# UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* – MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

#### TAYNAN CORTI LUCHI

Efeitos da Associação do Treinamento Físico Aeróbio e Baixa Dose de L-NAME sobre Cardiomiócitos Isolados

> VITÓRIA 2018

#### TAYNAN CORTI LUCHI

# Efeitos da Associação do Treinamento Físico Aeróbio e Baixa Dose de L-NAME sobre Cardiomiócitos Isolados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Aprovada em 04 de maio de 2018

#### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. André Soares Leopoldo Universidade Federal do Espírito Santo Orientador

Dr. Leonardo dos Santos Universidade Federal do Espírito Santo

\_\_\_\_\_

Dr. Richard Diego Leite Universidade Federal do Espírito Santo

# Dedicatória

Dedico todo este trabalho à Deus, que me deu forças para vencer cada desafio, dia após dia e me mostrou de tudo somos capazes se mantivermos a fé, e esperança e a perseverança.

Dedico à minha família, em especial os meus Pais, Adilson e Verônica e ao meu irmão, lan, por estarem sempre ao meu lado, me darem todo o suporte necessário e me apoiarem em todas as minhas decisões, independente de tudo.

Dedico também aos meus amigos, por entenderem o desafio e contribuir com toda força necessária para que eu me mantivesse firme ao percorrer essa caminhada.

Dedico aos meus professores e amigos Andréia Silva, Michel Becalli e Victor Gasparini por fazer despertar em mim a curiosidade de seguir na vida acadêmica e por acreditarem no meu potencial, além de todo seu apoio.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Grandioso Deus por iluminar meus caminhos e meus passos por toda essa jornada, segurar meus braços nos momentos de aflição e por fim, ter me ajudado em mais uma conquista importante na minha vida.

Agradeço a minha família por todo o suporte e apoio desde sempre, para que esse sonho se tornasse realidade. Essa conquista também é de vocês.

Agradeço ao meu Orientador Dr. André Soares Leopoldo por todo o companheirismo e toda confiança depositada em mim. Obrigado por acreditar na minha capacidade e por me fazer entender que as dificuldades só nos tornam pessoas mais fortes e maduras.

Ao amigo que a vida acadêmica me deu, Jóctan Cordeiro. Obrigado por cada ensinamento, por sua perseverança, por compartilhar todas as dificuldades e todas as alegrias junto de mim e por tornar essa caminhada mais sublime. Guardarei com carinho todos os nossos momentos.

Agradeço ao amigo Alan Christian Bahr, pelas inúmeras madrugadas de discussão, dedicação e empenho para o aperfeiçoamento deste trabalho. Obrigado caro amigo, seu apoio foi fundamental.

A Bruno Jacobsen por toda sua contribuição para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa. Sem sua dedicação e apoio eu não teria conseguido.

A querida amiga e colega de pós-graduação Elis Aguiar, por me ajudar a dar os primeiros passos dentro do laboratório e sua ajuda ao longo do meu processo. Guardo com todo o carinho e tenho muita gratidão por tudo o que fez por mim.

Aos Professores e colegas dos laboratórios parceiros que contribuíram com as técnicas realizadas e somaram ainda mais com esse trabalho, LEMC, LUCCAR, LEMCRV. Dr. Leonardo, Vinícius, Gilson, Arícia, Dr. Breno, Dra. Nazaré, Mariana e Girlândia.

Aos amigos Alexandre e Priscila pelas contribuições com o meu experimento.

Aos amigos, companheiros e colegas do LAFIBE, LAFEX, LAFEC e da UFES em geral, Amanda, Leonardo, Wagner, Andressa, Jéssica, Maísa, Priscilla, Hudson, Dr. Claudio

André, Weverton, Rodrigo, Jean, Luíza e Lucas por todo o tempo compartilhado.

Guardarei com carinho os nossos momentos.

A todos os membros do PPGEF que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse trabalho.

À FAPES por fomentar essa pesquisa e a CAPES pelo apoio financeiro prestado para a realização deste projeto.

# Epigrafe

"Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias".

# Roberto Shinyashiki

#### **RESUMO**

Introdução: O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, sendo de suma importância sua capacidade mensageira, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvidas em diversos processos fisiológicos. A inibição por curto e médio prazo da produção de óxido nítrico (NO) acarreta uma série de efeitos deletérios ao sistema cardiovascular. Altas doses (20-100 mg/kg) de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) promovem hipertensão arterial, aumento na fração de colágeno miocárdico com consequente elevação da fibrose e necrose, bem como prejuízo funcional. Contudo, a administração de baixas doses de L-NAME (0,5-10 mg/kg) parece aumentar a atividade das óxido nítrico sintases (NOS) na aorta e ventrículo esquerdo (VE), além de reverter o aumento da pressão arterial. Esses resultados sugerem que a administração de baixa dose de L-NAME pode ativar a síntese de NO por *feedback* negativo e, consequentemente, promover benefícios ao sistema cardiovascular. O exercício físico também está associado à diversos efeitos cardioprotetores, além de acarretar aumento na biodisponibilidade de NO e expressão e atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). **Objetivo:** Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbio e administração de baixa dose de L-NAME sobre o processo de remodelamento cardíaco, parâmetros contráteis e cinética de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) em cardiomiócitos isolados. **Métodos:** Ratos Wistar (n = 56) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C), L-NAME (L), Exercício (Ex), e Exercício + L-NAME (ExL). Os grupos exercitados realizaram treinamento físico aeróbio com intensidades progressivas de 50 a 80% da velocidade máxima média por 12 semanas. A administração de L-NAME foi realizada diariamente por meio de gavagem orogástrica na concentração de 1,5 mg/kg/dia. Foram analisados a adiposidade corporal, o perfil pressórico, morfologia cardíaca, área seccional transversa (AST) do miócito, colágeno miocárdico, parâmetros de contratilidade cardíaca e transiente de Ca+2 intracelular. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. O nível de significância considerado foi de 5%. Resultados: A associação do exercício físico aeróbio e baixa dose de L-NAME acarretou elevação significante da pressão arterial sistólica na 8ª semana e pressão diastólica final do VE (semana 12), bem como aumento na relação coração/tíbia e fração de colágeno miocárdico, no entanto, com diminuição da AST. Além disso, o percentual de encurtamento e os tempos de encurtamento e relaxamento a 50% foram menores no grupo ExL in relação ao L e Ex. A amplitude de Ca<sup>+2</sup> e o tempo para 50% do pico de Ca<sup>+2</sup> foram maiores no ExL, no entanto, essa associação acarretou menor tempo para 50% de decaimento de Ca<sup>+2</sup>. Conclusão: A associação do exercício físico aeróbio e baixa dose de L-NAME não promove benefícios ao sistema cardiovascular, uma vez que acarreta remodelamento cardíaco decorrente de aumento da fração de colágeno e pressão diastólica final do VE, bem como disfunção contrátil em cardiomiócitos isolados. Os achados também indicam que essa associação promove aumento na sensibilidade ao Ca<sup>+2</sup> intracelular.

**Palavras-chave:** Óxido Nítrico, Remodelamento Cardíaco, Óxido Nítrico Sintases, Contratilidade

#### **ABSTRACT**

**Introduction:** Nitric oxide (NO) is a soluble gas and its messenger capacity is extremely important, activating or inhibiting several target molecules involved in various physiological processes. The short and medium-term inhibition of NO production leads to a series of deleterious effects on the cardiovascular system. High doses (20-100 mg/kg) of NG-nitro-Larginine methyl ester (L-NAME) promote arterial hypertension, increased myocardial collagen fraction with consequent elevation of fibrosis and necrosis, as well as functional impairment. However, low doses of L-NAME (0.5-10 mg/kg) appears to increase the activity of nitric oxide synthases (NOS) in the aorta and left ventricle (LV), reversing the increase in blood pressure (BP). These results suggest that low-dose of L-NAME can activate NO synthesis by negative feedback and, consequently, promote benefits to the cardiovascular system. Physical exercise is also associated to several cardioprotective effects, besides causing increased bioavailability of NO and expression and activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Objective: To evaluate the effects of association of aerobic exercise training and low-dose of L-NAME on the process of cardiac remodeling, contractile parameters and calcium (Ca<sup>2+</sup>) handling in isolated cardiomyocytes. **Methods:** Wistar rats (n = 56) were randomly assigned into four groups: control (C), L-NAME (L), exercise (Ex), and exercise + L-NAME (ExL). The exercised groups performed aerobic physical training with progressive intensity increase (50 to 80% of maximum running speed) for 12 weeks. L-NAME was given daily by orogastric gavage at 1.5 mg/kg/day. Body adiposity, pressure profile, cardiac morphology, myocyte cross sectional area (CSA), myocardial collagen, cardiac contractility parameters and intracellular Ca<sup>2+</sup> handling were analyzed. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. The significance level considered was 5%. Results: Association of chronic aerobic exercise and low-dose of L-NAME promoted in significantly increased systolic BP (at week 8) and LV end-diastolic-pressure (at week 12), as well as increased heart/tibia ratio and interstitial collagen fraction, but with reduction of CSA. In addition, the shortening and times to 50% shortening and relaxation were lower in ExL in relation to L and Ex. The Ca<sup>2+</sup> transient amplitude and the time to 50% peak Ca<sup>2+</sup> were higher in the ExL, however, this association brought lower time to 50% Ca<sup>2+</sup> decay. Conclusion: Association of chronic aerobic exercise and low-dose of L-NAME does not promote benefits to the cardiovascular system, since it causes cardiac remodeling with increase in the synthesis of collagen and LV end-diastolic-pressure, as well as contractile dysfunction evidenced by reduction of the percentage of shortening. The findings also indicate that this association promotes an increase in sensitivity to Ca<sup>2+</sup>intracellular.

Keywords: Nitric Oxide, Remodelling, Nitric Oxide Synthases, Contractility;

#### LISTA DE ABREVIATURAS

+dP/dt<sub>máx</sub> - Máxima Derivada de Pressão

Intraventricular Positiva

-dP/dt<sub>máx</sub> - Máxima Derivada de Pressão

Intraventricular Negativa

ACh – Acetilcolina

ANP – Peptídeo Natriurético Atrial

AST – Área Seccional Transversa

AT – Átrio total

C – Controle

CNA – Comprimento Naso-Anal

CS – Comprimento do Sarcômero

DB – Diggestion Buffer

EF – Exercício Físico

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Ex – Exercício

ExL – Exercício + L-Name

FC – Frequência Cardíaca

GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclica

IA – Índice de Adiposidade

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

K+ - Potássio

L-L-NAME

L-NAME - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl

ester

MAPK – Proteínas Ativadas por

Mitógenos

nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NOS - Óxido Nítrico Sintase

NO - Oxido Nítrico

PA – Pressão Arterial

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAM - Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PCF – Peso Corporal Final

PCI – Peso Corporal Inicial

PDfVE - Pressão Diastólica Final do

Ventrículo Esquerdo

PE – Percentual de Encurtamento

PKG - Proteína Quinase G

PLB - Fosfolambam

PSVE – Pressão Sistólica do Ventrículo

Esquerdo

RyR – Receptores de Rianodina

TAU - Constante de tempo do

relaxamento

TE<sub>50%</sub> - Tempo até 50% do pico de

encurtamento

TR<sub>50%</sub> - Tempo de Relaxamento a 50%

TVM – Teste de Velocidade Máxima

VD – Ventrículo Direito

VE – Ventrículo Esquerdo

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cronograma de Treinamento Físico Aeróbio	24
Quadro 2. Teste de Desempenho	25

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação Esquemática do Protocolo Experimental de 12 semanas23			
<b>Figura 2.</b> Esteira utilizada para a realização do protocolo de treinamento físico24			
Figura 3. Representação esquemática do sistema utilizado para análise hemodinâmica e			
cirurgia de canulação do ventrículo esquerdo através da artéria carótida			
direita			
<b>Figura 4.</b> Representação dos momentos/etapas do isolamento de			
cardiomiócitos			
Figura 5. Representação esquemática do aparato utilizado no isolamento de			
cardiomiócitos			
<b>Figura 6.</b> Representação dos momentos/etapas de formação do pellet30			
<b>Figura 7.</b> Representação de um miócito cardíaco			
<b>Figura 8.</b> Representação de um registro da contratilidade na frequência de 1Hz de um animal			
do grupo Exercício			
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do encurtamento de um cardiomiócito isolado32			
Figura 10. Representação de um registro do transiente de Cálcio na frequência de 1Hz de um			
animal do grupo Exercício			
$\textbf{Figura 11.} \ \ Representação \ \ esquemática \ \ da \ \ análise \ \ do \ \ transiente \ \ de \ \ Ca^{+2} \ \ e \ \ os \ \ parâmetros$			
avaliados			
<b>Figura 12.</b> Evolução semanal do peso corporal dos grupos			
<b>Figura 13.</b> Teste de desempenho físico realizado nos grupos exercitados37			
Figura 14. Respostas pressóricas e frequência cardíaca após as 12 semanas de protocolo			
experimental através de pletismografia de cauda			
<b>Figura 15.</b> Parâmetros Hemodinâmicos Arteriais			
<b>Figura 16.</b> Parâmetros Hemodinâmicos Ventriculares			
<b>Figura 17.</b> Área seccional transversa e Fração de Colágeno			
Figura 18. Parâmetros Contráteis de Cardiomiócitos Isolados após estimulação elétrica a			
1Hz44			
Figure 10 Cinética de Ca <sup>+2</sup> intracelular miocárdico			

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características Gerais	35
Tabela 2. Características Morfológicas	41
Tabela 3. Conteúdo de água nos Tecidos Cardíaco, Hepático e Pulmonar	42

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3. OBJETIVO	
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Protocolo Experimental	22
4.2 Protocolo de Treinamento Físico	23
4.3 Familiarização dos Animais	24
4.4 Teste de Velocidade Máxima Média	24
4.5 Administração de L-NAME	25
4.6 Avaliação Indireta da Pressão Arterial	25
4.7 Análise Hemodinâmica	26
4.8 Eutanásia e Coleta de Material Biológico	27
4.9 Análise Morfológica Miocárdica Post Mortem	27
4.10 Área Seccional Transversa do Miócito (AST)	27
4.11 Colágeno Intersticial Miocárdico	28
4.12 Determinação do Teor de Água nos Tecidos	28
4.13 Cardiomiócito Isolado	28
4.13.1 Isolamento do Cardiomiócito	28
4.13.2 Contratilidade Miocárdica	30
4.13.3 Parâmetros funcionais	31
4.13.4 Análise do Transiente de Cálcio Intracelular	32
4.14 Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	46
6.1 Composição corporal	46
6.2 Parâmetros Hemodinâmicos	49
6.3 Morfologia e AST	51
6.3.1 Colágeno Miocárdico	52
6.4 Função Miocárdica	54
7. CONCLUSÃO	
8. REFERÊNCIAS	60
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA	67

## 1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa que atua em múltiplas funções no organismo, sendo inicialmente identificado como fator de relaxamento vascular e, consequentemente, importante para o processo de vasodilatação de células endoteliais (KHAZAN e HDAYATI, 2015; SOBOLEWSKI et al, 2005). Sua síntese ocorre por meio de uma família de enzimas óxido nítrico sintases (NOS) a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina. As enzimas NOS apresentam três isoformas, sendo duas constitutivas e dependentes de Ca<sup>+2</sup> denominadas isoforma endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS); uma isoforma induzível (iNOS), independente de Ca<sup>+2</sup> com expressão e ativação estimulada em condições adversas na presença de mediadores envolvidos no processo inflamatório (KHAZAN e HDAYATI, 2015). O NO influencia a função cardíaca, seja em situações fisiológicas e patológicas (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004), onde este participa da captação de glicose, supressão da síntese de colágeno, crescimento e sobrevivência celular, contração celular e inibição endógena da cascata de sinalização da hipertrofia cardíaca patológica (KOLPAKOV et al. 1995; MATSUOKA et al. 1996; CAO et al. 1997; KINGWELL, 2000; OZAKI et al. 2002; XAVIER-VIDAL et al. 2003; SEDDON et al. 2007; LUNZ et al. 2011), além de apresentar propriedades antiaterogênicas (ALLEN et al. 2006) e desempenhar papel significativo no controle do fluxo sanguíneo coronário e do tônus vascular (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004).

Considerando a gama de processos fisiológicos que o NO participa no sistema cardiovascular, é possível considerar que sua inibição promova uma série de efeitos negativos a esse sistema, tais como a hipertensão arterial, aumento nos depósitos de colágeno, fibrose e necrose no miocárdio, e consequente redução da capacidade contrátil de corações isolados (MORENO JR et al, 1996; OLIVEIRA et al, 2000; BUNBUPHA et al, 2015; CEBOVA et al, 2017). Para a inibição da síntese de NO tem sido utilizado altas doses (20 a 100 mg/kg) de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um análogo da arginina que inibe a produção de ON por competição (VÍTEČEK et al., 2012). Entretanto, os estudos que utilizaram baixas doses de L-NAME (0,5 a 10 mg/kg/dia) não observaram efeitos deletérios ao coração, normalizando os valores pressóricos, além de acarretar maior relaxamento induzido pela acetilcolina e menor vasoconstrição induzido pela serotonina (BERNATOVÁ et al. 2007), sugerindo que a administração de baixa dose de L-NAME ativa a síntese de NO por feedback negativo e, consequentemente, promove benefícios ao sistema cardiovascular.

O exercício físico (EF) é outro fator que promove benefícios ao sistema cardiovascular, como aumento do VO2máx, diminuição da frequência cardíaca de repouso, maior capilarização do miocárdio, redução da pressão arterial (GLENNEY et al, 2017). Em corações isolados de modelos animais, essa ferramenta não farmacológica aumenta o número de miócitos cardíacos o débito cardíaco, a força contrátil e o mecanismo de Frank-Starling (RICHEY e BROWN, 1998; NATALI et al, 2002; BERNARDO MCMULLEN, 2016). O EF também é capaz de promover alterações na expressão de proteínas envolvidas na contratilidade (DIFFEE e NAGLE, 2003) e aumentar a biodisponibilidade cardíaca de ON por mecanismos que acarretam elevação da expressão e atividade das NOS (ZHANG et al, 2007; GRIJALVA et al, 2008). Contudo, poucos trabalhos estudam a associação entre o exercício físico aeróbio e o L-NAME na saúde cardiovascular (LUNZ et al. 2011; CARNEIRO-JÚNIOR et al. 2013b; BERNARDO e MCMULLEN, 2016). Cabe salientar que não foram encontrados estudos que avaliaram a função cardíaca quando utilizadas baixas doses de L-NAME (0,5 a 10 mg/dia) associado ao exercício físico aeróbio.

Diante desse contexto, o estudo justifica-se pela necessidade de se investigar os efeitos da interação do exercício físico aeróbio e administração crônica de baixa dose de L-NAME sobre o processo de remodelamento cardíaco, parâmetros funcionais contráteis e cinética de Ca<sup>+2</sup> intracelular. A hipótese desse trabalho é que a associação do exercício físico aeróbio e administração crônica com baixa dose de L-NAME promoverá benefícios de maior magnitude ao coração, aumentando a contratilidade miocárdica e melhorando a cinética de Ca<sup>+2</sup> intracelular quando comparado às intervenções isoladas.

#### 2. REFERENCIAL TEÓRICO

#### Óxido Nítrico

Em seu estado puro, sob condições normais de pressão, o NO é um gás (BARRETO et al. 2005) com meia vida de apenas alguns segundos, mas com ação sinalizadora intra e intercelular bastante ampla. Constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune, além de exercer papel fundamental e atuar como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (DUSSE et al. 2003). Sua importância fisiológica foi evidenciada a partir dos estudos produzidos por Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad, uma vez que foram premiados em 1998 com o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina. Esse achado foi importante para a ciência, uma vez que o NO é capaz de atuar como um importante mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvida em diversos processos (BARRETO et al. 2005).

A síntese de NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da Larginina, que é convertida em L-citrulina. Essa reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (SOUZA JUNIOR *et al.* 2012). A grande maioria do NO de mamíferos é derivada das enzimas (NOS), sendo identificadas três isoformas distintas de NOS, produtos de diferentes genes, localizações, regulação, propriedades catalíticas e sensibilidade ao inibidor. Duas dessas isoformas são constitutivas, a NOS1 ou nNOS, predominante no tecido neuronal com principal função na contratilidade e função neuromuscular (SOUZA JUNIOR *et al.* 2012), e NOS3 ou eNOS, predominante nas células endoteliais vasculares e com principal função no vasorrelaxamento do musculo liso (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; SOUZA JUNIOR *et al.* 2012). A terceira é conhecida como iNOS ou NOS2, sendo a isoforma induzível e é produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; DUSSE *et al.* 2003; IGNARRO, 2010).

Suas descobertas são antagônicas e complexas, no entanto, um fato que deve ser considerado é a capacidade do NO promover efeitos benéficos ou tóxicos, dependendo da sua concentração (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO produzido pela eNOS tem papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo e contratilidade do músculo cardíaco (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, serotonina e outros) ou quando há um aumento no atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial, o *shear-stress*, o qual é caracterizado pela tensão de cisalhamento, sendo a força

por unidade de área criada quando uma força tangencial (fluxo sanguíneo) atua sobre uma superfície (endotélio) (SOUZA JUNIOR *et al.* 2012).

O NO exerce participação no sistema nervoso autônomo, no endotélio e na resposta imunológica (RANG; DALE, 2016). Atua como mediador de inúmeros fenômenos como a citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano, regulação da pressão sanguínea basal, além de modular o diâmetro e resistência vascular através da sua capacidade de relaxar o músculo liso vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.* 2003).

#### Óxido Nítrico e Coração

O NO tem demonstrado regular a função cardíaca, tanto em condições fisiológicas, quanto em condições de doença. (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004). Além de ser um fator relaxante de vasos de resistência e estar diretamente relacionado à própria integridade da função endotelial (GOTO et al. 2003; LEUNG et al. 2008; VANHOUTE et al. 2009), o NO também participa de vários eventos fisiológicos no coração como, por exemplo, captação de glicose, supressão da síntese de colágeno, crescimento e sobrevivência celular, contração celular e inibição endógena da cascata de sinalização da hipertrofia cardíaca patológica (KOLPAKOV et al. 1995; MATSUOKA et al. 1996; CAO et al. 1997; KINGWELL, 2000; OZAKI et al. 2002; XAVIER-VIDAL et al. 2003; SEDDON et al. 2007; LUNZ et al. 2011), além de apresentar propriedades antiaterogênicas (ALLEN et al. 2006). O NO também desempenha papel significativo no controle do fluxo sanguíneo coronário e do tônus vascular (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004).

No coração, as isoformas constitutivas das NOS (eNOS e nNOS) são encontradas em diferentes localizações subcelulares, entretanto, ambas são dependentes e ativadas pelo aumento de Ca<sup>+2</sup> (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004). No cardiomiócito, a eNOS está localizada principalmente em regiões conhecidas como cavéolas, que são pequenas invaginações da membrana plasmática de formato vesicular. A eNOS também já foi encontrada associada aos receptores de rianodina (RyR). Quando se considera a estrutura cardíaca como um todo, a eNOS é encontrada em maior quantidade em células endoteliais dos vasos coronarianos e do endocárdio (SEDDON *et al.* 2007). Além disso, tem sido sugerido que o NO produzido a partir da eNOS desempenha importante função no controle da frequência cardíaca, na proteção contra lesões isquêmicas e na contração (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004)

A nNOS está localizada no retículo sarcoplasmático dos cardiomiócitos, sendo também encontrada acoplada às proteínas do sarcolema (SEDDON *et al.* 2007). Além disso, Xu *et al.* (1999) demonstrou que a nNOS está presente no armazenamento de Ca<sup>+2</sup> nos miócitos cardíacos. Em camundongos que hiperexpressam a nNOS, constatou-se que a nNOS interage com a ATPase de Ca<sup>+2</sup> do retículo sarcoplasmático (SERCA), importante proteína envolvida na recaptação de Ca<sup>+2</sup> intracelular, bem como com canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L, um importante tipo de canal envolvido na entrada de Ca<sup>+2</sup> para a contração muscular. As nNOS também são encontradas em nervos cardíacos autonômicos (MASSION *et al.* 2003; SEDDON *et al.* 2007). A iNOS é encontrada principalmente em células endoteliais dos vasos cardíacos, sendo hiperexpressada em situações de inflamação tecidual (SEDDON *et al.* 2007) e moduladas por citocinas inflamatórias (MASSION *et al.* 2003), independente de Ca<sup>+2</sup> (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004).

Em cardiomiócitos isolados os efeitos do NO são contraditórios, na qual tem sido visto os efeitos inotrópico positivo, porém, podendo ser negativo, variando de acordo com sua concentração (MASSION, 2003). Alguns estudos têm mostrado maior contratilidade em cardiomiócitos de camundongos *knockout* nNOS e eNOS (MARTIN *et al.* 2006; WANG *et al.* 2008). Por outro lado, estudos mostram menor contratilidade em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para nNOS (KHAN *et al.* 2003) e ausência de alteração contrátil em camundongos *knockout* para eNOS (MARTIN *et al.* 2006). Esses efeitos contraditórios podem estar relacionados aos modelos de estudo, uma vez que a eliminação dos genes nNOS, eNOS ou iNOS de forma isolada, extingue a produção de NO daquele gene, não eliminando completamente a produção de NO.

#### Óxido Nítrico e administração de L-NAME (em altas e baixas doses)

Levando em consideração a importância do NO em diversos processos fisiológicos, é indubitável que a inibição de curto e médio prazo da produção de NO promove uma série de efeitos deletérios ao coração. Na literatura atual, existe consenso de que quando reduzida a atividade do NO, a partir do desequilíbrio entre síntese e degradação através do estresse oxidativo, tem sido identificado como o mecanismo de maior relevância no processo multifatorial da disfunção endotelial e posteriores disfunções cardiovasculares (DIAS *et al.* 2011).

Para a inibição da síntese de NO são utilizados inibidores inespecíficos, derivados da Larginina e que atuam por competição. Um dos mais comuns desses inibidores é o *N<sup>c</sup>-nitro-L*-

arginine methyl ester (L-NAME). Tem sido visto que sua administração em doses altas (20 a 100 mg/kg) promove elevada e sustentada hipertensão arterial (RIBEIRO et al. 1992; BUNBUPHA et al. 2015; CEBOVA et al. 2017; SONODA et al. 2017) aumento nos depósitos de colágeno (BUNBUPHA et al. 2015), lesões isquêmicas no miocárdio caracterizadas por fibrose e necrose principalmente na região do subendocárdico ventricular (MORENO JR et al. 1996; OLIVEIRA et al. 2000; BUNBUPHA et al. 2015; CEBOVA et al. 2017), causando redução da capacidade contrátil em corações isolados (MORENO JR et al. 1996). Ressalta-se que esses efeitos deletérios parecem independentes do aumento da pressão arterial. Outros estudos demonstram que a administração crônica de L-NAME em ratos ou camundongos aumenta de forma compensatória as isoformas NOS ou a atividade das NOS em vários tecidos, incluindo o miocárdio, o que pode sugerir que, dependendo da duração do tratamento com L-NAME, pode-se observar efeitos positivos sobre a contratilidade de cardiomiócitos.

No entanto, ao avaliar estudos que utilizaram baixas doses de L-NAME (0,5 a 10 mg/kg/dia), tem sido verificada maior atividade das NOS na aorta e VE, além de maior relaxamento induzido pela acetilcolina e menor vasoconstrição induzida por serotonina na artéria femoral (BERNÁTOVÁ *et al.* 2007). Além disso, a administração (1,5 mg/kg/dia) por oito semanas não apresentou alterações quanto ao peso cardíaco, fibrose cardíaca e espessamento na área transversa das artérias aorta e femoral (OLIVEIRA *et al.* 2000; BERNÁTOVÁ *et al.* 2007), no entanto, observa-se diminuição do peso corporal e cardíaco com a administração de 7,5 mg/kg/dia (OLIVEIRA *et al.* 2000). Os autores também verificaram que a administração de baixas doses de L-NAME foi capaz de promover aumento da pressão arterial nas primeiras seis semanas, entretanto, esse parâmetro foi normalizado ao final das 8 semanas de tratamento (BERNÁTOVÁ *et al.* 2007).

Esses resultados sugerem que a administração de baixas doses de L-NAME (menor que 7,5mg/kg/dia) pode ser capaz de ativar a síntese de NO no sistema cardiovascular por *feedback* negativo e promover benefícios ao sistema cardiovascular, assim acarretar maior atividade das enzimas NOS e, reversão da hipertensão arterial causada pelo bloqueio da síntese de NO.

#### Exercício Físico Aeróbio e o Sistema Cardiovascular

Além dos possíveis benefícios que a adminstração de baixas doses de L-NAME pode proporcionar ao sistema cardiovascular, outro importante fator que promove benefícios à

saúde cardiovascular é o exercício físico. A literatura relata que o exercício físico realizado de forma aguda ou crônica promove efeitos protetores ao sistema cardiovascular tanto em indivíduos saudáveis quanto em situações patológicas (CARTER; RAY, 2015). O exercício físico e a melhora da condição cardiorrespiratória correlaciona-se inversamente com o risco e mortalidade por doenças cardíacas (SCHNOHR *et al.* 2011).

Dentre os possíveis efeitos causados pelo exercício físico aeróbio estão o aumento no consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2max</sub>) (GLENNEY *et al.* 2017), maior capilarização do miocárdio, diminuição da frequência cardíaca de repouso (BLOMQVIST; SALTIN, 1983) e durante o exercício submáximo (GLENNEY *et al.* 2017), além de redução da participação do sistema simpático (MINAMI *et al.* 2003). A redução da pressão arterial derivada do exercício físico também tem destaque, tanto em indivíduos normotensos quanto em hipertensos, estando esse efeito mais acentuado em indivíduos hipertensos (GLENNEY *et al.* 2017). Cabe ressaltar que esses efeitos estão relacionados tanto à fatores centrais, como a diminuição do débito cardíaco em resposta ao decréscimo da atividade simpática, quanto fatores periféricos, como redução da resistência vascular periférica em resposta a vasodilatação induzida pela liberação de NO. Além disso, o volume e a intensidade do exercício exercem influência sob a magnitude do efeito hipotensor, na qual exercícios aeróbios de maior intensidade e duração prolongada promovem maior hipotensão.

A literatura também aponta que o exercício físico aeróbio promove aumento na condução elétrica dos canais de Ca<sup>+2</sup> e K<sup>+</sup> na artéria mesentérica e aorta e, consequentemente, acarreta o relaxamento das artérias pela ação da acetilcolina (ACh) e aumento plasmático de nitrato (metabólito do NO), sugerindo aumento na produção do NO (CHEN; WU; YEN, 2001). Os benefícios do exercício físico aeróbio também se estendem a corações e cardiomiócitos isolados de modelos experimentais, na qual este aumenta as dimensões dos miócitos cardíacos (RICHEY e BROWN, 1998; NATALI *et al.* 2002; BERNARDO e MCMULLEN *et al.* 2016), eleva o débito cardíaco devido a melhora da adaptação mecânica (BRUM *et al.* 2004), melhora do mecanismo de Frank-Starling (SCHRAMMEL, 2015) e aumento na força contrátil absoluta (WISLOFF *et al.* 2001; NATALI *et al.* 2002). O exercício também promove alterações na expressão de proteínas envolvidas na contratilidade (DIFFEE e NAGLE, 2003).

#### Exercício Físico Aeróbio e NO (sistema cardiovascular)

O exercício físico realizado em apenas uma sessão (SOUZA JUNIOR *et al.* 2012) ou poucas semanas é capaz de aumentar a biodisponibilidade cardíaca de NO por mecanismos

que incluem o aumento da expressão e atividade das NOS (ZHANG et al. 2007; GRIJALVA et al. 2008), possibilitando aumentar a capacidade de regulação do tônus vascular, diminuição da pressão arterial, bem como prevenção de aterosclerose e hipertensão arterial (SOUZA JUNIOR et al. 2012). Além disso, também tem sido visto que o exercício fisico promove maior fosforilação de eNOS (YANG et al. 2014) e o aumento do NO derivado do endotélio de artérias coronárias pela força tangencial exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a superficie endotelial (estresse de cisalhamento ou shear stress) (KINGWELL, 2000). Esses efeitos parecem ocorrer por dois mecanismos: aumento da atividade de eNOS no endotélio vascular coronariano devido ao estresse hemodinâmico promovido pelo shear stress e elevação dos níveis de NO com consequente aumento da nNOS após o exercício físico. Esse efeito promove maior sensibilidade às alterações de pressão arterial e fluxo sanguíneo nas áreas de controle autoônico cardíaco (BRANDÃO; PINGE, 2007).

Com o treinamento físico aeróbio crônico, também tem-se visto aumento de elastina, fibrilina e conteúdo de eNOS na parede aórtica de ratos normotensos e hipertensos (MORAES-TEIXEIRA *et al.* 2010), mostrando que o óxido nitrico endotelial exerce influência no remodelamento vascular fisiopatológico.

#### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico e da administração de baixa dose de L-NAME sobre o processo de remodelação cardíaca, parâmetros contráteis e cinética de Ca<sup>+2</sup> em cardiomiócitos isolados.

#### 3.2 Específicos

Investigar se a administração cônica de baixa dose de L-NAME isoladamente ou associado ao exercício físico aeróbio, promoverá:

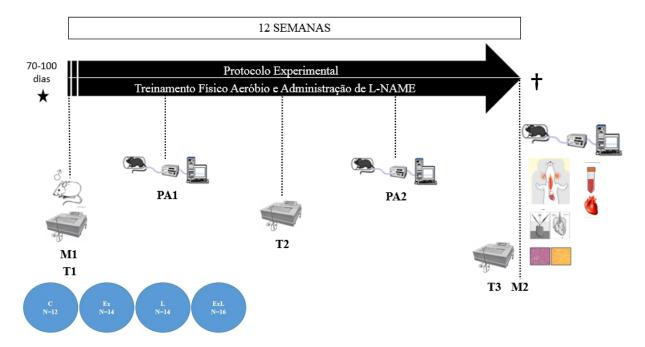
- Melhora da composição corporal;
- Remodelamento cardíaco com ajustes na morfologia e melhora da função hemodinâmica;
- Melhora da contratilidade miocárdica e do transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados;

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* (n = 56; 70 e 100 dias) com peso corporal (≅ 369g), fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espirito Santo (UFES). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas de polipropileno com tampas de arame cromado e forradas com maravalha de *Pinus* peneirada. O ambiente foi controlado com temperatura de 24 ± 2°C, umidade 55 ± 5% e ciclo de iluminação claro-escuro invertido de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" publicado pelo "*U.S. National Institutes of Health*" e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob protocolo 050/2012 (Anexo 1).

#### 4.1 Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: 1) *Exercício Físico* (Ex; n = 14): submetidos ao exercício aeróbio contínuo em esteira; 2) *L-NAME* (L; n = 14): submetidos à administração de baixa dose de L-NAME; 3) *Exercício Físico + L-NAME* (ExL; n = 16): submetidos concomitantemente ao exercício físico e à administração de baixa dose de L-NAME; 4) *Controle* (C; n = 12): submetidos ao mesmo tratamento que os demais grupos com exceção das intervenções por exercício físico e administração de L-NAME. Os ratos foram alimentados com ração específica para roedores (Nuvilab CR1-Nuvital, Colombo, Paraná, Brasil) e a água ofertada *ad libitum*. A duração do protocolo experimental foi de 12 semanas, conforme representação esquemática (Figura 2).



**Figura 1.** Representação esquemática do protocolo experimental de 12 semanas. Momento 1 (M1): início do protocolo experimental, administração de L-NAME e exercício físico aeróbio. T1: teste de velocidade máxima realizado na semana 0. PA1: medidas de pressão arterial indireta (pletismografia; semana 4). T2: teste de velocidade máxima realizado na semana 6. PA2: medida de pressão arterial indireta (pletismografia; semana 8). T3: teste de velocidade máxima realizado na semana 12. PA3: medida de pressão arterial indireta (pletismografia; semana 12). M2: término do protocolo experimental, hemodinâmica arterial, eutanásia dos animais e realização das análises *post mortem* (análises bioquímicas, histologia, coleta de tecidos, cardiomiócito isolado).

#### 4.2 Protocolo de Treinamento Físico

Os animais dos grupos Ex e ExL foram submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbio em esteira rolante específica para roedores (Figura 2; Insight Instrumentos - Ribeirão Preto, SP, Brasil). O programa de exercício físico aeróbio utilizado, com progressão de intensidade e duração, está demonstrado no Quadro 1. Nas semanas 1 a 5, o treinamento físico aeróbio foi realizado 5 vezes por semana. A partir da 6ª semana, o exercício físico foi realizado com frequência semanal de 3 vezes devido à alta taxa de mortalidade de animais do grupo ExL (aproximadamente 90%), verificada em estudo anterior (LUNZ et al, 2011). A intensidade e a duração do treinamento apresentaram-se de forma ondulatória, onde entre as semanas de 1 a 3, a intensidade foi de 50% da velocidade máxima média (VMM) obtida no teste de desempenho. Nas semanas 4 a 6, a intensidade foi de 60% da VMM; para as semanas 7 e 9, a intensidade foi de 70% e; entre as semanas 10 e 12, a intensidade foi de 80%.



Figura 2. Esteira utilizada para realização do protocolo de treinamento físico.

**Quadro 1.** Cronograma de Treinamento Físico Aeróbio

SEMANA	INTENSIDADE	DURAÇÃO				
Adaptação	10m/min	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA
1	50% da velocidade	15 min	15 min	15 min	30 min	30min
2	50% da velocidade	30 min	30 min	30 min	45 min	45 min
3	50% da velocidade	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
4	60% da velocidade	15 min	15 min	15 min	30 min	30 min
5	60% da velocidade	30 min	30 min	30 min	45 min	45 min
6	60% da velocidade	60 min		60 min		60 min
7	70% da velocidade	15 min		15 min		30 min
8	70% da velocidade	30 min		30 min		45 min
9	70% da velocidade	60 min		60 min		60 min
10	80% da velocidade	15 min		15 min		30 min
11	80% da velocidade	30 min		30 min		45 min
12	80% da velocidade	60 min		60 min		60 min

#### 4.3 Familiarização dos Animais

Antes do início do treinamento físico aeróbio, todos os animais foram aclimatados e colocados na esteira rolante por 5 dias para verificação da predisposição à corrida. Nesse período foi utilizada a duração de 10 min/dia, 0° de inclinação e velocidade de 10 m/minuto.

#### 4.4 Teste de Velocidade Máxima Média

Após 48h, os ratos que apresentaram predisposição à corrida foram submetidos a protocolo para determinação da velocidade máxima de corrida em teste de desempenho (Quadro 2). Os animais iniciaram o teste com velocidade de 10 m/min, 0° de inclinação e incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até o momento em que o animal não conseguia continuar o teste e/ou exaustão. O momento de encerramento do teste foi quando o animal não

conseguiu manter a coordenação da corrida de acordo com a velocidade da esteira (*adaptado* de MORAES-TEIXEIRA *et al.* 2010). Após a realização do teste de desempenho, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais a partir de pareamento pela capacidade de esforço. Os testes foram realizados no início do protocolo de treinamento aeróbio (momento 0), 6ª semana e 12ª semana.

**Quadro 2.** Teste de Desempenho

TEMPO (minutos)	VELOCIDADE
0	10 m/min
3	13 m/min
6	16 m/min
9	19 m/min
12	22 m/min
15	25 m/min
18	28 m/min
21	31 m/min
24	34 m/min
27	37 m/min

#### 4.5 Administração de L-NAME

A administração de L-NAME foi realizada diariamente por meio de gavagem orogástrica durante 12 semanas do protocolo experimental. Os animais dos grupos L e ExL receberam a droga na concentração de 1,5 mg/kg/dia (BERNÁTOVÁ *et al.* 2007). Na 12ª semana do protocolo experimental, a administração de L-NAME foi encerrada, precedendo o teste de desempenho final. Os grupos C e Ex receberam aproximadamente 0,2 ml de água (*quantidade similar em ml administrada aos grupos tratados*).

#### 4.6 Avaliação Indireta da Pressão Arterial

A pressão arterial sistêmica foi composta pela análise da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), sendo realizada em três tempos diferentes (4ª, 8ª e 12ª semana) e, avaliadas indiretamente por meio do método de pletismografia de cauda acoplado ao sistema de aquisição de dados (IITC INC, Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Os animais foram acomodados em câmara aquecida, com temperatura média de 37°C por 15 minutos com intuito de promover vasodilatação da artéria caudal. Após esse período, na região proximal da cauda foi conectado um manguito de borracha com transdutor de pressão de 0 a 300 mmHg. Os valores da PAS, PAD e FC foram obtidos por meio dos sinais do transdutor acoplado ao computador e analisados em software específico (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems,

Inc, Santa Barbara, CA, USA). Para o cálculo da PAM utilizou-se a seguinte fórmula: (PAS + 2\*`PAD)/3. Foi realizado uma média de 3 registros obtidos por animal, sendo descartados os registros associados com movimento da cauda e/ou outros agentes estressores que pudessem interferir na aferição da PA.

#### 4.7 Análise Hemodinâmica

Ao final do protocolo experimental, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e submetidos à cirurgia de cateterização da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso na pata, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Após a anestesia, os ratos foram mantidos em manta aquecedora e suplementação de oxigênio (0,5 L/min). Para a canulação da artéria carótida direita foi inserido um cateter millar (SPR-320), o qual foi direcionado ao ventrículo esquerdo (VE) para mensurar a pressão intraventricular. Após registro, o cateter foi retraído para a artéria carótida para registrar a pressão arterial e verificar se não houve dano à válvula aórtica.

Para a obtenção dos dados hemodinâmicos foi utilizado o período mínimo de estabilização de 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD); frequência cardíaca (FC); pressão sistólica e diastólica final do ventrículo esquerdo (PSVE e PDfVE); máximas derivadas de pressão intraventricular positiva (+dP/dt<sub>máx</sub>) e negativa (-dP/dt<sub>máx</sub>), estas últimas obtidas a partir da aquisição da primeira derivada temporal dos registros de ondas de pressão intraventricular e a constante de tempo do relaxamento (TAU).



**Figura 3**. A) Cirurgia de canulação do ventrículo esquerdo através da artéria carótida direita (Adaptado de Smith et al. 1979). B) Representação do sistema utilizado para aquisição de dados.

#### 4.8 Eutanásia e Coleta de Material Biológico

Para a obtenção do material biológico, os animais, após permaneceram em jejum por 12 horas, foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e, em seguida eutanasiados. Posteriormente, foi realizada a excisão cardíaca para análise dos parâmetros morfológicos.

#### 4.9 Análise Morfológica Miocárdica Post Mortem

A remodelação ao nível macroscópico foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, dos átrios, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o comprimento da tíbia. A tíbia foi removida e limpa dos tecidos circundantes moles para posterior mensuração do comprimento a partir de um paquímetro (*ZAAS Precision - Amatools* Comercial e Importadora Ltda.).

#### 4.10 Área Seccional Transversa do Miócito (AST)

A análise da área seccional transversa do miócito foi realizada utilizando amostras do ventrículo esquerdo (VE). Após toracotomia mediana, o coração foi removido e amostras da parede anterior do VE retiradas. Fragmentos do VE foram colocados em solução de paraformaldeído (4%, pH 7.4) e o tecido miocárdico transferido para solução de etanol 70%, sendo posteriormente incluído em bloco de parafina. Os cortes histológicos de 6 μm de espessura foram corados em lâmina com solução de hematoxilina-eosina (HE) e projetados em aumento de 40 vezes com o auxílio de microscópio, (AX70, Olympus Optical CO, Hamburg Germany), acoplado à câmera de vídeo, a qual envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para cálculo das áreas seccionais dos miócitos foram mensuradas 50 células por VE. Os miócitos analisados, localizados na camada subendocárdica da parede muscular, estavam seccionados transversalmente e apresentavam forma arredondada com núcleo visível no centro da célula (MATSUBARA et al., 2000). Para caracterizar a ausência ou presença de hipertrofia cardíaca foram utilizadas as áreas seccionais transversas dos miócitos (AST; μm²).

#### 4.11 Colágeno Intersticial Miocárdico

A determinação do percentual de colágeno (%) foi realizada por meio da técnica de *Picrosirius Red*, sendo o colágeno perivascular excluído e mensurado apenas o colágeno intersticial. Fragmentos de VE foram transferidos para etanol 70% diluído em água, inclusos em blocos de parafina e corados com *Picrosirius Red* (Lattouf, 2014). A quantificação da fração do colágeno intersticial foi realizada utilizando-se 30 a 40 campos por fragmento. Os componentes do tecido foram identificados de acordo com o nível de coloração: vermelho, fibras colágenas; amarelo, miócitos e branco, espaço intersticial. Os cortes histológicos foram ampliados em 40 vezes com o auxílio de microscópio biológico (BEL Photonics Reaserch Bio 3, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). As análises foram realizadas por meio de programa de análises (ImagePro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

#### 4.12 Determinação do Teor de Água nos Tecidos

O percentual de água tecidual em amostras do VE, pulmão e fígado foi realizada após a remoção dos tecidos, aferindo-se inicialmente o peso *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Nova Instruments Equipamentos p/ Laboratório Ltda., Piracicaba, São Paulo, Brasil) sob temperatura de 55 ± 5°C por período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: [(Peso *in natura* – Peso seco)/Peso *in natura*] x 100%.

#### 4.13 Cardiomiócito Isolado

A análise da contratilidade miocárdica foi realizada por meio da técnica de cardiomiócito isolado, conforme técnica descrita por Guatimosim *et al* (2001).

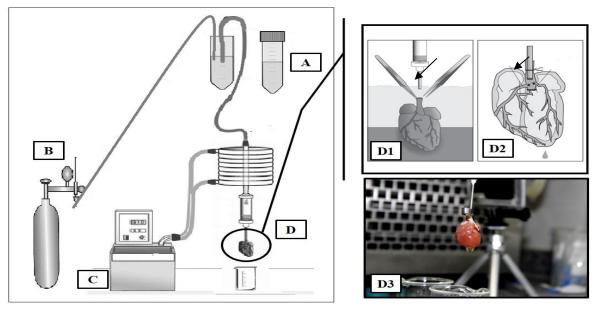
#### 4.13.1 Isolamento do Cardiomiócito

Ao final do protocolo experimental, 20 animais (C, n=5; L, n= 4; Ex, n= 6; ExL, n=5) foram heparinizados 30 minutos antes da eutanásia (500U/kg/ip; Hepamax-S<sup>®</sup>, Blau Farmacêutica S.A, Cotia, São Paulo, Brasil) e anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda. - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda. - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), eutanasiados e submetidos à toracotomia mediana (Figura 3A). Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para uma placa de petri contendo solução de digestão (Digestion Buffer - DB) mais ácido etileno glicol tetracético [(EGTA) - ethyleneglycol-bis (β-aminoethylether) - N, N, N', N'-

tetraaceticacid] + N-2-hidroxietil piperazina N-2-etano sulfonico (HEPES) (Figura 3B). A solução DB consistia de solução básica com água ultrapura (milli-Q) e apresentava a seguinte composição (mM): NaCl (130); MgCl<sub>2</sub> (1,0); KCl (5,4); N-2-hidroxietil piperazina N-2-etano sulfonico (HEPES) (25); glicose (22); NAH<sub>2</sub>PO4 (0,33); pH = 7,39. Após a limpeza do coração, o tecido foi pesado em um becker contendo 20 ml da solução DB + EGTA + HEPES. A artéria aorta foi canulada utilizando-se a técnica de Langendorff e o coração perfundido com solução de DB+HEPES+EGTA em fluxo constante para limpeza dos vasos coronários por um período de 2 a 3 minutos (Figura 3C). Após a realização desse procedimento, o coração do grupo C foi perfundido com solução enzimática contendo solução DB, collagenase (20 mg) e Ca<sup>+2</sup> (1 mM) durante um período de 10 a 15 minutos. As soluções utilizadas neste processo foram continuamente aeradas com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas em banho maria a 37,5°C (Figura 4).

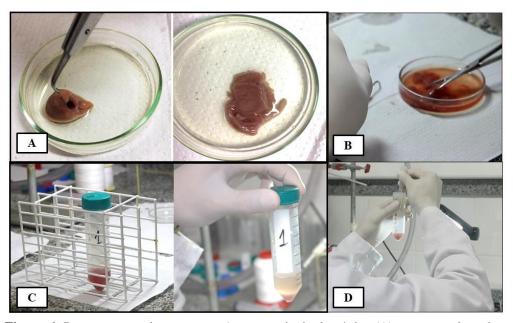


**Figura 4.** Representação dos momentos/etapas de isolamento, digestão e perfusão do cardiomiócito: toracotomia mediana para retirada do coração (A); limpeza do coração em placa de petri (B); canulação da aorta (C).



**Figura 5.** Representação esquemática do aparato: A: tubos com soluções de limpeza e enzimática para isolamento, digestão e perfusão; B: cilindro de mistura carbogênica para manter as soluções aeradas; C: banho circulante utilizado para manter a temperatura constante do aparato (37°C); D: cânula; D1: canulação pelo arco aórtico; D2: demonstração da perfusão de soluções após canulação; D3: coração canulado durante o protocolo experimental (adaptado de LOUCH et al., 2011).

Após o período de perfusão, os átrios foram retirados e o coração foi cortado em uma placa de petri contendo solução DB + albumina + collagenase + Ca<sup>+2</sup> (1mM) (Figura 5A e B). Os fragmentos do coração (*pellet*) foram ressuspendidos levemente em um Becker com pipeta *pasteur* por 2 minutos em banho maria a 37,5°C. Em seguida, as células foram dissociadas, ressuspendidas e filtradas. Após 10 minutos, o sobrenadante foi removido, mantendo o *pellet*, e posteriormente acrescentado soluções de DB + albumina + Ca<sup>+2</sup> a 1 Mm (Figura 5C e D). A etapa descrita acima foi repetida duas vezes, no entanto, com mudanças na quantidade de Ca<sup>+2</sup> (1,6 μL e 3,12 μL, respectivamente). A cada etapa, o tubo contendo as células e as soluções foi mantido em repouso por aproximadamente 10 minutos e o sobrenadante descartado. Após o término dessas etapas (duas trocas de solução) e retirada do sobrenadante, foi adicionado ao *pellet* solução estoque (Tyrode) com a seguinte composição (mM): NaCl (140); HEPES (10); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,33); MgCl<sub>2</sub> (1); KCl (5); CaCl<sub>2</sub> (1,8) e Glicose (10). As soluções utilizadas neste processo foram aquecidas previamente a 37,5°C.



**Figura 6.** Representação dos momentos/etapas: retirada dos átrios (A); corte na placa de petri (B); tubo em repouso para formação do pellet (C); retirada do sobrenadante (D).

#### 4.13.2 Contratilidade Miocárdica

A contração celular foi mensurada por meio da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, utilizando um sistema de detecção de bordas acoplado ao microscópio invertido (IonOptix, Milton, MA, USA) com lente objetiva de 40 vezes (Nikon Eclipse - TS100, EUA). Os cardiomiócitos foram acomodados em câmara experimental com base de vidro, banhados por solução Tyrode e visualizados em um monitor por meio de uma câmera

(Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA, 240 Hz) acoplada ao microscópio com programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, Westwood, Massachusetts, USA).

Os cardiomiócitos foram estimulados sob frequência de 1Hz com duração de 5 milissegundos e voltagem de 20V, utilizando-se par de eletrodos de aço e estimulador elétrico de campo (Myopacer, IonOptix, Milton, MA, USA). As medidas de contratilidade foram realizadas em cardiomiócitos isolados que apresentaram as seguintes condições: bordas e estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem apresentar contrações voluntárias (Figura 6).

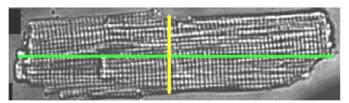
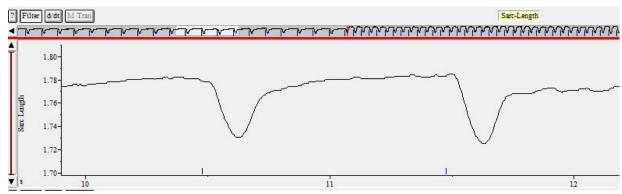


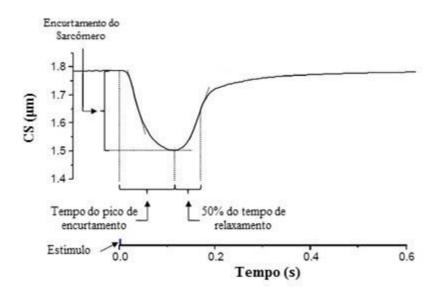
Figura 7. Representação de um miócito cardíaco.

#### 4.13.3 Parâmetros funcionais

As propriedades contráteis dos cardiomiócitos foram avaliadas utilizando sistema de aquisição (SarcLen, IonOptix, Milton, MA). As alterações no comprimento dos sarcômeros (CS) foram registradas e, posteriormente, analisadas utilizando software específico (Ion Wizard, IonOptix, Milton, MA, EUA). Foram avaliados o comprimento dos sarcômeros (CS) e os seguintes parâmetros contráteis: percentual de encurtamento (PE), tempos até 50% do pico de encurtamento (TE<sub>50%</sub>) e de relaxamento (TR<sub>50%</sub>).



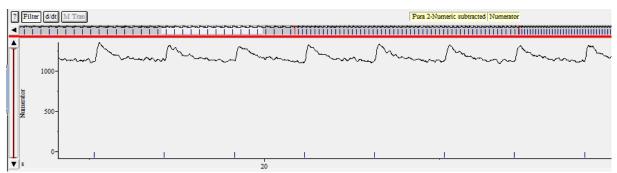
**Figura 8.** Representação de um registro da contratilidade na frequência de 1Hz de um animal do grupo Exercício.



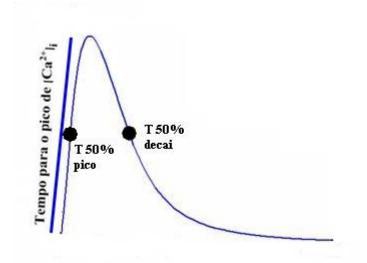
**Figura 9.** Representação esquemática do encurtamento de um cardiomiócito isolado e dos respectivos parâmetros da contração celular. CS: comprimento do sarcômero.

#### 4.13.4 Análise do Transiente de Cálcio Intracelular

As medidas do transiente de Ca<sup>+2</sup> em cardiomiócitos isolados foram realizadas por meio de um sistema de medição de fluorescência (IonWizard, IonOptix, EUA) que sincroniza o controle da luz de excitação com a coleta a partir de sensores de emissão. Este sistema fica conectado ao microscópio e se comunica diretamente com a câmera de vídeo e com o sistema de aquisição de dados. Os cardiomiócitos foram carregados com 1 µM do indicador de fluorescência para cálcio intracelular Fura-2 acetoxymethyl Ester (Fura-2AM, F1221, Molecular Probes®), por 15 minutos, lavados e mantidos em temperatura ambiente, livre de luz, com o intuito de permitir a permeabilidade à membrana plasmática, para posterior identificação pelo método de fluorescência. As células foram alternadamente excitadas nos comprimentos de onda 340 e 380 nm em frequências acima de 250 pares/segundo utilizando o sistema HyperSwitch (IonOptix, Milton, MA, EUA). Essa frequência é independente da geometria celular e intensidade da frequência de excitação, e reflete as concentrações intracelulares de cálcio. As frequências de FURA-2AM coletadas no comprimento de onda 510 nm foram utilizadas para corrigir o background. O protocolo seguiu os procedimentos indicados pelo fornecedor do produto (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Dez células por animal foram estimuladas em frequências de 1Hz, voltagem de 30V e duração de 20s. As variáveis analisadas foram: amplitude máxima do transiente de Ca+2; tempos para 50% do pico (ms) e 50% do decaimento do Ca<sup>+2</sup>.



**Figura 10.** Representação de um registro do transiente de cálcio (Ca<sup>+2</sup>) na frequência de 1Hz de um animal do grupo Controle.



**Figura 11.** Representação esquemática da análise da imagem do transiente de Ca<sup>+2</sup> e os parâmetros avaliados.

#### 4.14 Análise Estatística

O programa estatístico utilizado foi o *SigmaStat* versão 3.5, sendo os dados expressos por meio de média ± erro padrão da média (EPM) e submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* para averiguar a aderência à normalidade.

As comparações dos testes de velocidade máxima foram realizadas por meio do teste *t de Student* para amostras independentes. Para as comparações entre os grupos C, L, Ex e ExL utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para o modelo de dois fatores (L-NAME e exercício físico), complementada com o teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados da evolução do peso corporal e pressão arterial indireta por pletismografia foram comparados a partir da análise de variância com medidas repetidas (ANOVA-RM - duas vias), complementada com o teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

#### **5. RESULTADOS**

Os resultados demonstram que o ganho de peso corporal, depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal, gordura total e índice de adiposidade do grupo L foram significativamente menores quando comparados ao grupo C. Percentualmente, o L apresentou redução de 26,4% e 33% nos depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal quando comparado ao C, respectivamente. Os achados também demonstram que a gordura total e o índice de adiposidade foram 25% e 20,7% menores no L em relação ao C. Não houve diferença significativa para os valores de PCI, PCF, CNA e depósito de gordura visceral entre os grupos C e L.

Os resultados também mostram que o grupo Ex apresenta valores de ganho de peso corporal, PCF, CNA, depósitos de gordura visceral, retroperitoneal e epididimal, gordura total e índice de adiposidade significativamente menores que o grupo C. Esses achados em valores percentuais mostram que o exercício físico reduziu o ganho de peso corporal e o PCF em 29,7% e 13%, respectivamente. Além disso, os resultados apontam redução de 38%, 58,6% e 53,3% nos depósitos de gordura visceral, retroperitoneal epididimal em relação ao C, respectivamente. Houve também diminuição de 51% e 44% na gordura total e IA no grupo Ex em relação ao grupo C. Não houve diferença significativa para os valores de PCI entre os grupos C e Ex.

O PCF, ganho de peso corporal, depósito de gordura retroperitoneal, gordura total e índice de adiposidade foram significativamente maiores no grupo ExL em relação ao grupo Ex. Percentualmente o PCF, o ganho de peso corporal, o depósito de gordura retroperitoneal, gordura total e IA apresentaram elevação de 9,4%, 33,7%, 49,7%, 42,6% e 31% em relação ao Ex, respectivamente. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística para o depósito de gordura visceral, é importante destacar que o grupo ExL apresentou maiores valores desse parâmetro em relação ao Ex (p=0,059). Não foram encontradas diferenças estatísticas no CNA, depósitos de gordura visceral e epididimal entre os grupos Ex e ExL. Além disso, o peso corporal inicial foi similar entre os grupos experimentais (p = 0,363).

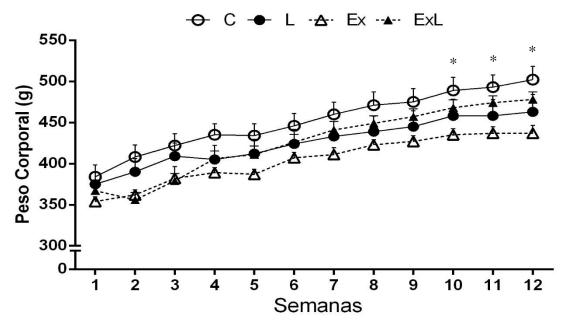
Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ExL e L para PCI, PCF, ganho de peso corporal, CNA, depósitos de gordura visceral, retroperitoneal e epididimal, bem como na gordura total e IA. No entanto, apesar de não ter sido encontrado diferença significativa para o ganho de peso corporal, esse parâmetro foi menor no grupo L em relação ao ExL (p=0,052).

Tabela 1. Características Gerais

Variáveis	Grupos Experimentais			
v at lavels	C (n=12)	L (n=14)	Ex (n=14)	ExL (n=16)
PCI (g)	$384 \pm 14$	$375 \pm 15$	$354 \pm 6$	$367 \pm 9$
PCF (g)	$502 \pm 16$	$463 \pm 21$	$437 \pm 9^*$	$478 \pm 9^{\#}$
Ganho de Peso Corporal (g	$118 \pm 10$	$88\pm8^*$	$83 \pm 8^*$	$111 \pm 7^{\#}$
CNA (cm)	$26,8 \pm 0,2$	$26,0 \pm 0,4$	$25,9 \pm 0,3*$	$26,4 \pm 0,2$
Visceral (g)	$7,21 \pm 0,65$	$5,97 \pm 0,69$	$4,46 \pm 0,43^*$	$5,87 \pm 0,34$
Retroperitoneal (g)	$13,5 \pm 1,5$	$9,93 \pm 1,23^*$	$5,59 \pm 0,45^*$	$8,37 \pm 0,55^{\#}$
<b>Epididimal</b> (g)	$6,04 \pm 1,02$	$4,05 \pm 0,63^*$	$2,82 \pm 0,34^*$	$4,13 \pm 0,23$
Gordura Total (g)	$26,7 \pm 2,7$	$20,0 \pm 2,4^*$	$12,9 \pm 1,0^*$	$18,4 \pm 1,0^{\#}$
IA (%)	$5,25 \pm 0,41$	$4,16 \pm 0,34^*$	$2,94 \pm 0,22^*$	$3,85 \pm 0,20^{\#}$

Valores apresentados como média ± EPM. n = número de animais; C = controle; L = administração de dose baixa de L-NAME; Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio; ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio. PCI = peso corporal inicial; PCF = peso corporal final; CNA = comprimento naso-anal; IA = índice de adiposidade. p<0,05. \* vs. C; \* vs. Ex. ANOVA duas vias complementada com o teste post hoc de Tukey.

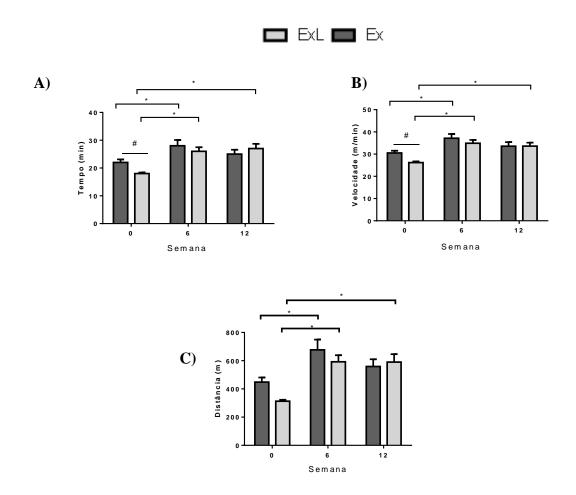
Os resultados demonstram que o grupo Ex apresentou evolução de peso corporal menor quando comparado ao grupo C a partir da 10<sup>a</sup> semana de tratamento (p=0,05), permanecendo essa diferença até a 12<sup>a</sup> semana (Figura 12). Em valores percentuais, as diferenças no peso corporal nas semanas 10, 11 e 12 correspondem a uma redução de 11%, 11% e 12% no peso corporal em relação ao C, respectivamente. Não houve diferença estatística para o peso corporal entre os demais grupos ao longo das 12 semanas do protocolo experimental.



**Figura 12.** Evolução do peso corporal dos grupos após 12 semanas de protocolo experimental. Valores apresentados como média ± EPM. C = controle (n = 12); L = administração de dose baixa de L-NAME (n = 14); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n = 14); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n = 16). ANOVA duas vias de medidas repetidas complementada com o teste *post hoc* de Tukey. Fator Tratamento com Ex e L-NAME (p = 0,096), Fator Tempo/Semana (p<0,001) e interação entre tratamento e semana (p<0,001). \* p<0,05; Ex vs. C.

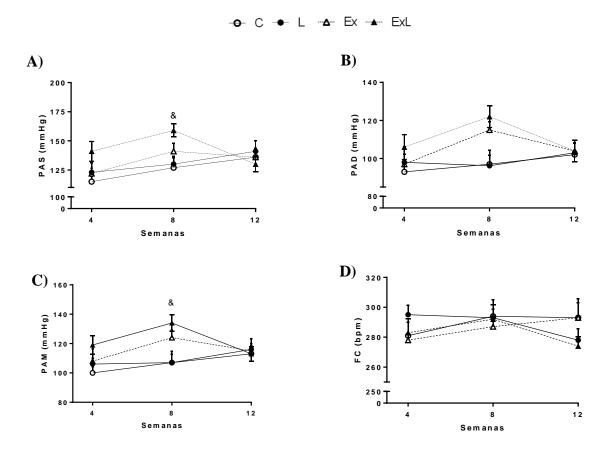
Os resultados demonstram diferenças significativas no tempo percorrido  $(28 \pm 2 \text{ min } vs. 22 \pm 1 \text{ min; p=0,001})$ , velocidade  $(37 \pm 3 \text{ m/min } vs. 31 \pm 1 \text{ m/min; p=0,001})$  e distância percorrida  $(677 \pm 73 \text{ m } vs. 448 \pm 33; \text{ p=0,001})$  do grupo Ex na semana 6 em relação à semana 0 (Figura 13A-C). Comparado com a semana 0, o grupo ExL apresenta diferenças estatística com maiores valores de tempo percorrido  $(26 \pm 1 \text{ min } vs. 18 \pm 0,4 \text{ min; p=0,001})$ , velocidade  $(35 \pm 1 \text{ m/min } vs. 26 \pm 0,5 \text{ m/min; p=0,001})$  e distância  $(592 \pm 48 \text{ m e } 314 \pm 10 \text{ m; p=0,001})$  na semana 6. Além disso, os resultados apontam que o grupo ExL apresenta na  $12^a$  semana o tempo  $(27 \pm 2 \text{ min e } 18 \pm 0,4 \text{ min; p=0,001})$ , velocidade  $(34 \pm 2 \text{ m/min e } 26 \pm 1 \text{ m/min; p=0,001})$  e distância percorrida  $(590 \pm 57 \text{ m e } 314 \pm 10 \text{ m; p=0,001})$  maiores quando comparado à semana 0. Não houve diferença estatística para os parâmetros avaliados entre as semanas 6 e 12 em ambos os grupos.

Além disso, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos Ex e ExL no tempo ( $22 \pm 1 \text{ min } vs.\ 18 \pm 0,4 \text{ min; p=0,015}$ ) e velocidade percorrida ( $31 \text{ m/min} \pm 1 \text{ } vs.\ 26 \pm 0,5 \text{ m/min; p=0,021}$ ) na semana 0. Embora não estatisticamente diferente, a distância percorrida também apresentou maiores valores no grupo Ex em relação ao grupo ExL ( $448 \pm 33 \text{ m e } 314 \pm 10 \text{ m; p=0,056}$ ) quando comparados os valores da semana 0, onde foi realizado o primeiro teste de velocidade máxima. Não houve diferença estatística para os parâmetros avaliados entre os grupos Ex e ExL nas semanas 6 e 12.



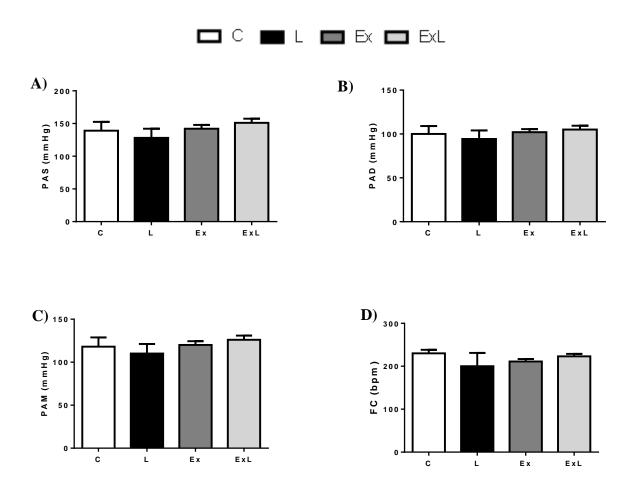
**Figura 13.** Teste de desempenho físico realizado nos animais dos grupos exercitados. Ex: (n=14) e ExL (n=16). Dados expressos em média ± EPM. Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio; ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio. A) velocidade máxima atingida; B) tempo percorrido; C) distância percorrida. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste *post hoc* de Bonferroni. p<0,05; (; \* vs Semana 0) # Ex vs. ExL

As Figuras 14A-D mostram valores obtidos de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais conscientes após 12 semanas de protocolo experimental. Os resultados demonstram diferença significativa na PAS (ExL: 159 ± 6 mmHg vs. L: 130 ± 7 mmHg; p=0,049) e na PAM (ExL: 134 ± 6 mmHg e L: 107 ± 6 mmHg; p=0,02) entre os grupos ExL e L na oitava semana do protocolo experimental (Figs. 14A e C). Os demais grupos apresentaram comportamento similar para a PAS e PAM. Não houve diferença estatística entre os grupos para as variáveis PAD e FC ao longo das 12 semanas.



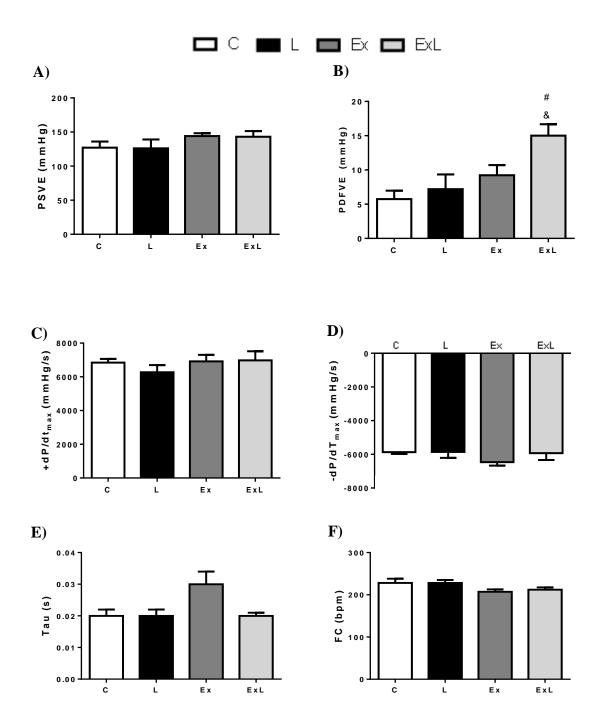
**Figura 14.** Respostas pressóricas e frequência cardíaca após 12 semanas de protocolo experimental. C = controle (n=8); L = administração de dose baixa de L-NAME; (n=7); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n=6); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=6). A) PAS: pressão arterial sistólica; B) PAD: pressão arterial diastólica; C) PAM: pressão arterial média; D) FC: frequência cardíaca. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Tukey. p<0,05, & ExL *vs.* L.

A Figura 15A-D apresenta os dados das variáveis hemodinâmicas arteriais em animais anestesiados. Os resultados demonstram que não foram encontradas diferenças estatísticas para as variáveis de pressão arterial sistólica e diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca entre os grupos experimentais ao final do protocolo experimental.



**Figura 15.** Valores apresentados como média ± EPM. C = grupo controle (n=5); L = administração de dose baixa de L-NAME (n=6); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n=7); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=6). PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca. ANOVA duas vias complementada com o teste *post hoc* de Tukey.

A Figura 16A-F apresenta os dados das variáveis hemodinâmicas referentes à análise ventricular em animais anestesiados. A PDfVE foi significativamente maior no ExL em relação ao L e Ex, respectivamente (ExL: 15 ± 2 mmHg vs. L: 7 ± 2 mmHg e Ex: 9 mmHg ± 1) (Figura 16B). Percentualmente, o ExL apresentou aumento de 52% e 38,7 % na PDfVE, quando comparado aos grupos L e Ex, respectivamente. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística para FC, PSVE, +dP/dT<sub>máx</sub> e -dP/dT<sub>máx</sub> e TAU entre os grupos experimentais.



**Figura 16.** Valores apresentados como média ± EPM. C = controle (n=5); L = administração de dose baixa de L-NAME (n=6); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n=7); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=6). PSVE = pressão sistólica ventricular esquerda; PDfVE = pressão diastólica final ventricular esquerda; FC = frequência cardíaca; +dP/dt<sub>máx</sub>: derivada máxima positiva de pressão do VE; -dP/dt<sub>máx</sub>: derivada máxima negativa de pressão do VE; Tau: constante temporal de relaxamento. ANOVA duas vias complementada com o teste *post hoc* de Tukey; p<0,05; # ExL *vs*. Ex; & ExL *vs*. L.

Não houve diferença estatística para as variáveis morfológicas entre os grupos L e C. No entanto, os resultados mostram que foram encontrados valores significativos menores de AT (Ex:  $0.09 \text{ g} \pm 0.01 \text{ vs.}$  C:  $0.13 \pm 0.01$ ) e AT/Tíbia (Ex:  $0.022 \text{ g/cm} \pm 0.002 \text{ vs.}$  C:  $0.031 \pm 0.002$ ) entre os grupos Ex e C com consequente redução de 30,7% e 29%, respectivamente (Tabela 2).

O grupo ExL apresentou valores significativamente maiores de AT em relação ao Ex (ExL:  $0.13 \pm 0.01 \ vs$ . Ex:  $0.09 \pm 0.01 \ g$ ) e relação AT/Tíbia (ExL:  $0.032 \pm 0.002 \ g$ /cm vs. Ex:  $0.022 \pm 0.002 \ g$ /cm), com elevação de 44% e 45%, respectivamente. Além disso, a relação Coração/Tíbia foi significativamente maior no ExL quando comparado ao L (ExL:  $0.32 \pm 0.01 \ vs$ . L:  $0.28 \pm 0.01 \ g$ /cm. Não houve diferença significativa para as variáveis de coração total, VE, VD, tíbia, VE/Tíbia, VD/tíbia, pulmão e pulmão/PCF entre os grupos ExL e Ex (Tabela 2).

Tabela 2. Características Morfológicas

Variáveis	Grupos Experimentais				
	C (n=6)	L (n=7)	Ex (n=5)	ExL (n=10)	
Coração (g)	$1,26 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,05$	
VE (g)	$0,89 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,03$	
VD (g)	$0,25 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$	
AT (g)	$0,13 \pm 0,01$	$0,\!12\pm0,\!01$	$0,09 \pm 0,01^*$	$0,13 \pm 0,01^{\#}$	
Tíbia (cm)	$4,10 \pm 0,04$	$4,19 \pm 0,07$	$4,10 \pm 0,03$	$3,98 \pm 0,05$	
Coração/Tíbia (g/cm)	$0,31 \pm 0,01$	$0,\!29 \pm 0,\!01$	$0,29 \pm 0,02$	$0.32 \pm 0.01$ <sup>&amp;</sup>	
VE/Tíbia (g/cm)	$0,22 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	
VD/Tíbia (g/cm)	$0,061 \pm 0,007$	$0,051 \pm 0,004$	$0,054 \pm 0,004$	$0,060 \pm 0,003$	
AT/Tíbia (g/cm)	$0,031 \pm 0,002$	$0,029 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,002^*$	$0,032 \pm 0,002^{\#}$	
Pulmão (g)	$2,36 \pm 0,24$	$2,20 \pm 0,17$	$2,37 \pm 0,25$	$2,14 \pm 0,06$	
Pulmão/PCF (g/g)	$4,47 \pm 0,44$	$4,56 \pm 0,24$	$5,43 \pm 0,60$	$4,59 \pm 0,11$	

Valores apresentados como média ± EPM. n = número de animais C = controle; L = administração de dose baixa de L-NAME; Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio; ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio VE = ventrículo esquerdo; VD = ventrículo direito; AT = átrio; PCF = peso corporal final. p < 0,05. \* Ex vs. C; \* ExL vs. Ex; & ExL vs. L. ANOVA duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Tukey.

Os resultados mostram diferenças significativas no tecido hepático do grupo Ex quando comparado ao C (Ex:  $69.7 \pm 0.8\%$  vs. C:  $67.5 \pm 0.6\%$ ; p=0,014), sendo encontrado maior percentual de umidade no Ex (Tabela 3). Não houve diferença significativa para as demais variáveis entre os grupos experimentais.

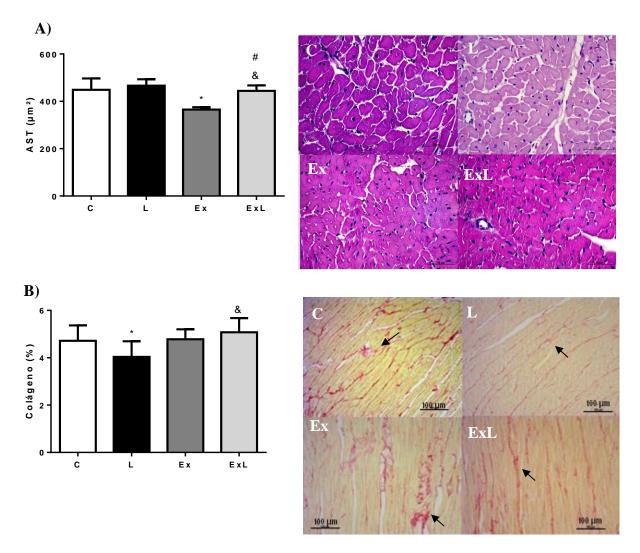
<b>Tabela 3.</b> Conteúdo de água r	os tecidos cardíaco,	, hepático e pulmonar
-------------------------------------	----------------------	-----------------------

	Grupos Experimentais			
Variáveis (%)	C (n = 6)	L(n=7)	$\mathbf{E}\mathbf{x}\;(\mathbf{n}=5)$	ExL (n=10)
VE	$75,3 \pm 0,4$	$69,7 \pm 4,8$	$76,0 \pm 0,1$	$76,7 \pm 0,2$
Fígado	$67,5 \pm 0,6$	$68,0 \pm 0,5$	$69.7 \pm 0.8^*$	$68,3 \pm 0,3$
Pulmão	$77,6 \pm 0,9$	$78,1 \pm 0,4$	$79,4 \pm 0,6$	$78,4 \pm 0,5$

Valores apresentados como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. C = controle; L = administração de dose baixa de L-NAME; Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio; ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio. VE = ventrículo esquerdo. p<0,05 \* vs. C; ANOVA duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Tukey.

Os resultados apontam menor AST no grupo Ex quando comparado ao C (Ex:  $365 \pm 10 \, \mu m^2 \, vs. \, 448 \pm 48 \, \mu m^2$ , p=0,001) (Figura 7A). Além disso, a AST do grupo ExL ( $444 \pm 23 \, \mu m^2$ ) apresentou diferença estatística em relação aos grupos Ex e L, sendo maior que o grupo Ex ( $365 \pm 10 \, \mu m^2$ ) e menor que o L ( $466 \pm 27 \, \mu m^2$ ), respectivamente (Figura 17A).

A fração de colágeno miocárdico foi significativamente menor no L em relação ao grupo C (L:  $4,04 \pm 0,66\%$  vs.  $4,72 \pm 0,65\%$ , p=0,005). Ademais, o grupo ExL apresentou elevação da fração de colágeno miocárdico quando comparado com o grupo L (ExL:  $5,1 \pm 0,6\%$  vs.  $4,04 \pm 0,7\%$ , p=0,001) demonstrando a influência do exercício físico. Não houve diferença estatística entre os grupos Ex e L para esse parâmetro (Figura 17B).

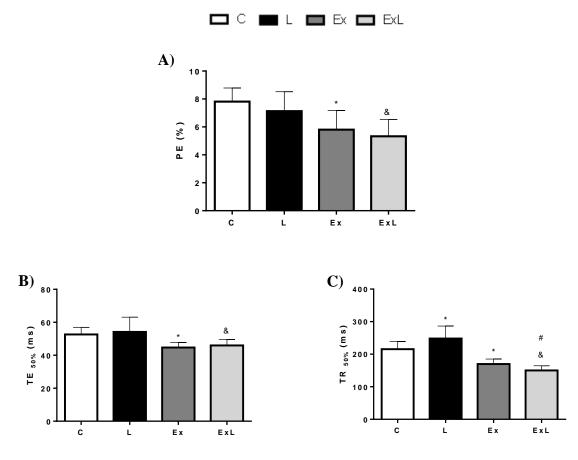


**Figura 17.** Valores apresentados como média ± EPM. n = número de animais C = controle (n=6); L = administração de dose baixa de L-NAME (n=7); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio; (n=5); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=10). **A)** Perfil histológico de fragmentos do VE. **B)** Fração de colágeno miocárdico. ANOVA duas vias complementada com o teste *post-hoc* de Tukey. p<0,05 \* Ex vs. C; # ExL vs. Ex; & ExL vs. L.

O grupo Ex apresenta diferença estatística com menor percentual de encurtamento em relação ao C (Ex:  $5.80 \pm 1.37\%$  vs. C:  $7.81 \pm 0.98\%$ ; p=0,001), com redução de 25,7%. O PE também foi 25,2% menor no grupo ExL quando comparado ao L (ExL:  $5.33 \pm 1.19\%$  vs. L:  $7.13 \pm 1.39\%$ ; p=0,001). Não houve diferença estatística para o PE entre os grupos Ex e L, bem como para os grupos L e C (Figura 18A).

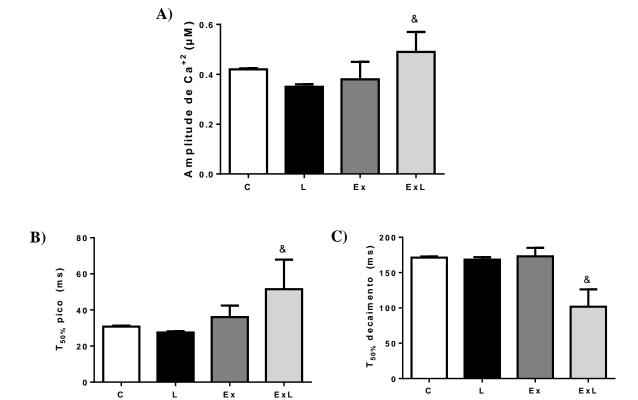
Em relação ao tempo de encurtamento até 50%, os resultados mostram que o grupo Ex apresenta menor  $TE_{50\%}$  quando comparado ao C (Ex:  $45 \pm 3$  ms vs. C:  $53 \pm 4$  ms; p=0,001). Além disso, o tempo de encurtamento até 50% foi menor no ExL em relação ao L (ExL:  $46 \pm 4$  ms vs. L:  $54 \pm 9$  ms; p=0,001). Não houve diferença estatística para o  $TE_{50\%}$  entre os grupos Ex e L, bem como para os grupos L e C (Figura 18B).

A análise do tempo de relaxamento a 50% aponta diferenças estatísticas do grupo Ex com menor TR<sub>50%</sub> quando comparado ao C (Ex:  $170 \pm 15$  ms vs. C:  $216 \pm 24$  ms; p=0,001). Além disso, o grupo L demonstrou maior TR<sub>50%</sub> em relação ao C (L:  $248 \pm 38$  ms vs. C:  $216 \pm 24$  ms; p=0,001). O ExL mostrou valores menores de TR<sub>50%</sub> quando comparado aos grupos L e Ex, respectivamente (ExL: $150 \pm 14$  ms vs. Ex:  $170 \pm 15$  ms. e L:  $248 \pm 38$  ms; p=0,05) (Figura 18C).



**Figura 18.** Valores apresentados como média  $\pm$  EPM. n = número de animais C = controle (n=5; 42 células); L = administração de dose baixa de L-NAME (n=4; 51 células); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n=6; 111 células); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=5; 94 células). PE (%): percentual de encurtamento;  $TE_{50\%}$ : tempo até 50% do pico de encurtamento;  $TR_{50\%}$ : tempo até 50% do relaxamento. Os registros foram obtidos a partir de estimulação elétrica com 1Hz. ANOVA duas vias complementada com teste *post hoc* de Tukey\* p< 0,05; \* vs C; \* ExL vs. Ex; & ExL vs. L.

A amplitude do transiente de  $Ca^{+2}$  foi maior no ExL quando comparado ao grupo L  $(0.45 \pm 0.09 \ vs.\ 0.34 \pm 0.01 \ \mu\text{M};\ p=0.045)$  (Figura 19A). Além disso, o grupo ExL apresenta maior  $T_{50\%}$  do pico  $(51.5 \pm 18.9 \ vs.\ 27.5 \pm 0.4 \ ms;\ p=0.009)$  e redução no  $T_{50\%}$  do decaimento de  $Ca^{+2}$  (102  $\pm$  29  $vs.\ 168 <math>\pm$  2  $ms;\ p=0.022$ ) em relação ao grupo L (Figura 19B-C). Não foram encontradas diferenças entre os demais grupos para o  $T_{50\%}$  do pico e  $T_{50\%}$  do decaimento de  $Ca^{+2}$ .



**Figura 19.** Valores apresentados como média ± EPM. C = controle (n=4; células = 25); L = administração de dose baixa de L-NAME (n=4; células = 17); Ex = grupo submetido ao exercício aeróbio (n=4; células = 14); ExL = grupo tratado com L-NAME e submetido ao exercício aeróbio (n=6; células = 8). ANOVA duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Tukey. Os registros foram obtidos a partir de estimulação elétrica com 1Hz. ANOVA duas vias complementada com teste *post hoc* de Tukey. p < 0,05; & ExL vs. L.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do treinamento físico, isoladamente e/ou associado com baixa dose de L-NAME sobre parâmetros contráteis e o transiente de Ca<sup>+2</sup> em cardiomiócitos isolados. Os principais achados demonstram que a associação do L-NAME em baixa dose com o exercício físico acarreta diminuição do percentual de encurtamento de cardiomiócitos isolados em relação ao L-NAME, no entanto, melhora nos tempos de encurtamento e relaxamento a 50%. Os resultados também apontam que essa associação acarretou elevação da amplitude e tempo para 50% do pico de encurtamento de Ca+2, sugerindo aumento da sensibilidade ao Ca+2, no entanto, houve redução no tempo para 50% do decaimento de Ca<sup>+2</sup>, indicando possível melhora no relaxamento. Além disso, o exercício físico associado à administração crônica do L-NAME promoveu remodelação cardíaca com hipertrofia de átrio, das relações AT/tíbia e coração/tíbia, bem como aumento de AST e fração de colágeno, elevação da PDfVE e PAS e PAM, sendo os dois últimos parâmetros normalizados após a oitava semana de tratamento. Para o conhecimento, esse foi o primeiro trabalho que avaliou os efeitos do exercício físico combinado com a administração de baixa dose de L-NAME com a finalidade de avaliar parâmetros contráteis e o transiente de Ca<sup>+2</sup> intracelular em cardiomiócitos isolados.

#### 6.1 Composição corporal

A prática de exercício físico promove diversos benefícios, sendo estes bem estabelecidos na literatura (GUTWENGER et al, 2015; POSA et al, 2015; COLOMBO et al, 2013, BRUM et al, 2004; SERRANO-FERRER et al, 2015). Dentre esses benefícios está a promoção da saúde no qual o exercício físico aeróbio é capaz de influenciar o metabolismo, gasto calórico e modificar a composição corporal (TROMBETTA, 2003). Os resultados do presente estudo demonstram que o treinamento físico aeróbio após 12 semanas acarretou redução na adiposidade corporal, evidenciada por menor ganho de peso corporal e menores níveis de gordura visceral, retroperitoneal e epididimal, gordura corporal total e índice de adiposidade. Os achados mostram que o treinamento físico aeróbio foi eficiente na melhora da composição corporal, uma vez que proporcionou redução de 30% e 51% no ganho de peso e gordura corporal, respectivamente. Achados semelhantes foram encontrados por Machado et al. (2017), onde 12 semanas de exercício aeróbio com intensidades entre 60 e 80% da velocidade máxima, foram suficientes para reduzir significativamente o peso corporal e depósitos de gordura corporal. Levin et al. (2004), utilizando ratos *Sprague-Dawley*,

mostraram que o grupo exercitado apresentou redução de 24% no ganho de peso corporal após 6 semanas de exercício físico aeróbio voluntário quando comparado ao grupo sedentário. Vargas-Ortiz (2017) também encontrou diminuição 5% no percentual de gordura de humanos com 4 semanas de exercício aeróbio.

Esses achados sugerem que as mudanças observadas na composição corporal decorrentes do exercício físico podem estar associadas à maior atividade do sistema nervoso simpático, e assim, liberação de catecolaminas pelas glândulas adrenais. Grande parte do controle da disponibilidade de substratos energéticos é mediado por ajustes hormonais, principalmente com diminuição da insulina, aumento do glucagon e catecolaminas (AFONSO et al, 2003). Os níveis de catecolaminas sobem durante o exercício (CANALI e KRUEL, 2001), e a elevação de catecolaminas circulantes promove aumento da atividade lipolítica com consequente mobilização de gordura para ser metabolizada como substrato energético durante o exercício físico (GOMES et al, 2012). Contudo, cabe ressaltar que nesse estudo não foram avaliadas as catecolaminas.

A administração de baixa dose de L-NAME também parece exercer influência sobre a composição corporal, uma vez que foi capaz de diminuir em 25%, 26%, 33% e 25% o ganho de peso corporal, os depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal, e a gordura total, respectivamente. Além disso, embora o peso corporal final desse grupo não tenha apresentado diferença estatística, a administração crônica de L-NAME acarretou redução de 7% no PCF em relação ao C. A ausência de mudanças no PCF no presente estudo está em divergência dos achados de Oliveira et al. (2000), Moreno (1996), Takemoto (1997), Arnal (1993) e Hamilton et al. (2016), onde foram encontrados menores valores de peso corporal final nos grupos tratados com L-NAME quando comparados ao grupo controle. Dessa foram, a literatura demonstra que a redução do peso corporal é dependente da dose e do tempo de administração de L-NAME (OLIVEIRA et al, 2000; HU et al, 2005). Hu et al. (2005) em seu estudo, administrou três protocolos com diferentes dosagens de L-NAME (10, 20 e 40mg/kg dia) durante oito semanas. Os resultados apontam que quanto maior a dose, menor foi o peso corporal dos animais. Cabe ressaltar que a ausência de diferença no peso corporal entre os grupos L e C pode ser atribuída, possivelmente, à baixa dose de L-NAME (1,5 mg/kg/dia), sugerindo que a dose utilizada foi ineficiente para promover redução do PCF como observado em outros estudos (BERNÁTOVÁ et al, 2007).

O NO está relacionado com os mecanismos de termorregulação, tais como: antipirese (GOURINE, 1995) e hipotermia (BENAMAR, 2003). Dentro desse contexto, NO atuaria como neuromodulador, afetando as aferências vagais e ativando mecanismos responsáveis

pela perda de calor como vasodilatação e sudorese, além de participar da termogênese e exercer papel importante no controle metabólico durante o exercício (LACERDA *et al*, 2006; PAULA, STEINER e BRANCO, 2000). A literatura tem mostrado que o NO exerce influência sobre a termorregulação, de modo que a inibição de sua síntese com L-NAME promove elevação da temperatura corporal principalmente durante o exercício físico (LACERDA *et al*, 2006; PAULA, STEINER e BRANCO, 2000), bem como o aumento do consumo de oxigênio (LACERDA; MARUBAYASHI; COIMBRA, 2005). Tal elevação aumenta a mobilização e utilização de lipídeos como principal substrato energético durante o exercício físico, e consequentemente, resulta na diminuição do percentual de gordura dos animais.

Salienta-se também que a associação de L-NAME e exercício físico aeróbio não foi capaz de promover alterações significativas nos depósitos de gordura avaliados quando comparado ao grupo que utilizou L-NAME de forma isolada. Esse achado pode estar associado ao aumento da temperatura corporal, a qual se eleva em decorrência da dificuldade corporal de eliminar calor por meio do bloqueio da síntese de NO, promovendo fadiga. Esses achados divergem dos resultados observados no grupo Ex, o qual apresentou menores valores de gordura corporal (LACERDA; MARUBAYASHI; COIMBRA, 2005).

Contudo, o grupo ExL apresentou maior PCF e ganho de peso corporal quando comparado ao grupo Ex, evidenciando o efeito da administração de L-NAME sobre esses parâmetros. Torna-se necessário destacar o menor desempenho encontrado nos testes de velocidade máxima do grupo ExL em relação ao grupo Ex (Figura 12). Esse resultado corrobora Lima et al, (2014) que encontrou menor desempenho no grupo tratado de forma aguda com 1,43 µL de L-NAME, onde este apresenta tempo 50% menor até a fadiga e carga de trabalho quando comparado a animais tratados com solução salina. A literatura relata que a via do NO no cérebro melhora os mecanismos de perda de calor e pode atuar protegendo o cérebro de hipertermia excessiva (LACERDA; MARUBAYASHI; COIMBRA, 2005). Dessa forma, é possível especular que a provável diminuição de NO no grupo ExL, pode acarretar hipertermia em decorrência da menor capacidade de dissipar calor e precipitar a ocorrência de fadiga com consequente dano térmico ao cérebro. Lacerda, Marubayashi e Coimbra (2005) verificaram em ratos Wistar que quanto mais elevada a dose de L-NAME, maior será a redução na carga de trabalho durante o exercício. Além disso, foi verificada menor eficiência mecânica (18%) e tempo de corrida até a fadiga (53%) nos ratos que receberam L-NAME e praticaram o exercício aeróbio, justificando o menor desempenho dos animais, e possivelmente, a mudança na composição corporal comparado ao grupo Ex.

#### 6.2 Parâmetros Hemodinâmicos

O exercício físico é capaz de modificar positivamente a frequência cardíaca, além de diminuir os níveis de pressão arterial através da estimulação do sistema nervoso parassimpático (SANTOS, 2015; AGARWAL, 2011). Além disso, a vasodilatação derivada da atividade física está relacionada à liberação de NO. O treinamento aeróbio aumenta a expressão e ativação de eNOS, que, por conseguinte, acarreta elevação na biodisponibilidade de NO (HIRAI *et al*, 2012). Esse mecanismo é capaz de modular o sistema renina-angiotensina, promovendo benefícios ao sistema cardiovascular, principalmente a redução da PA (SANTOS, 2015).

Além disso, a administração de L-NAME é amplamente utilizada como modelo para hipertensão arterial, considerando sua participação no bloqueio da síntese de NO (BAYLIS, 1992) e, consequentemente, promovendo aumento na PA. É interessante ressaltar que a magnitude do aumento da PA e dos efeitos deletérios gerados pelo bloqueio da síntese de NO é dependente da dose e do tempo de administração da droga, sendo esses mais expressivos quando administrados em altas doses e por tempos prolongados (HU *et al*, 2005; Oliveira 2000).

Um aspecto importante visualizado nesse estudo foi que de forma isolada, o exercício físico aeróbio e a administração de baixa dose de L-NAME não foram capazes de promover mudanças significativas nas medidas indireta e direta na PAS, PAD, PAM e FC ao final do experimento. Dentro desse contexto, a associação entre a administração de baixa dose de LNAME e o exercício físico poderia acarretar benefícios ao sistema cardiovascular. Os principais achados desse trabalho mostram que a associação de baixa dose de LNAME e o exercício físico promove elevação significativa da PAS e PAM na oitava semana de treinamento (ExL vs. L), bem como maior PDfVE quando comparado aos tratamentos com L-NAME e exercício físico de forma isolada.

O aumento na PAM corrobora Souza (2007) que, utilizando ratos *Wistar*, observou que a associação do treinamento físico aeróbio e elevadas doses de L-NAME (70 mg/kg) promove aumento desse parâmetro quando comparado aos grupos que apenas praticaram atividade física ou utilizaram a droga de forma isolada. Esse aumento está associado às altas doses de L-NAME, uma vez que, essa elevação promove aumento na frequência cardíaca e diminuição na estimulação barorreflexa simpática, mostrando de forma indireta que a estimulação simpática influencia a hipertensão associada ao bloqueio de ON (SCROGIN *et al*, 1998).

A literatura também destaca que o exercício físico não é capaz de reverter ou atenuar a

hipertensão causada por altas doses de L-NAME (70 mg/kg) (ROSSI et al, 2009). Quando administradas em doses menores (20 mg/kg) por quatro semanas, o exercício aeróbio sem carga (natação) acarreta diminuição na PAS, PAD e PAM, mas os animais permanecem hipertensos em relação a seu respectivo controle (GOESSLER, 2015). É necessário ressaltar que o protocolo utilizado em nosso estudo foi de carga progressiva, de 50 a 80% da VMM, justificando o retorno da PAS e PAM aos valores normais, sugerindo que a intensidade do exercício físico aeróbio é capaz de influenciar os valores de PA. Cabe destacar que os valores da PAS e PAM foram normalizados na décima segunda semana de protocolo experimental. Bernátová et al. (2007) mostraram resultados semelhantes com a administração isolada de baixas doses de L-NAME em ratos Wistar, sendo encontrado redução da PA no grupo L-NAME (1,5 mg/kg) em relação ao grupo controle. Os autores sugerem que a administração de baixas doses de L-NAME seria capaz de ativar o mecanismo de feedback negativo, acarretando novamente a produção de NO. Não foram encontrados estudos que investigaram o mecanismo de *feedback* negativo com a associação entre baixas doses de L-NAME e exercício físico aeróbio, no entanto, a administração de L-NAME de forma isolada é capaz de reduzir a biodisponibilidade de NO, e dependendo da dose administrada, o exercício físico não é capaz de reverter a hipertensão gerada (ROSSI et al, 2009; GOESSLER, 2015). Em nosso estudo foi administrada baixa dose de L-NAME durante 12 semanas, sugerindo que o exercício físico aeróbio contribuiu efetivamente para a regressão da hipertensão da oitava para a décima segunda semana do protocolo experimental.

Além disso, os achados mostram que a associação entre L-NAME e exercício físico acarreta aumento de 38% e 52% na PDfVE em relação aos tratamentos de forma isolada. Durante o remodelamento cardíaco mal adaptado, tem sido observado aumento da PDfVE, sendo este considerado um parâmetro de insuficiência ventricular (SCHENKEL et al, 2010; MASCHERBAUER, 2017). Esses resultados sugerem o desenvolvimento de insuficiência cardíaca diastólica induzida pela associação de L-NAME e exercício físico, no qual o VE está preservado, mas a função diastólica está comprometida (SOUSA, 2006). No entanto, ao avaliar tais efeitos com a administração de baixa dose, não foram encontrados tais resultados (BERNÁTOVÁ et al, 2007). O aumento da PDfVE, marcador de disfunção ventricular, está relacionado com a dilatação e elevação da pós-carga, ou seja, promovendo elevação da vasoconstrição periférica consequente da inibição/ou estimulação de NO pela intervenção do L-NAME. Não foram encontrados estudos que avaliaram a PDfVE com a associação de L-NAME em baixas doses e exercício físico aeróbio. Outro achado encontrado na literatura relacionado ao aumento da PDfVE é a hipertrofia atrial corrigida pela tíbia, uma vez que com

a PDfVE maior, o átrio necessita exercer maior força para desempenhar sua função de transportar o sangue para as câmaras ventriculares (SCHENKEL *et al*, 2010).

### **6.3** Morfologia e AST

A associação do exercício físico aeróbio e administração de L-NAME promove aumento no peso do AT e na relação AT/tíbia quando comparado ao exercício físico de forma isolada, sugerindo remodelação atrial. A relação coração/tíbia também foi elevada em relação ao tratamento com L-NAME (ExL vs. L), contudo, sem mudanças nas câmaras cardíacas. Os resultados também apontam aumento na AST do VE nesse grupo quando comparado ao grupo Ex.

Goessler et al. (2015) encontraram maior peso absoluto e relativo nos corações de ratos Wistar tratados com 20 mg/kg de L-NAME associado ao exercício físico aeróbio após 4 semanas, demonstrando o desenvolvimento do remodelamento cardíaco. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística no peso do coração nesse estudo entre os tratamentos propostos, a administração de baixas doses de L-NAME associada ao exercício físico acarretou maiores valores desse parâmetro quando comparado aos demais grupos, bem como elevação na relação coração/tíbia, indicando possível remodelamento cardíaco em desenvolvimento, a qual seria decorrente de sobrecarga pressórica e aumento da PDfVE. Para identificação da hipertrofia cardíaca, o diâmetro dos cardiomiócitos também foi avaliado nesse estudo (dados não mostrados), onde foi constatado aumento significativo no grupo ExL em relação ao grupo L (p=0,001) e Ex (p=0,013). Souza et al. (2007) encontrou aumento da área macroscópica cardíaca após sete dias de administração de altas doses de L-NAME (70 mg/kg) e oito semanas de treinamento físico aeróbio, no entanto, os autores classificam essa hipertrofia como fisiológica devido ao curto período de administração de L-NAME e longo período de atividade física aeróbia. Hu et al. (2005) identificaram aumento na relação do peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, densidade numérica e tamanho dos cardiomiócitos após doses crescentes de L-NAME. Tais achados sugerem que a diminuição de nitrito e nitrato (metabólitos do NO) e GMPc exercem influência no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

A administração de baixas (7,5 mg/kg/dia) e altas doses de L-NAME (25 mg/kg/dia) por 10 a 24 semanas, associadas ou não ao exercício físico aeróbio, são capazes de promover hipertrofia cardíaca (OLIVEIRA *et al*, 2000; KURU *et al*, 2002), sugerindo o fator mais provável: *a deficiência sistêmica de NO*, que leva a diminuição no suprimento de sangue ao

músculo cardíaco, promovendo isquemia, e em seguida, aumentando os fatores de fibrose e necrose (OLIVEIRA *et al.* 2000; MORENO-JR *et al.* 1996).

A remodelação cardíaca observada no grupo ExL em relação ao Ex sugere que a associação entre o exercício físico aeróbio e a administração de baixa dose de L-NAME pode promover remodelação cardíaca patológica devido ao bloqueio total ou parcial do NO. É necessário considerar o papel do NO em impedir ou atenuar a hipertrofia cardíaca, proliferação de fibroblastos e apoptose de cardiomiócitos (SOUZA et al, 2007). Duas substâncias endógenas envolvidas no papel anti-hipertrófico do coração são o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o NO. O ANP exerce função anti-hipertensiva, anti-hipervolêmica e anti-hipertrófica através da ativação da guanilato-ciclase com posterior aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e o NO apresenta papel fundamental na inibição da cascata de sinalização que induz hipertrofia cardíaca patológica, uma vez que é capaz de aumentar a sinalização da guanilato-ciclase solúvel. A guanilato-ciclase solúvel atua como aceptor de NO e converte catalíticamente a guanosina trifosfato em GMPc. A GMPc atua no processo hipertrófico do coração, inibindo a via enzima proteína quinase-G (PKG) e a rede de sinalização das diferentes vias pró-hipertróficas que envolvem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). A via NO/GMPc/PKG desenvolve papel importante na regulação negativa sobre a hipertrofia cardíaca induzida por angiotensina II, endotelina 1, insulina e fatores de crescimento, inibindo a sinalização da MAPK, diminuindo a transcrição de genes associados à hipertrofia (GARCIA & INCERPI, 2008; CHENG, 2005). Outro aspecto importante destacado pela literatura é que camundongos que hiperexpressam eNOS apresentaram atenuação da hipertrofia cardíaca induzida por infusão cônica de isoprenalina, sugerindo que o NO endógeno atuaria com fator anti-hipertrófico (GARCIA & INCERPI, 2008; OZAKI et al, 2002). Além disso, houve hipotensão sistêmica nesses animais, o que não altera os valores de pressão arterial e não promove danos aos vasos como se é visto com o uso dos inibidores das NOS. Outro fator no qual o a eNOS se relaciona à hipertrofia cardíaca é sua influência no número de β-adrenorreceptores ou a função de seus sinais nos cardiomiócitos, no entanto, esse mecanismo ainda não está elucidado (GARCIA & INCERPI, 2008; OZAKI et al, 2002).

#### 6.3.1 Colágeno Miocárdico

A fração de colágeno miocárdico apresentou-se aumentada na associação do exercício físico aeróbio e baixa dose de L-NAME em relação ao grupo L, sugerindo remodelamento

patológico. Ao que parece, o protocolo de exercício aeróbio de intensidade moderada, utilizado em nosso estudo, promove a sobrecarga cardíaca, evidenciada por meio da elevação da PDfVE. Assim, influência o processo de remodelamento cardíaco, contudo, a medida que o exercício se prolonga, os efeitos são evidenciados pelo aumento da síntese de colágeno miocárdico. É necessário considerar que nesse tipo de remodelação é visto o aumento na quantidade de fibras colágenas, as quais são capazes de influenciar o processo de relaxamento cardíaco por meio do aumento da rigidez ou redução da complacência ventricular com consequente disfunção diastólica (JANICKI, 1992; CARVALHO; SOUZA; FIGUEIRA, 1998; GOESSLER *et al.*, 2015).

Quando administradas doses elevadas de L-NAME (30 a 100 mg/kg) são vistos aumentos significativos na fração de colágeno miocárdico (XAVIER-VIDAL, 2005;; SADEK et al, 2015; GOESSLER et al, 2015; SONODA et al, 2017), enquanto que com baixas doses não são visualizadas mudanças significativas na fração de colágeno miocárdico (BERNÁTOVÁ et al, 2007). Os autores demonstraram que a baixa dose administrada durante 8 semanas não foi suficiente para provocar aumento na síntese de colágeno miocárdico.

A literatura sugere que a síntese de NO diminuída promove a ativação de sistemas neuro-hormonais e fatores promotores de crescimento que poderia influenciar na fibrose miocárdica (HLAVAČKOVÁ, VRANKOVÁ, JANEGA *et al*, 2011). O estímulo mecânico é capaz de induzir a liberação local de fatores autócrinos e parácrinos pelas células miocárdicas, como endotelina 1 (ET1), fatores de crescimento e citocinas, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1). Esses fatores podem se ligar aos receptores específicos de membranas e ativar cascatas intracelulares acopladas a calcineurina, fosfoquinase-C e a MAPK e iniciar a cascata de eventos responsáveis pelo crescimento hipertrófico cardíaco, dentre esses, tem-se a participação das catecolaminas e do sistema nervoso simpático, da angiotensina II, insulina, estresse oxidativo e hipercolesterolemia (GARCIA, INCERPI, 2008). Cabe ressaltar que nesse estudo não foram investigados os fatores que desencadeiam a fibrose cardíaca.

A administração de baixas doses de L-NAME promoveu diminuição na fração de colágeno miocárdico em relação ao grupo C. Em outro estudo que utilizou baixa dose de L-NAME (1,5mg/kg/dia), no entanto, de forma isolada durante oito semanas, a fração de colágeno miocárdico não foi alterada (BERNÁTOVÁ et al, 2007). É possível especular que a administração de baixa dose de L-NAME não é capaz de bloquear totalmente a síntese de NO e, dessa forma, não comprometer a biodisponibilidade de NO.

### 6.4 Função Miocárdica

Os principais achados visualizados nesse estudo mostram que o treinamento físico aeróbio diminuiu o percentual de encurtamento de cardiomiócitos isolados com melhora dos tempos de encurtamento e relaxamento a 50%. Foi visualizado também que a administração de baixa dose de L-NAME promoveu aumento do tempo de relaxamento a 50%. A associação do treinamento físico aeróbio com baixa dose de L-NAME promoveu diminuição no percentual de encurtamento e diminuição nos tempos de encurtamento e relaxamento até 50% em relação ao grupo L. Ademais, essa associação também acarretou menor tempo de relaxamento até 50% em relação ao grupo Ex.

O treinamento físico está associado às modificações bioquímicas, elétricas, morfológicas e mecânicas do coração. Além disso, o exercício físico é capaz de promover aumento na atividade simpática através das catecolaminas e na carga hemodinâmica, além de liberação de hormônios e fatores de crescimento, os quais ativam vias de sinalização que promovem hipertrofia cardíaca com melhora funcional (BERNARDO & MCMULLEN, 2016). Outro aspecto benéfico do exercício físico regular é a melhora da função contrátil, uma vez que acarreta aumento da força de contração e das taxas de encurtamento e relaxamento de cardiomiócitos, bem como aumento na produção de força do miocárdio (NATALI, 2004).

Contudo, os resultados do presente estudo mostram que o exercício físico aeróbio promoveu disfunção miocárdica leve com diminuição no percentual de encurtamento de cardiomiócitos isolados, no entanto, melhora nos tempos de encurtamento e relaxamento a 50%, sem mudanças nas velocidades máximas de encurtamento e relaxamento. Esses achados divergem de estudos presentes na literatura, considerando que o exercício físico promove melhora na função cardíaca com elevação do percentual de encurtamento, velocidade máxima de contração e relaxamento tanto em animais normotensos (LUNZ et al, 2011; CARNEIRO-JÚNIOR et al, 2013) quanto hipertensos (CARNEIRO-JÚNIOR et al, 2013).

Uma provável justificativa para os resultados encontrados no presente estudo está relacionada às adaptações fisiológicas ocasionadas pelo modelo de treinamento físico adotado, a se destacar, a intensidade e duração do protocolo; no presente estudo foi utilizado protocolo de treinamento aeróbio progressivo até atingir a intensidade de 80%. Treinamentos com intensidades moderadas a altas promovem aumento da demanda energética e consumo de oxigênio nos músculos ativos (GLENNEY *et al.* 2017), os quais enviam sinais nervosos e metabólicos ao sistema nervoso central (SNC), gerando elevação da atividade simpática com consequente aumento da frequência de estímulos ao coração (órgão altamente inervado e com

grande número de receptores β-adrenérgicos). Essa situação proporciona mais bombeamento de sangue por parte do miocárdio e execução de maior carga de trabalho. Quanto maior a intensidade do exercício físico, maior é a frequência cardíaca e o débito cardíaco (POWERS, HOWLEY, 2009). Tal resposta, em intensidades elevadas, acarreta diminuição do tempo de realização de cada ciclo cardíaco.

Nesse sentido, a melhora nas velocidades de encurtamento e relaxamento miocárdico, observados pelas análises de TE<sub>50%</sub> e TR<sub>50%</sub>, parece compensar a menor fração de encurtamento encontrada nesse grupo, sugerindo uma possível resposta adaptativa funcional ao treinamento aeróbio de moderada a alta intensidade. A literatura destaca que o exercício físico aeróbio reduz os tempos de contração (HØYDAL *et al*, 2016) e relaxamento (KEMI *et al*, 2007; HØYDAL *et al*, 2016). Tal melhora está associada ao aumento da atividade das proteínas responsáveis pela liberação de Ca<sup>+2</sup> no citosol (canal L, RyR), recaptura para retículo sarcoplasmático (SERCA2a, PLB) e retirada para o meio extracelular (NCX e bomba de cálcio do sarcolema) (DIIFEE & NAGLE, 2003; KEMI *et al*, 2007; SUGIZAKI *et al*, 2011). O Ca<sup>+2</sup> funciona como um segundo mensageiro que regula diferentes processos nos miócitos cardíacos, contribuindo principalmente para a atividade elétrica e contrátil e no mecanismo de contração-excitação (BERS; GUO, 2005). Contudo, no presente estudo o treinamento aeróbio isoladamente não foi capaz de promover alterações significativas no transiente de Ca<sup>+2</sup>.

Esses achados são divergentes dos encontrados na literatura, visto que os benefícios do treinamento aeróbio sobre a cinética de Ca<sup>+2</sup> tem sido amplamente investigado tanto em condições fisiológicas (SUGIZAKI *et al*, 2011) quanto patológicas. O treinamento físico aeróbio promove melhora nas proteínas relacionadas a cinética de Ca<sup>+2</sup> miocárdica como aumento da SERCA2a, rianodina e Canal L. Assim, o exercício físico é responsável por aumentar o transiente e sensibilidade ao Ca<sup>+2</sup>, além de acarretar maior recaptura de Ca<sup>+2</sup> pela SERCA2a e maior quantidade de PLB fosforilada (CARNEIRO-JUNIOR *et al*, 2013; WISLOFF *et al*, 2002; KEMI *et al*, 2008).

Carneiro-Junior *et al.* (2013) encontrou aumento de 14% na concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup> em animais normotensos e 23% em animais hipertensos após a realização de exercício aeróbio de baixa intensidade (50-60% da velocidade máxima média) durante oito semanas. Os autores sugerem que essa resposta está relacionada ao aumento da expressão de SERCA2a e PLB fosforilada, as quais seriam capazes de promover aumento na recaptura de cálcio e melhora do relaxamento. Cabe ressaltar que em nosso estudo, a intensidade variou progressivamente entre 50 e 80% da velocidade máxima média, sugerindo que a intensidade

do exercício físico exerceu influência sob o transiente de Ca<sup>+2</sup>, uma vez que não foram encontradas alterações na cinética. Chicco *et al.* (2008) não encontraram mudanças significativas nas proteínas relacionadas à cinética de Ca<sup>+2</sup> de ratos com insuficiência cardíaca após 24 meses de treinamento aeróbio de baixa intensidade. Nesse caso, o exercício foi capaz de retardar o aparecimento da insuficiência cardíaca e melhorar a sobrevida das ratas.

Por sua vez, a administração crônica de baixa dose de L-NAME, em nosso estudo, promoveu aumento no tempo de relaxamento a 50%, no entanto, sem alterações no percentual de encurtamento quando comparado ao grupo C. Esses achados demonstram que houve prejuízo no relaxamento miocárdico, no entanto, sem alterações no transiente de cálcio. A literatura aponta que a administração dos inibidores das NOS está associada à diminuição do débito cardíaco e hipertrofia cardíaca, além de aumento das áreas de fibrose e necrose e alterações na contratilidade miocárdica, bem como no remodelamento de miócitos (MORENO-JR, METZE, DE NUCCI, 1994; FERREIRA-MELO et al, 2011). Moreno-Jr, Metze e De Nucci (1994) encontraram diminuição na pressão diastólica do ventrículo esquerdo em animais tratados com aproximadamente 75 µmol/rato/dia (equivalente a dose moderada) de L-NAME diluídos na água durante 8 semanas. Os autores sugerem que tal resultado está associado às alterações geradas pelo bloqueio da síntese de NO, que consequentemente diminui a biodisponibilidade de NO e, assim, promove isquemia miocárdica com aumento de fibrose e necrose. Esses fatores poderiam justificar o déficit funcional, considerando a diminuição do suprimento de O<sub>2</sub> para o tecido miocárdico. Contudo, o grupo L apresentou menores níveis de colágeno miocárdico; esse achado sugere que outros fatores devem estar envolvidos no prejuízo funcional visualizado nesse grupo.

O tratamento com alta dose de L-NAME (0,7 g/l) por curto prazo (7 dias) foi capaz de aumentar o percentual de encurtamento e as velocidades de contração e relaxamento de cardiomiócitos isolados (LUNZ et al, 2011). No entanto, nos achados de Ozturk et al. (2016), no qual foram administradas 40 mg/kg de L-NAME durante seis semanas, foi observado aumento nos tempos de relaxamento a 50, 75 e 90%. Além disso, Ren (2007) mostra que ratos espontaneamente hipertensos apresentam menor VMR e maior tempo de relaxamento a 90% quando comparado à animais normotensos. O aumento no tempo de relaxamento encontrado nesse grupo poderia estar associado a menor taxa de remoção e/ou extrusão de Ca<sup>+2</sup>, no entanto, não houve prejuízo do transiente de cálcio após administração de baixa dose de L-NAME. Com a administração de altas doses de L-NAME durante 7 dias, tem sido verificado aumento na amplitude do transiente de Ca<sup>+2</sup> e aumento na expressão dos receptores de RyR e do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>, o que poderia promover um efeito inotrópico positivo (LUNZ et al,

2011). Nesse estudo, não houve prejuízo do transiente de cálcio após administração de baixa dose de L-NAME. A literatura também destaca que o prejuízo no relaxamento miocárdico pode ser decorrente de redução da sensibilidade ao Ca<sup>+2</sup> em decorrência da maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (OZTURK *et al*, 2016; REN, 2007). A produção de EROS prejudica a função contrátil, modificando a atividade de proteínas envolvidas no mecanismo de excitação-contração, bem como possibilita a ativação de fatores de transcrição e vias intracelulares envolvidas na indução de apoptose. Esses eventos estão envolvidos na disfunção do miócito e no desenvolvimento da remodelação miocárdica (REYES *et al*. 2017). Não foram encontrados estudos que investigaram os efeitos crônicos da administração de baixas doses de L-NAME na cinética de Ca<sup>+2</sup> miocárdico.

O principal objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico e da administração de baixa dose de L-NAME em parâmetros contráteis de cardiomiócitos isolados. Os resultados indicam que essa associação promoveu diminuição no percentual de encurtamento de cardiomiócitos isolados, com redução nos tempos de encurtamento e relaxamento a 50% em maior magnitude quando comparado ao grupo L, sugerindo um possível efeito da intensidade do exercício aeróbio, que nesse estudo foi de até 80% da velocidade máxima média. Esse achado indica que o exercício aeróbio em intensidades elevadas para animais hipertensos ou com síntese de NO comprometida pode gerar efeitos negativos sobre a função miocárdica. Cabe salientar que não foram encontrados trabalhos que avaliaram a contratilidade cardíaca com a associação crônica de exercício aeróbico e baixas doses de L-NAME.

Outro aspecto importante é que foram encontrados níveis elevados de pressão diastólica final do grupo ExL, a qual pode promover mudanças no inotropismo cardíaco. Carneiro-Junior *et al.* (2013b) evidenciam alterações no funcionamento cardíaco de animais hipertensos como diminuição na velocidade máxima de encurtamento e relaxamento em comparação a normotensos. No mesmo estudo, os pesquisadores encontraram melhora no percentual de encurtamento, bem como aumento da velocidade máxima de encurtamento e relaxamento em animais hipertensos que realizaram treinamento aeróbio a 50 a 60% da VMM durante 8 semanas comparado à animais hipertensos sedentários. Esse achado evidencia a eficácia do treinamento aeróbio na diminuição da PAS e estimulação simpática dos vasos e do coração, contribuindo para manter os níveis de pressão arterial e batimentos cardíacos adequados.

A associação do exercício físico aeróbio com baixa dose de L-NAME promoveu aumento na amplitude de Ca<sup>+2</sup> e no tempo para 50% do pico, bem como diminuição do tempo

para 50% do decaimento. Carneiro-Junior *et al.* (2013b) encontrou aumento na amplitude de Ca<sup>+2</sup> e diminuição no tempo a 50% do decaimento em ratos SHR que realizaram exercício aeróbio durante 8 semanas. Drummond *et al.* (2016) encontraram resultados similares em relação ao aumento da amplitude de Ca<sup>+2</sup> após a administração aguda de alta dose (100 μmol) de L-NAME em cardiomiócitos de animais de desempenho padrão para o exercício aeróbio. Além disso, Carneiro-Junior *et al.* (2013b) também identificaram diminuição no tempo a 50% no decaimento de Ca<sup>+2</sup>. O aumento na amplitude de Ca<sup>+2</sup> e na diminuição do tempo a 50% do pico podem causar efeito inotrópico positivo, promovendo melhora na contratilidade miocárdica e volume de ejeção. Essa resposta pode estar relacionada à maior pico de Ca<sup>+2</sup> com maior velocidade de abertura dos canais de liberação, bem como maior sensibilidade miofilamentar.

## 7. CONCLUSÃO

A associação do exercício físico aeróbio com baixa dose de L-NAME não promove benefícios ao sistema cardiovascular, uma vez que acarreta remodelamento cardíaco decorrente de aumento da fração de colágeno e elevação da PDfVE, bem como disfunção contrátil evidenciada por redução do percentual de encurtamento. Os achados também indicam que essa associação também promove aumento na sensibilidade ao Ca<sup>+2</sup>. É importante ressaltar que essas análises foram realizadas em animais saudáveis.

## 8. REFERÊNCIAS

Afonso M, Souza CN, Zagatto AM, Luciano E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos Wistar. Motriz. 2003;9(2):87-92.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001;357(3):593-615.

Allen JD, Cobb FR, Kraus WE, Gow AJ. Total nitrogen oxide following exercise testing reflects endothelial function and discriminates health status. Free Radic Biol Med. 2006;41(5):740-7.

Barreto RL, Correia CR, Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. Quím Nova. 2005;28(6):1046-54.

Benamar K, Yondorf MZ, Kon D, Geller EB, Adler MW. Role of the Nitric-Oxide Synthase Isoforms during Morphine-Induced Hyperthermia in Rats. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307(1):219-22.

Bernardo BC, McMullen JR. Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling. Cardiol Clin. 2016;34(4):515-30.

Bernátová, I. Kopincová, J. Púzserová, A. Janega, P. P. Babál, P. Chronic Low-Dose L-NAME Treatment Increases Nitric Oxide Production and Vasorelaxation in Normotensive Rats. Physiol Res. 2007; 56 (Suppl. 2):17-24.

Bers D, Guo T. Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2005;1047(1):86-98.

Blomqvist C, Saltin B. Cardiovascular Adaptations to Physical Training. Ann Rev Physiol. 1983;45(1):169-79.

Brandão A, Pinge M. Alteração do óxido nítrico na função cardiovascular pelo treinamento físico. Semina: Cien Biol Saúde. 2007;28(1):53-68.

Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. Rev Paul Educ Fís. 2004;18:21-31.

Bunbupha S, Prachaney P, Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Welbat JU, Pakdeechote P. Asiatic acid alleviates cardiovascular remodelling in rats with L-NAME-induced hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2015;42(11):1189-97

Canali, ES, Kruel, LFM. Respostas hormonais ao exercício. Rev. Paul. Educ. Fís. 2001;15(2):141-53.

Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF, et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. Biochem J. 1997;324(1):305-10.

Carneiro-Júnior MA, Prímola-Gomes TN, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond F, et al. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. J Appl Physiol. 2013;115(1):107-15.

Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. J Mol Cell Cardiol. 2013;57:119-28b.

Carter JR, Ray CA. Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans. Auton Neurosci. 2015;188:36-43.

Carvalho F° ET, Souza RR, Figueira JL. Insuficiência cardíaca diastólica no idoso. Arq Bras Cardiol. 1998;70(4):291-9.

Cebova M, Klimentova J, Janega P, Pechanova O. Effect of Bioactive Compound of Aronia melanocarpa on Cardiovascular System in Experimental Hypertension. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:815694.

Cerqueira N, Yoshida W. Óxido nítrico: revisão. Acta Cir Bras. 2002;17(6):417-23.

Chen SJ, Wu CC, Yen MH. Exercise Training Activates Large-Conductance Calcium-Activated K(+) Channels and Enhances Nitric Oxide Production in Rat Mesenteric Artery and Thoracic Aorta. J Biomed Sci. 2001;8(3):248-55.

Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Lin JW, Chen YL, Chen CH, et al. Nitric Oxide Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through cGMP-mediated Suppression of Extracellular-Signal Regulated Kinase Phosphorylation. Mol Pharmacol. 2005;68(4):1183-92.

Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, et al. Low-Intensity Exercise Training Delays Heart Failure and Improves Survival in Female Hypertensive Heart Failure Rats. Hypertension. 2008;51(4):1096-102.

Colombo CM, Macedo RM, Fernandes-Silva MM, Caporal AM, Stinghen AE, Costantino CR, et al. Efeitos de curto prazo de um programa de atividade física moderada em pacientes com síndrome metabólica. Einstein (São Paulo). 2013;11(3):324-30.

De Paula D, Steiner AA, Branco LG. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. Physiol Behav. 2000;70(5):505-11.

Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. Arq Bras Cardiol. 2011;96(1):68-75.

Diffee GM, Nagle DF. Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. J Appl Physiol. 2003;95(1):35-42.

Drummond LR, Carneiro-Júnior MA, Lauton-Santos S, Capettini LS, Mesquita TR, Cruz JS, et al. Óxido nítrico e dinâmica de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos: influência da capacidade de exercício. Rev Brasil Med Esp. 2016;22(1):31-4.

Dusse LM, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. J Bras Pat Med Lab. 2003;39(4).

Flora-Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Méd Bras. 2000;46(3):265-71.

Garcia J, Incerpi E. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrófico do óxido nítrico. Arq Bras Cardiol. 2008;90(6):443-50.

Glenney SS, Brockemer DP, Ng AC, Smolewski MA, Smolgovskiy VM, Lepley AS. Effect of Exercise Training on Cardiac Biomarkers in At-Risk Populations: A Systematic Review. J Phys Ac Hea. 2017;14(12):968-89.

Goessler KF, Martins-Pinge MC, Cunha NV, Karlen-Amarante M, Polito MD. Efeitos do treinamento físico sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e morfologia cardíaca de ratos hipertensos. Medicina (Ribeirão Preto Online) 2015;48(1):87.

Gomes RM, Marques AS, Torrezan R, Scomparin DX, Mathias PC, Rinaldi W. Efeito de um programa de exercício físico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade. Rev Ed Fis/UEM. 2012;23(2).

Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K et al. Effect of Different Intensities of Exercise on Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans: Role of Endothelium-Dependent Nitric Oxide and Oxidative Stress. Circulation. 2003;108(5):530-5.

Gourine AV. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. Gen Pharmacol: The Vascular System. 1995;26(4):835-41.

Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, Edwards JG. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Cardio Diabetol. 2008;7:34.

Guatimosim, S, Sobie, EA, Dos Santos Cruz, J, Martin, LA, Lederer, WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca 2+ current. Am J Physiol Cell Physiol, 2001;280(5), p. 1327-39.

Gutwenger I, Hofer G, Gutwenger AK, Sandri M, Wiedermann CJ. Pilot study on the effects of a 2-week hiking vacation at moderate versus low altitude on plasma parameters of carbohydrate and lipid metabolism in patients with metabolic syndrome. BMC Res Notes. 2015;8:103.

Hamilton DJ, Zhang A, Li S, Cao TN, Smith JA, Vedula I, et al. Combination of angiotensin II and l-NG-nitroarginine methyl ester exacerbates mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cause heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;310(6):667-80.

Hlavačková, L, Vranková, S, Janega, P, Pecháñová O, Babái P. The effect of indapamide on development of myocardial hypertrophy and fibrosis in L-NAME—induced hypertension in rat. Physiol Res. 2011;60(6):845-52.

Høydal MA, Stølen TO, Kettlewell S, Maier LS, Brown JH, Sowa T, et al. Exercise training reverses myocardial dysfunction induced by CaMKIIδ Coverexpression by restoring Ca<sup>2+</sup> homeostasis. J Appl Physiol. 2016;121(1):212-20.

Hu C, Chang H, Hsu Y, Liu C, Chen H. Ventricular hypertrophy and arterial hemodynamics following deprivation of nitric oxide in rats. Life Sci. 2005;78(2):164-73.

Ignarro LJ. (2ed) (2010) Nitric oxide: biology and pathobiology. Elsevier, Burlington Walford.

Janicki JS. Myocardial Collagen remodeling and left ventricular diastolic function. Braz J Med Biol Res. 1992; 25:975-82.

Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. J Mol Cell Cardiol. 2007;43(3):354-61.

Khan S. Nitric Oxide Regulation of Myocardial Contractility and Calcium Cycling: Independent Impact of Neuronal and Endothelial Nitric Oxide Synthases. Circulation Res. 2003;92(12):1322-9.

Khazan M, Hdayati M. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases. Scimetr. 2015; 3(1):e20987.

Kingwell, BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. FASEB J 2000;14:1685-96.

Kolpakov V, Gordon D, Kulik T. Nitric Oxide Generating Compounds Inhibit Total Protein and Collagen Synthesis in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. Circulation Res. 1995;76(2):305-9.

Kuru O, Şentürk Ü, Demir N, Yeşilkaya A, Ergüler G, Erkılıç M. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. Eur J Appl Physiol. 2002;87(2):134-40.

Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar C, Coimbra CC. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. Neurosci Lett. 2006;393(2-3):260-3.

Lacerda AC, Marubayashi U, Coimbra CC. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. Brain Res Bull. 2005;67(1-2):110-6.

Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Exercise, Vascular Wall and Cardiovascular Diseases. Sports Med. 2008;38(12):1009-24.

Levin BE, Dunn-Meynell AA. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286(4):771-8.

Lima PM, Santiago HP, Szawka RE, Coimbra CC. Central blockade of nitric oxide transmission impairs exercise-induced neuronal activation in the PVN and reduces physical performance. Brain Res Bull. 2014;108:80-7.

Lunz W, Natali AJ, Carneiro MA, dos Santos Aggum CL, Baldo MP, de Souza MO et al. Short-term in vivo inhibition of nitric oxide synthase with L-NAME influences the contractile function of single left ventricular myocytes in rats. Can J Physiol Pharmacol. 2011;89(4):305-10.

Machado MV, Vieira A, da Conceição F, Nascimento A, da Nóbrega A, Tibirica E. Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. Exp Physiol. 2017;102(12):1716-28.

Martin SR, Emanuel K, Sears CE, Zhang YH, Casadei B. Are myocardial eNOS and nNOS involved in the  $\beta$ -adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation. Cardiovasc Res. 2006;70(1):97-106.

Mascherbauer J, Zotter-Tufaro C, Duca F, Binder C, Koschutnik M, Kammerlander AA et al. Wedge Pressure Rather Than Left Ventricular End-Diastolic Pressure Predicts Outcome in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. JACC: Heart Failure. 2017;5(11):795-801.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. Circ Res. 2003;93(5):388-98.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, et al. Chronic L-Arginine Administration Attenuates Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. Hypertension. 1996;27(1):14-8.

Moraes-Teixeira JA, Félix A, Fernandes-Santos C, Moura AS, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Exercise training enhances elastin, fibrillin and nitric oxide in the aorta wall of spontaneously hypertensive rats. Exp Mol Pathol. 2010;89(3):351-7.

Moreno-JR H, Metze AC, Bento AC, Antunes E, Zatz R, Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. Bas Res Cardiol. 1996;91(3):248-55.

Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. J Physiol. 2002;541(3):863-75.

Oliveira CF, Cintra KA, Teixeira SA, De Luca IM, Antunes E, De Nucci G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. Eur J Pharmacol. 2000;391(1-2):121-6.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, et al. Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase Attenuates Cardiac Hypertrophy Induced by Chronic Isoproterenol Infusion. Circulation J. 2002;66(9):851-6.

Ozturk N, Olgar Y, Aslan M, Ozdemir S. Effects of magnesium supplementation on electrophysiological remodeling of cardiac myocytes in L-NAME induced hypertensive rats. J Bioenerg Biomembr. 2016;48(4):425-36.

Powers SK, Howley ET. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 6.ed. São Paulo: Manole Editora, 2009.

Rang, HP; Dale, MM. Editora Elsevier, 8<sup>a</sup> edição, 2016.

Ren J. Influence of gender on oxidative stress, lipid peroxidation, protein damage and apoptosis in hearts and brains from spontaneously hypertensive rats Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34, n. 5-6, p.432-38.

Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, Pagan LU, Damatto FC, Damatto RL et al. N-Acetylcysteine Influence on Oxidative Stress and Cardiac Remodeling in Rats During Transition from Compensated Left Ventricular Hypertrophy to Heart Failure. Cell Physiol Biochem. 2017;44(6):2310-21.

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. Hypertension. 1992;20(3):298-303.

Richey PA, Brown SP. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: A review. J Sports Sci. 1998;16(2):129-41.

Rossi BRO, Mazer D, Silveira LCR, Jacinto CP, Di Sacco THR, Blanco JHDB, et al. O exercício físico atenua o déficit autonômico cardíaco induzido pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico. Arq Bras Cardiol. 2009;92(1):31-8.

Rossi MA, Ramos SG, Prado CM. Chronic inhibition of nitric oxide synthase induces hypertension and cardiomyocyte mitochondrial and myocardial collagen remodelling in the absence of hypertrophy. J Hypertens 2003; 21:993-1001.

Sadek SA, Rashed LA, Bassam AM, Said ES. Effect of aliskiren, telmisartan and torsemide on cardiac dysfunction in l-nitro arginine methyl ester (L-NAME) induced hypertension in rats. J Adv Res. 2015;6(6):967-74.

Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. Mol Cel Bioc 2010;341(1-2):1-8.

Schnohr P, Marott JL, Jensen JS, Jensen GB. Intensity versus duration of cycling, impact on all-cause and coronary heart disease mortality: the Copenhagen City Heart Study. European J Prev Cardiol. 2011;19(1):73-80.

Schrammel. AC. Intensidade do Exercício Físico e o Risco Cardíaco em Praticantes de Futebol de Campo amador. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Educação Física/UNIJUI, Santa Rosa, 2015.

Scrogin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with l-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. Am J Physiol. 1998;274(2):367-74.

Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Sci. 2004;359(1446):1021-44.

Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. Card Res. 2007;75(2):315-26.

Serrano-Ferrer J, Walther G, Crendal E, Vinet A, Dutheil F, Naughton G et al. Right ventricle free wall mechanics in metabolic syndrome without type-2 diabetes: effects of a 3-month lifestyle intervention program. Car Diab. 2014;13(1)116.

Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC. Nitric oxide bioavailability in malaria. Tre Parasit. 2005;21(9):415-22.

Sonoda K, Ohtake K, Uchida H, Ito J, Uchida M, Natsume H et al. Dietary nitrite supplementation attenuates cardiac remodeling in 1 -NAME-induced hypertensive rats. Nitric Oxide. 2017;67:1-9.

Sousa ACS. Volume atrial esquerdo como índice de função diastólica. Arq Bras Cardiol. 2006;87(3):27-33.

Souza HDV, Penteado DMD, Martin-Pinge MC, Barbosa Neto O, Teixeira VPA, Blanco JHB et al. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. Arq Bras Cardiol. 2007;89(2):99-104.

Souza Junior TP, Asano RY, Prestes J, Sales MPM, Coelho JMO, Simões HG. Óxido nítrico e exercício: uma revisão. Revista da Educação Física/UEM. 2012;23(3):469-81.

Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Conde SJ, Campos DS, Damato R, Leopoldo AS, et al. Exercício e restrição alimentar aumentam o RNAm de proteínas do trânsito de Ca<sup>2+</sup> miocárdico em ratos. Arq Bras Cardiol. 2011;97(1):46-52.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiol. 2009;196(2):193-222.

Víteček J, Lojek A, Valacchi G, Kubala L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. Mediators Inflamm. 2012;2012:318087; 1-22

Wang H, Kohr MJ, Wheeler DG, Ziolo MT. Endothelial nitric oxide synthase decreases β-adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca<sup>2+</sup> current. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294(3):1473-80.

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. Cardio Res. 2002;54(1):162-74.

Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. Cardiovasc Res. 2001;50(3):495-508.

Xavier-Vidal R, Madi K, Reis AA, Paes LS, Carvalho ACA, Marques NM et al. Hydralazine reduces myocardial tissue damage in rats submitted to chronic inhibition of systemic nitric oxide synthesis during 4, 14 and 28 days. J Bras Pat Med Lab. 2003;39(3):245-55.

Xavier-Vidal R. Oxytalan elastic and collagen fibers during the repair process in experimental nitric oxide inhibition. Clinics. 2005;60(2):85-92.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci. 1999;96(2):657-62.

Yang L, Jia Z, Yang L, Zhu M, Zhang J, Liu J, et al. Exercise Protects against Chronic β-Adrenergic Remodeling of the Heart by Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. PLoS ONE. 2014;9(5):e96892.

Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, b S, Hu X et al. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. New Phytologist. 2007;175(1):36-50.

# ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA

