveis de miRNA-214 no ventrículo esquerdo

	Efeito fator hipertensão	Efeito fator exercício	Interação entre fatores
miRNA-214 (% do controle)	p = 0,011	p = 0,024	p = 0,031

São apresentados dados de cinco animais de cada grupo. N, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado.

O protocolo de treinamento de intensidade moderada não causou nenhuma modificação no mir-214 no grupo normotenso. Já no grupo hipertenso ocorreu grande aumento do grupo HT em relação ao HS ($p < 0,001$) e a todos os outros grupos.

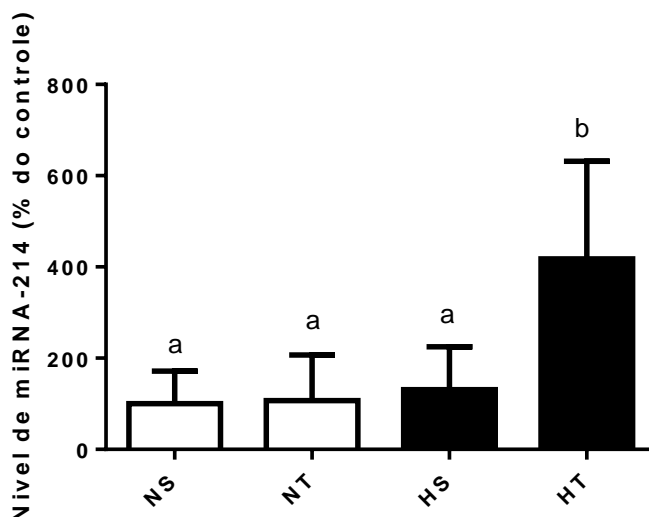


Figura 13 – Expressão de microRNAs no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). Nível de miRNA-214 (% do controle). NS, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Todos os resultados são apresentados em média ± EPM de cinco animais de cada grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão de microRNAs no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos. Os resultados indicaram que o treinamento aeróbico de intensidade moderada, por oito semanas, aumentou o TTF, reduziu a PAS e aumentou a razão PV/PC e a expressão de miR-208 no VE dos animais hipertensos. Mais importante, também aumentou a amplitude e reduziu o tempo para 50% de decaimento do transiente de Ca^{2+} e aumentou a expressão de miR-214 no VE dos animais hipertensos.

O aumento do TTF observado neste estudo está de acordo com o que existe na literatura para o treinamento físico aeróbico de baixa a moderada intensidade (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; CHEN et al., 2015; HUANG et al., 2009).

A PAS apresentou redução nos animais do grupo HT em relação aos do HS. O efeito da redução da PAS pelo exercício físico já está bem estabelecido na literatura (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; PETRIZ et al., 2015; SPANHOL; BONA, 2014). Esse efeito hipotensor pode ser devido ao aumento da sensibilidade barorreflexo simpático, da densidade capilar e da vasodilatação endotelial mediada pelo óxido nítrico (NO)(GRAHAM, 2004), assim como à redução de citocinas pró-inflamatórias, *down regulation* de NF-KB (AGARWAL et al., 2009) e à diminuição do estresse oxidativo

causado pelo exercício físico de intensidade moderada em animais SHR (KILIC-ERKEK et al., 2016).

O exercício de intensidade alta é capaz de diminuir a PAS, entretanto o aumento da intensidade do exercício pode estar associado a uma forte ativação do sistema renina-angiotensina (RAS), o que pode causar sobrecarga de pressão crônica no coração, provocando aceleração no processo para a insuficiência cardíaca (DA COSTA REBELO et al., 2012). Dessa forma, a intensidade do exercício físico tem influência não só na PAS, mas em outros fatores, sugerindo que menores intensidades são indicadas para redução da PAS e manutenção saudável do coração.

O controle da intensidade do treinamento físico é importante para que este não ultrapasse níveis de risco ao coração. Para isso, utilizou-se o TTF, e, como esperado, o treinamento em esteira de intensidade moderada aumentou a capacidade dos animais para o exercício físico. Esse resultado reflete na redução da PAS.

Outra forma de controle de intensidade é pelo limiar de lactato, não avaliado neste trabalho. No entanto, Petriz et al. (2015) relataram que exercício tanto de intensidade baixa (20% abaixo do limiar de lactato) quanto de intensidade moderada (20% acima do limiar), por quatro semanas, provocou redução na PAS. No entanto, em baixa intensidade não houve melhora da capacidade física, diferentemente na intensidade moderada/alta, em que, além da redução da PAS, ocorreu melhora na capacidade física. Intensidades acima do limiar anaeróbico (15% acima do limiar de lactato) são mais eficazes no aumento da aptidão aeróbica.

A redução da PAS e o aumento da capacidade física são vistos na literatura em resposta ao exercício de baixa intensidade, porém são necessárias, no mínimo, oito semanas de treinamento. Além de causar aumento da concentração de NO no miocárdio e, conseqüentemente, maior vasodilatação e redução de citocinas pró-inflamatórias – o que reduzirá a função simpática –, todo esse processo resultará em menor PAS (AGARWAL et al., 2009).

O exercício físico promove aumento de NO, através de estresse hemodinâmico provocado pelo sangue durante o exercício, melhorando o relaxamento vascular e a perfusão sanguínea no miocárdio (DANSON;

PATERSON, 2005). Pode-se pensar que com o aumento da intensidade do exercício físico maior será o estresse hemodinâmico nos vasos e, portanto, maior a liberação de NO. Contudo, foi constatado que maior estresse, por exemplo em exercício de alta intensidade, causa redução de NO nos vasos provocada, possivelmente, por diminuição de antioxidantes circulantes, correlacionada significativamente com o grau de disfunção endotelial (BERGHOLM et al., 1999). Dessa forma, nota-se a importância de controlar a intensidade para obter resultados que não levem o agravamento do quadro hipertensivo. Portanto, o exercício de baixa intensidade leva mais tempo para ganhos em relação ao de moderada e alta intensidades, porém o de alta intensidade provoca algumas disfunções.

O exercício aeróbico de baixa intensidade é mais comumente visto na literatura como meio de redução da PAS, melhora da contratilidade celular e transiente de Ca^{2+} (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; DA CUNHA et al., 2006; HAGBERG, 2011; ROQUE et al., 2013). Autores justificam a utilização de exercício físico aeróbico de baixa intensidade como um estímulo de mais fácil acesso (pensando em humanos), menores danos e riscos ao coração.

Neste trabalho foi utilizado o exercício físico de intensidade moderada, que provocou redução de peso corporal nos animais e contribuiu para o aumento da razão do PV/PC. Resultados semelhantes são vistos em exercício de intensidade baixa, o que mostra menor peso corporal de animais hipertensos e maior peso do ventrículo esquerdo nos animais HS e HT. Esse remodelamento cardíaco nos animais ocorre devido ao esforço contínuo do coração na sístole, contudo o exercício físico de baixa intensidade é capaz de reverter esse processo de hipertrofia patológica (PAGAN et al., 2015). No entanto, o exercício de intensidade moderada usado neste estudo não provocou reversão do remodelamento no grupo HT. Na Tabela 1, é possível observar que todos os valores do grupo HT são maiores que todos os outros grupos, e tais resultados se aproximam do de estudos de exercícios de alta intensidade em animais normotensos que provocaram remodelamento cardíaco adverso, com incremento do peso do ventrículo esquerdo causado por aumento de fibrose no miocárdio, disfunção cardíaca e aparecimento de arritmias (BENITO et al., 2011).

Neste estudo, mensurou-se um marcador de hipertrofia, o miR-208, que está envolvido no balanço entre miosina de cadeia pesada α e β . A sua superexpressão está relacionada a hipertrofia dos cardiomiócitos, aumento de fibrose e expressão de β – MCP, em resposta ao estresse e à desordem cardiovascular (VAN ROOIJ et al., 2009). Em ratos, a α -MCP é a isoforma dominante durante toda a vida adulta do animal. A partir do nascimento ocorrem diminuição de β -MCP e aumento de α -MCP. Assim, nos ratos existe alta atividade da ATPase miosínica, que com a interferência da hipertensão pode rapidamente mudar seu padrão de isoenzima para β -MCP, resultando em menor atividade da ATPase miosínica. Tais alterações provocam mudança fisiológica importante, o que leva à expressão de um fenótipo fetal, fazendo que ocorra reprogramação gênica (CHISTIakov, 2016; VAN ROOIJ et al., 2009). Em estudo de treinamento físico com natação, foi visto que a hipertrofia cardíaca fisiológica causada pelo treinamento reverteu a isoforma β -MCP para α -MCP em animais SHR, causando melhor função sistólica e normalização da atividade da ATPase miosínica (SCHAIBLE et al., 1986). Em animais deficientes em miR-208, foi observado aumento de genes esqueléticos rápidos, menos fibrose e menos estresse na função cardíaca, em comparação com animais selvagens. Dessa forma, o miR-208 está associado não só com o balanço α/β -MCP, mas com a regulação da fibrose e do estresse no músculo cardíaco (VAN ROOIJ et al., 2007). Os resultados deste estudo indicaram que os animais treinados apresentaram maiores níveis de miR-208 em relação aos sedentários. Essa diferença se deu pelo grande aumento da expressão no grupo HT. Tal fato indica que o exercício físico de intensidade moderada foi um fator de estresse para o grupo HT, e isso pode ter causado aumento na isoforma β -MCP e, conseqüentemente, hipertrofia patológica.

Para investigar melhor tais resultados, foram analisadas também as expressões gênicas de α –MCP, β - MCP e o balanço α/β -MCP. A expressão de α –MCP foi maior nos animais normotensos treinados em relação a todos os outros grupos e ocorreu pequeno aumento de α –MCP nos animais hipertensos treinados em relação aos hipertensos sedentários, mas sem diferença estatística para $p \leq 0,05$. Esse aumento se deveu ao fator isolado

do exercício. Entretanto, ao analisar β -MCP, apesar de grande aumento dos animais normotensos treinados, não houve diferença estatística. Já nos grupos hipertensos a expressão gênica foi maior em relação aos normotensos, independentemente do fator exercício. Como já mencionado, animais com patologias tendem a ter maior expressão de β -MCP. Por fim, o balanço entre α/β -MCP de todos os grupos foi menor que o do NT. Como pode ser visto na Figura 1, a expressão de β -MCP foi maior que a de α -MCP, e isso fez que o balanço α/β -MCP fosse menor em todos os grupos, em comparação com o do NS. Dessa forma, a afirmação sobre o miR-208 pode estar correta. Recente estudo mostrou que o exercício de alta intensidade em natação foi capaz de aumentar o razão α/β -MCP e reduziu o miR-208, entretanto o experimento foi realizado em animais fêmeas e normotensas (SOZI et al., 2016). Dessa forma, pode-se dizer que há indicativo de que o exercício de moderada/alta intensidade associado à hipertensão pode reduzir a razão α/β -MCP e aumentar a expressão do miR-208.

O exercício físico provoca sobrecarga no músculo cardíaco, aumentando a força, velocidade e amplitude de contração de cardiomiócitos para garantir o bom funcionamento do coração (BOZI et al., 2013; CARNEIRO- JÚNIOR et al., 2013; KEMI; WISLØFF, 2010a; QUINTÃO JÚNIOR et al., 2012). Dessa forma, apesar de representar somente 20% do total de células do coração (BERGMANN et al., 2009), o músculo cardíaco tem o papel de responder, de várias formas, aos estímulos provocados pelo exercício físico, como adaptações celulares e subcelulares, que podem modular a contração intrínseca (KEMI; WISLØFF, 2010ab).

O efeito do exercício físico de baixa e moderada intensidades sobre a contratilidade de cardiomiócitos já foi visto em animais normotensos (NATALI et al., 2002; QUINTÃO JÚNIOR et al., 2012), os quais incluem melhoras nas propriedades contráteis em ratos hipertensos (CARNEIRO- JÚNIOR et al., 2013) e em animais com infarto do miocárdio (BOZI et al., 2013). O exercício de intensidade alta também causa esses efeitos em animais normotensos (KEMI et al., 2007; WISLØFF, 2001).

Neste estudo, o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada aumentou a amplitude do transiente de cálcio e diminuiu o tempo para 50% de decaimento do transiente em animais hipertensos, contudo a resposta celular no tempo para o pico de contração foi observado somente nos animais normotensos. O treinamento físico de intensidade moderada também melhorou o relaxamento celular, pela redução do tempo para o relaxamento, que pode ser explicado pela diminuição do tempo para 50% de decaimento do transiente de cálcio nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais normotensos e hipertensos.

Os achados deste estudo diferem dos encontrados em animais normotensos e hipertensos submetidos ao exercício aeróbio de baixa intensidade (melhora na contração e relaxamento celular), tanto em animais normotensos quanto em hipertensos (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013). Outro trabalho indicou melhora no inotropismo e lusitropismo celular de animais com infarto no miocárdio submetidos previamente ao treinamento de intensidade baixa (BOZI et al., 2013). Todavia, este estudo empregou exercício de moderada intensidade em animais SHR e, como visto pela análise do miR-208, essa intensidade parece provocar estresse excessivo nesses animais, impedindo-os de melhora global das funções, tanto diastólica quanto sistólica.

O miR-214, regulador antagônico da SERCA2a, indica que, quanto maior sua expressão, menor a expressão de SERCA2a. Os resultados deste estudo apontaram que o exercício físico utilizado causou aumento na expressão de miR-214 no VE dos animais. O resultado de miR-214 é semelhante ao do miR-208, sugerindo que o exercício de moderada intensidade causou estresse excessivo e provocou aumento nos níveis de miR-214. Estudos já indicaram que a maior expressão de miR-214 está diretamente associada com hipertrofia cardíaca na insuficiência cardíaca e o silenciamento de miR-214 atenuou a hipertrofia cardíaca causada por sobrecarga de pressão (YANG et al., 2013, 2014).

Dessa forma, a explicação para a redução do tempo para 50% de decaimento do transiente de cálcio nos animais hipertensos em resposta ao exercício pode ser o aumento da expressão dos NCX para a retirada do Ca^{2+} do citosol. Também, pode ser uma explicação para a discreta melhora

observada nos animais hipertensos. Como já exposto, se maior quantidade de Ca^{2+} sai do citosol e menor quantidade está sendo recaptada pela SERCA2a, o resultado será menos cálcio no retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, menor quantidade de Ca^{2+} durante a contração. Isso resulta em redução do inotropismo e lusitropismo celular. Portanto, a hipótese deste estudo, em relação à contratilidade, foi parcialmente confirmada, pois o exercício aeróbico de intensidade moderada reduziu os tempos para 50% de relaxamento da contração e para 50% de decaimento do transiente de cálcio, assim como aumentou a amplitude do transiente de cálcio. Em relação à expressão dos microRNAs, a hipótese foi refutada, pois o treinamento usado aumentou a expressão de mir- 214 e miR-208 no VE de ratos hipertensos.

6. CONCLUSÕES

O treinamento aeróbico de intensidade moderada melhorou discretamente o transiente global de cálcio e não causou nenhum dano à contratilidade de miócitos do VE de ratos hipertensos. Todavia, o programa de exercício usado aumentou a expressão de miR-214 e miR-208 no VE dos animais hipertensos.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, D. et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Redox Homeostasis in Exercise-Induced Delayed Progression of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1393-1400, 1º Dez. 2009.

ALEXANDER, N.; HINSHAW, L. B.; DRURY, D. R. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rabbits. **Experimental Biology and Medicine**, v. 86, n. 4, p. 855-858, 1 Ago. 1954.

ALMEIDA, J. et al. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 661, 2012.

ARAUJO, M.; CARNEIRO, J. **Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos.** [S.l. : s.n.t.], 2013.

AURORA, A. B. et al. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1222-1232, 2 Abr. 2012.

BATTAULT, S. et al. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. **Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 70-8, Fev. 2016.

BENITO, B. et al. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. **Circulation**, v. 123, n. 1, p. 13-22, 4 Jan. 2011.

BERGHOLM, R. et al. Intense physical training decreases circulating antioxidants and endothelium-dependent vasodilatation in vivo. **Atherosclerosis**, v. 145, n. 2, p. 341-349, 1999.

BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5923, p. 98-102, 3 Abr. 2009.

BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191-227, Out. 2010.

BOZI, L. et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 549- 556, 25 Abr. 2013.

BROOKSBY, P.; LEVI, A. J.; JONES, J. V. Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. **Cardiovascular Research**, v. 27, n. 7, p. 1268-1277, 1º Jul. 1993.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 57, p. 119-28, Abr. 2013.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. et al. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 47, n. 11, p. 960-5, 2014.

CHEN, Y. et al. Exercise intensity-dependent reverse and adverse remodeling of voltage-gated Ca²⁺ channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 38, n. 10, p. 656-665, 23 Out. 2015.

CHISTIAKOV, D. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSHV, Y. V. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 94, p. 107–121, Maio 2016.

DA COSTA REBELO, R. M.; SCHRECKENBERG, R.; SCHLÜTER, K.-D. Adverse cardiac remodelling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5389-5400, Nov. 2012.

DA CUNHA, G. A. et al. Hipotensão pós-exercício em hipertensos submetidos ao exercício aeróbio de intensidades variadas e exercício de intensidade constante. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 6, p. 313- 317, 2006.

DANSON, E. J.; PATERSON, D. J. Cardiac neurobiology of nitric oxide synthases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1047, n. 1, p. 183-196, Jun. 2005.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 89-105, 1^o Jul. 1998.

DONG, D.; YANG, B. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy, myocardial fibrosis and heart failure. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, n. 1, p. 1-7, Jun. 2011.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **American journal of physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 4, p. H543-52, 15 Ago. 2015.

GRAHAM, D. A. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2088-2096, 1^o Jun. 2004.

HAGBERG, M. J. ACSM Information On Exercising Your Way to Lower Blood Pressure. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2011.

HORTA, P. P.; DE CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Life sciences**, v. 77, n. 26, p. 3336-43, 12 Nov. 2005.

HUANG, C.-C. et al. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 6, p. 697-706, 3 Dez. 2009.

KAHAN, T. Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. **Heart**, v. 91, n. 2, p. 250-256, 1^o Fev. 2005.

KEMI, O. J. et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, n. 3, p. 354-361, Set. 2007.

KEMI, O. J.; WISLØFF, U. High-Intensity Aerobic Exercise Training Improves the Heart in Health and Disease. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 30, n. 1, p. 2-11, Jan. 2010a.

KEMI, O. J.; WISLØFF, U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 4, p. 425-439, Ago. 2010b.

KILIC-ERKEK, O. et al. Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 412, n. 1-2, p. 209-219, 26 Jan. 2016.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews – Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, p. 376-85, Maio 2005.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470-479, 25 Jul. 2000.

MELO, S. F. S. et al. Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca²⁺ handling after myocardial infarction. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 15, n. 1, p. 166, 2015a.

MELO, S. F. S. et al. Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 6855-67, Jan. 2015b.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Ver. Bras. Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 63-75, 2001.

MONTGOMERY, R. L. et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. **Circulation**, v. 124, n. 14, p. 1537-47, 4 Out. 2011.

NATALI, A. J. et al. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 541, n. 3, p. 863-875, Jun. 2002.

NEVES, V. J. DAS et al. Exercise training in hypertension: Role of microRNAs. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 8, p. 713–27, 2014.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282-293, 1963.

PAGAN, L. U. et al. Long-Term Low Intensity Physical Exercise Attenuates Heart Failure Development in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 61-74, 27 Abr. 2015.

PETRIZ, B. A. et al. Exercise performed around MLSS decreases systolic blood pressure and increases aerobic fitness in hypertensive rats. **BMC physiology**, v. 15, n. 1, p. 1, 14 Jan. 2015.

QUINTÃO JÚNIOR, J. F. et al. Morfologia e contratilidade em cardiomiócitos de ratos com baixo desempenho para o exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 5, p. 431-436, Maio 2012.

RITTER, O.; NEYSES, L. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 7, p. 313-321, Jul. 2003.

ROMAINE, S. P. R. et al. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. **Heart**, v. 101, n. 12, p. 921-928, 15 Jun. 2015.

ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 686-703, Fev. 2013.

SCHAIBLE, T. F. et al. Chronic swimming reverses cardiac dysfunction and myosin abnormalities in hypertensive rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 60, n. 4, p. 1435-41, Abr. 1986.

SEALS, D. R.; REILING, M. J. Effect of regular exercise on 24-hour arterial pressure in older hypertensive humans. **Hypertension**, v. 18, n. 5, p. 583-592, 1º Nov. 1991.

SMIRK, F. H.; HALL, W. H. Inherited Hypertension in Rats. **Nature**, v. 182, n. 4637, p. 727-728, 13 Set. 1958.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

SPANHOL, J.; BONA, C. C. Exercício físico aeróbio, resistido e combinado: efeitos na pressão arterial em indivíduos hipertensos Aerobic physical exercise, resistance and combined: effects on blood pressure in hypertensive individual. v. 14, n. 3, p. 148-152, 2014.

TRIPPODO, NICK C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circulation research**, v. 48, n. 5, p. 705, 1981.

VAN ROOIJ, E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5824, p. 575- 9, 27 Abr. 2007.

VAN ROOIJ, E. et al. A family of microRNAs encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 662-673, 2009.

WISLØFF, U. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovascular Research**, v. 50, n. 3, p. 495-508, Jun. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO | Raised blood pressure**. [S.l.], v. Global Hea, 2014.

YANG, T. et al. **MicroRNA-214 provokes cardiac hypertrophy via repression of EZH2** **Biochemical and Biophysical Research Communications**. [S.l. : s.n.t.].

YANG, T. et al. Cardiac hypertrophy and dysfunction induced by overexpression of miR-214 in vivo. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 2, p. 317-325, 2014.