

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO TREINAMENTO EM NATAÇÃO
SOBRE A EXPRESSÃO DE RNAs MENSAGEIROS
DE PROTEÍNAS REGULADORAS DE CÁLCIO NO
MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Jamille Locatelli
Ouro Preto – MG
2011

Jamille Locatelli

**EFEITO DO TREINAMENTO EM NATAÇÃO
SOBRE A EXPRESSÃO DE RNAs MENSAGEIROS
DE PROTEÍNAS REGULADORAS DE CÁLCIO NO
MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Orientador: Mauro César Isoldi

Co-orientadora: Andréia Carvalho Alzamora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro do CNPQ, PROPP-UFOP, INCT-NANOBIOFAR.

**Dedico este trabalho a Deus, à minha família
abençoada e aos meus amigos.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus e à Nossa Senhora**, pela força e bênção de todos os dias.

Aos meus pais, **Pedro e Zilda**, por serem exemplo de amor incondicional e se doarem constantemente em prol da minha felicidade. Vocês foram minha inspiração para que meu sonho se tornasse realidade. Obrigada pelo apoio e doação incondicional. Essa vitória é nossa!

Ao **Diogo**, pelo carinho, pela força e por me ajudar a superar a ansiedade em todos os momentos.

Aos meus amados **avôs**, pelo apoio e confiança.

Ao meu orientador, prof. Dr. **Mauro César Isoldi** e à minha co-orientadora, prof^a Dr^a **Andréia Carvalho Alzamora**, pela confiança, respeito e ensinamentos. Obrigada pelo apoio nas dificuldades. Meu sincero OBRIGADA pela oportunidade!

Ao **Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima**, pelo carinho, orientação e ajuda nos trabalhos.

Aos colegas do CEDUFOP, em especial ao prof. Dr. **Adailton Eustáquio Magalhães**, que me deu o apoio necessário para que eu pudesse me dedicar à minha carreira acadêmica, e que mesmo nos momentos difíceis continuava ao meu lado me incentivando a vencer cada etapa.

Aos **colegas do laboratório**: toda a “equipe do Mauro”, em especial à **Carolina** pela amizade e ensinamentos; ao **Everton** e à **Thelma**, pelo carinho e grandiosos ensinamentos, e aos demais, pela colaboração e apoio.

À **Maria Rita** e à **Déia** pela amizade em todos os momentos.

Aos amigos **Rafael e Bernardo** que mesmo à distância tornaram meus dias mais felizes.

À **Amanda**, pela ajuda com os animais e pela amizade.

À equipe do laboratório de Hipertensão da UFMG, em especial à **Analina**, pelo apoio e prontidão.

Aos **funcionários** do Centro de Ciência Animal da UFOP, em especial ao **Jorginho**, pela amizade.

À **Cida**, pelo carinho, dedicação e prontidão.

Ao **Ernani e Paulo** pelo cuidado com os animais.

A todos os professores do **NUPEB**, em especial, às professoras Renata Guerra de Sá e Maria Lúcia Pedrosa, e ao professor Luís Carlos Afonso Crocco, pela colaboração e ensinamentos.

Aos **animais**, que com inocência sacrificaram suas vidas pela ciência.

RESUMO

A hipertensão arterial leva a alterações na expressão de proteínas envolvidas na mobilização de cálcio (Ca^{2+}), durante o acoplamento excitação-contração. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico sobre a expressão de RNA mensageiro das proteínas reguladoras do cálcio no tecido cardíaco. Para isso, ratos Fischer ($p=150-200\text{g}$) foram submetidos à cirurgia para a indução da hipertensão renovascular 2R1C, e posteriormente, divididos nos grupos 2R1C SED (sedentário) e 2R1C EX (exercitado), sendo que os grupos SHAM (cirurgia fictícia), foram seus respectivos controles (SED e EX). Após, os animais iniciaram um protocolo de natação (1h/dia, 5x/semana, durante 6 semanas) e foram avaliadas a pressão arterial média basal, a frequência cardíaca, a hipertrofia de cardiomiócitos e a expressão de algumas proteínas envolvidas na mobilização de Ca^{2+} . O exercício atenuou da pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (bpm) basais no grupo 2R1C EX em comparação aos animais 2R1C SED. A massa do coração (g) foi avaliada e os grupos SHAM EX, 2R1C SED e 2R1C EX mostraram um aumento em comparação com o grupo SHAM SED. Ao analisarmos os resultados do PCR em tempo real, observamos que os níveis da Ca^{2+} -ATPase do retículo (SERCA2a) aumentaram após o treinamento com natação, enquanto o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) teve seus níveis reduzidos no tecido cardíaco, em relação aos animais hipertensos sedentários. Com relação à fosfolamban (FLB), também observamos aumento na expressão em coração de animais 2R1C EX. Diante desses resultados, concluímos que o exercício físico pode reduzir a pressão arterial média basal e a frequência cardíaca, além de promover a hipertrofia cardíaca e influenciar o padrão de expressão de RNAs mensageiros das proteínas reguladoras do Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos com hipertensão renovascular.

ABSTRACT

The hypertension leads to changes in the expression of proteins involved in the calcium handling (Ca^{2+}) during the excitation-contraction coupling. The aim of this study was to evaluate the effects of physical exercise on the expression of messenger RNA of calcium regulatory proteins in heart tissue. For this, Fischer rats (p=150-200g) underwent surgery for the induction of renovascular hypertension 2R1C, and then divided into groups 2R1C SED (sedentary) and EX 2R1C (exercised), and SHAM groups (sham surgery), were their respective controls (SED and EX). After the animals started swimming (1 h, 5 time per week for 6 weeks) and were evaluated at baseline mean arterial pressure, heart rate, hypertrophy of cardiomyocytes and the expression of some proteins involved in Ca^{2+} handling. Exercise attenuated the mean arterial pressure (MAP) and heart rate (bpm) baseline in the group 2K1C EX animals compared to SED. The heart mass (g) was evaluated and SHAM EX, 2K1C EX and 2K1C SED groups showed an increase compared with the SHAM SED. Analyzing the results of real-time PCR, we found that levels of Ca^{2+} -ATPase of the reticulum (SERCA2a) mRNAs increased after training with swimming, while the exchanger $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) showed reduced levels in cardiac tissue in relation hypertensive sedentary animals. Regarding phospholamban (PLB), we also observed increased expression in the heart of animals 2K1C EX. Given these results, we conclude that physical exercise can lower blood pressure and mean baseline heart rate, promote cardiac hypertrophy and influence the pattern of expression of mRNAs of Ca^{2+} regulatory proteins in cardiomyocytes of rats with renovascular hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho ilustrativo mostrando a participação de algumas proteínas no processo de contração e relaxamento do cardiomiócito.	11
Figura 2: Atividade da enzima citrato sintase durante 90 segundos nos animais SHAM e 2R1C.	21
Figura 3: Pressão arterial basal em ratos SHAM e 2R1C.	22
Figura 4: Frequência cardíaca basal em ratos SHAM e 2R1C.	23
Figura 5: Massa seca do rim relativa ao comprimento da tíbia.	24
Figura 6: Percentual de redução da massa seca do rim esquerdo relativo ao comprimento da tíbia.	24
Figura 7: Massa úmida do coração relativa ao comprimento da tíbia.	25
Figura 8: Área total analisada do ventrículo esquerdo nos grupos SHAM e 2R1C.	26
Figura 9: Total de células inflamatórias do ventrículo esquerdo nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.	27
Figura 10: Espessura das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo em grupos experimentais SHAM e 2R1C.	27
Figura 11: Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos ratos SHAM e 2R1C.	28
Figura 12: Níveis de expressão relativa de RNAm de BNP nos animais SHAM e 2R1C.	29
Figura 13: Níveis de expressão relativa de RNAm de SERCA2a nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.	30
Figura 14: Níveis de expressão relativa de RNAm de fosfolamban nos animais SHAM e 2R1C.	31
Figura 15: Níveis de expressão relativa de RNAm de NCX1 nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação das etapas dos experimentos.....	13
Tabela 2: Sequência de bases dos primers utilizados.	19
Tabela 3: Atividade da enzima citrato sintase nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.....	21
Tabela 4: Expressão relativa do <i>brain natriuretic peptide</i> nos grupos experimentais	29
Tabela 5: Expressão relativa da SERCA2a nos animais SHAM e 2R1C.....	30
Tabela 6: Expressão relativa da fosfolamban nos grupos experimentais.	31
Tabela 7: Expressão relativa do NCX1 nos animais SHAM e 2R1C.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca^{2+}_i	corrente de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]$	concentração de Ca^{2+}
2R1C	hipertensão renal do tipo 2 rins 1 clipe
AC	adenilil ciclase
Akt	proteína kinase B
AMPc	adenosina monofostato cíclica
Ang II	angiotensina II
ATP	adenosina trifosfato
Ca^{2+}	cálcio
CAMKII	proteína kinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina
CCTL	canais de Ca^{2+} do tipo L
CSQ	calsequestrina
DHPR	receptores dihidropiridina
FC	frequência cardíaca
FLB	fosfolamban
FKBP 12.6	calstabilina 2
I_{Ca}	corrente de cálcio
IGF-1	fator de crescimento do tipo insulina 1
MAPK	proteína kinase ativada por mitógenos
Na^+	sódio
NCX	trocador de Na^+ / Ca^{2+}
NFAT	fator nuclear de células T ativadas
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PI3K	fosfatidilinositol 3-kinase
PKA	proteína kinase A
PKC	proteína kinase C

PP1	proteína fosfatase 1
PP2A	proteína fosfatase 2A
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptores de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SNS	sistema nervoso simpático
TnI	troponina I
TnC	troponina C
TnCc	troponina C cardíaca
TnT	troponina T

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais	13
3.2. Desenho experimental.....	13
3.3. Cirurgia para o Desenvolvimento da Hipertensão Renovascular	13
3.4. Protocolo de exercício	14
3.5. Atividade da citrato sintase.....	15
3.6. Confeção de Cânulas Vasculares	15
3.7. Registro Direto da PAM e FC.....	15
3.8. Coleta de Órgãos e Tecidos e Análise Histológica.....	16
3.9. Extração de RNA, síntese de c-DNA e PCR em tempo real.....	17

3.10. Análise estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Atividade da citrato sintase.....	21
4.2. Parâmetros da hipertensão renovascular	22
4.2.1. Níveis Basais de PAM e FC	22
4.2.2. Massa seca dos rins	23
4.2.3. Massa úmida do coração	25
4.3. Avaliação histológica do coração.....	25
4.4. Expressão de RNAm de BNP em cardiomiócitos.....	28
4.5 Expressão de RNAm de proteínas envolvidas na mobilização de cálcio no tecido cardíaco.....	29
4.5.1. SERCA2a	29
4.5.2. Fosfolamban	31
4.5.3. NCX1.....	32
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO I. Protocolo de aprovação do comitê de ética da UFOP.....	62

1.0. INTRODUÇÃO

O exercício físico tem efeitos benéficos consideráveis na hipertensão (Siscovick e cols., 1985, Kuru e cols., 2002, Reboredo e cols., 2010) e em certas condições psicológicas, tais como ansiedade e depressão (Taylor e cols., 1985). A eficácia da prática de exercício físico como método preventivo e de tratamento da pressão arterial (PA) é enfatizada por diversos autores (OMS, 1992; ACSM, 1993; Lopes e cols., 2003; Diretrizes Brasileiras da Hipertensão Arterial, 2006; Krinski e cols., 2006).

O exercício físico de baixa a moderada intensidade é capaz de reduzir a pressão sanguínea ou até mesmo retardar o aparecimento de hipertensão em ratos com hipertensão de Goldblatt (Marcus e Tipton, 1985; Rodrigues e cols., 2007; Soares e cols., 2011). Alguns estudos mostram que o exercício físico regular reduziu a pressão arterial média (PAM) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C (Rodrigues e cols., 2007; Soares e cols., 2011). Também tem sido reportado que o exercício de baixa intensidade atrasa o início da insuficiência cardíaca e melhora a sobrevida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com quadro de insuficiência já instalado (Emter e cols., 2005).

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C, descrito inicialmente por Goldblatt e colaboradores (1934), se mostra eficiente para o estudo da hipertensão e suas complicações (Schaible e cols., 1984). Através de uma constrição (com um clipe de prata) em uma das artérias renais, sustenta-se uma hipertensão mesmo na presença de um rim normal, não manipulado (Ploth, 1983; Navar e cols., 1998).

A hipertensão de Goldblatt evolui em 3 estágios, conforme proposto por Brown e cols. (1979). O primeiro estágio ocorre após a constrição da artéria renal e se caracteriza pela elevação da PA, da atividade da renina plasmática e dos níveis de angiotensina circulantes. No período de duas a quatro semanas, os valores de PA continuam a aumentar, mesmo com a atividade da renina plasmática e os níveis de angiotensina II (Ang II), tendendo a cair para níveis semelhantes ao normal (Morton e cols., 1983). Isso caracteriza a segunda fase da hipertensão, que ainda é dependente de angiotensina. Já na fase 3, a inibição do eixo renina-angiotensina não é mais capaz de reduzir completamente a PA.

O treinamento físico regular de intensidade moderada em humanos também promove queda da PA (Hagberg e cols., 1989; Cornelissen e Fagard, 2005). O exercício crônico parece reduzir a atividade simpática em repouso (Ray, 1999), o que poderia levar à diminuição da frequência cardíaca (FC), e a consequente queda do débito cardíaco. Além disso, o treinamento físico regular melhora a sensibilidade dos baroreceptores em animais normotensos e SHR, favorecendo o controle da PA (Brum e cols., 2000; Moraes-Silva e cols., 2010). Em animais SHR, houve redução na atividade da renina plasmática, após a prática de exercício físico (Hayashi e cols., 2000; Zamo e cols., 2004).

Embora a Ang II tenha um importante papel no sistema renina-angiotensina, outras angiotensinas possuem papel biologicamente ativos, tais como a Angiotensina (1-7), que apresenta efeitos opostos aos da Ang II. Dentre alguns efeitos, observa-se a redução no crescimento de cardiomiócitos (Tallant e cols., 2005), bem como o efeito inibitório na síntese de colágeno (Iwata e cols., 2005). Em camundongos com deficiência no receptor da Ang(1-7), denominado *Mas*, houve alteração na expressão de proteínas da matriz extracelular, acompanhada de disfunção cardíaca (Santos e cols., 2006). Em geral, estudos indicam que interações entre a Ang(1-7) e seu receptor têm um importante papel na função cardíaca, uma vez que a deleção deste leva ao comprometimento cardíaco e disfunção endotelial (Xu e cols., 2008).

A adaptação ao exercício físico é dependente de fatores tais como, carga, duração e frequência. A natação é reconhecida por sua eficiência na indução da hipertrofia miocárdica (Kaplan e cols., 1994; Evangelista e cols., 2003) e por um aumento significativo no volume diastólico final do ventrículo esquerdo em ratos (Oscari e cols., 1971; Dorn, 2007). O sistema nervoso autônomo regula diretamente a contratilidade e frequência do coração através de sinais químicos, incluindo neurotransmissores e hormônios. O treinamento físico produz alterações significantes na atividade do sistema nervoso autônomo, resultando em modificações na função do sistema cardiovascular (Krieger e cols., 1998; Kingwell, 2000).

O coração é constituído de miócitos cardíacos, fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e matriz extracelular (Nag, 1980; Zak, 1984; Weber, 2000). A hipertrofia cardíaca se manifesta por espessamento absoluto ou relativo das paredes das câmaras, devido ao aumento nas dimensões dos cardiomiócitos (Anversa e cols., 1986; Cooper,

1987). O cardiomiócito adulto é terminalmente diferenciado, havendo poucas evidências de capacidade de divisão celular, em condições normais, logo após o nascimento (Anversa e cols., 2002). Assim, o crescimento miocárdico depende, fundamentalmente, da hipertrofia, isto é, do aumento do tamanho celular.

As hipertrofias podem ser classificadas como concêntricas e excêntricas (Sponitz e Sonnenblick, 1973; Weber e cols., 1991). Na concêntrica, ocorre aumento de massa ventricular decorrente do aumento da espessura da parede, por meio da adição de sarcômeros em paralelo, porém com grande proliferação de fibroblastos e conseqüente aumento da matriz extracelular, da apoptose e da necrose tecidual (Wakatsuki e Schlessinger, 2004), levando à redução dos diâmetros cavitários. Isso decorre de um aumento de resistência à sobrecarga de pressão ou à ejeção.

Já na hipertrofia excêntrica, promovida pelo treinamento aeróbico, ocorrendo também nas fases de desenvolvimento embrionário, fetal e durante a gravidez, há um aumento de massa do ventrículo e da espessura da parede ventricular, mas com o aumento dos diâmetros cavitários, em decorrência de sobrecarga de volume promovida pelo aumento do retorno venoso. Tal estiramento induz o cardiomiócito a adicionar sarcômeros em série, aumentando, dessa forma, sua força contrátil (Wakatsuki e Schlessinger, 2004).

As vias de sinalização envolvidas na hipertrofia patológica são distintas da hipertrofia fisiológica (Mcmullen e Jennings, 2007). Algumas moléculas de sinalização, tais como as proteínas G, angiotensina II (Ang II), proteína kinase C e MAPKs são ativadas durante esse processo (Bowman e cols., 1997; Cook e cols., 1999; Geenen e cols., 1996). Já a proteína kinase Akt serina-treonina é uma mediadora importante na sinalização da fosfatidil inositol 3-kinase (PI3K), que está envolvida na regulação do crescimento cardíaco e função contrátil (Debosch e cols., 2006; Shiojima e Walsh, 2006; McMullen e cols., 2007). A Akt é ativada por diversos estímulos extracelulares de forma dependente de PI3K e regula múltiplos aspectos das funções celulares, inclusive sobrevivência, crescimento e metabolismo (Shiojima e Walsh, 2006). Ela é necessária para o crescimento cardíaco fisiológico (Debosch e cols., 2006).

Kemi e cols. (2008) sugeriram que o exercício aeróbico ativa a via de sinalização da Akt/mTOR do coração. Esta via parece estar envolvida no crescimento fisiológico deste órgão decorrente do exercício voluntário, treinamento de intensidade moderada ou

protocolos de natação (Godfrey e cols., 2003; McMullen e cols., 2003; Ceci e cols., 2004; Latronico e cols., 2004; Debosch e cols., 2006). Em contrapartida, a hipertrofia patológica induzida pela sobrecarga desativa a via da Akt/mTOR (Kemi e cols., 2008) e está associada com a reexpressão de genes fetais (Frey e Olson, 2003) tais como o peptídeo atrial natriurético (ANP) e peptídeo natriurético tipo B (McMullen e Jennings, 2007).

O exercício causa hipertrofia cardíaca que é conhecida como “coração de atleta” (Raskoff e cols., 1976; Lauschke e Maisch, 2009). É uma hipertrofia cardíaca fisiológica, sem alterações no conteúdo de colágeno (Lattanzi e cols., 1992; Di Bello e cols., 1997), que é induzida por uma resposta adaptativa benéfica no sistema cardiovascular; diminuição da frequência cardíaca em repouso, redução da frequência cardíaca durante o exercício submáximo e aumento no tempo de enchimento do coração e retorno venoso. Essas adaptações podem ajudar a satisfazer o aumento na demanda cardíaca durante o exercício e manter e/ou aumentar a função cardíaca em condições de repouso (Shapiro e Smith, 1983; Mockel e Stork, 1996; Richey e Brown, 1998).

O peptídeo natriurético cerebral (BNP) foi originalmente isolado do cérebro de mamíferos (Sudoh e cols., 1988; Kojima e cols., 1989) e atua como um hormônio cardíaco, semelhantemente ao peptídeo natriurético atrial (Mukoyama e cols., 1991). O BNP é sintetizado pelos ventrículos e sua expressão é induzida nos casos de sobrecarga ventricular e hipertrofia (Ogawa e cols., 1991; Iso e cols., 1997). Além disso, tem mostrado ser um fator de risco para eventos cardiovasculares na hipertensão (Suzuki e cols., 2002). Essas observações nos sugerem o possível envolvimento deste peptídeo na patofisiologia de cardiomiopatias hipertróficas.

Os mecanismos de contração do coração podem ser afetados durante o processo de instalação da hipertensão e conseqüente hipertrofia cardíaca. Os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes que participam da função contrátil dos cardiomiócitos foram inicialmente identificados por Fatt e Katz, em 1953 (Fatt e Katz, 1953). Posteriormente, Hagiwara e cols. (1975) sugeriram a classificação dos canais em dois tipos distintos, de acordo com suas propriedades eletrofisiológicas: canais de Ca^{2+} de baixa e alta voltagem. De acordo com as propriedades farmacológicas e biofísicas dos canais de Ca^{2+} , eles podem ainda ser subdivididos em diversos tipos: tipo-T, tipo-L, tipo-N, tipo P/Q e tipo-R (Kamp e Hell, 2000).

O canal de Ca^{2+} do tipo-T, que é classificado como de baixa voltagem, se abre quando o potencial de membrana está baixo e se inativa rapidamente. Os canais do tipo-L são freqüentemente denominados “receptores dihidropiridina” (DHPR) e predominam nos ventrículos. Em cardiomiócitos estão presentes os canais do tipo T e L (Bers, 2002).

Em miócitos cardíacos a corrente de Ca^{2+} através dos canais do tipo-L (I_{Ca}) é o principal caminho para o influxo deste íon proveniente do espaço extracelular para o citoplasma; a I_{Ca} induz a contração do músculo cardíaco e regula sua força contrátil (Bers, 2002; Bers e Despa, 2006; Richard e cols., 2006). A fosforilação dos canais de Ca^{2+} do tipo-L aumenta a corrente de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (Hussain e Orchard, 1997; Delprincipe e cols. 2001; Magyar e cols., 2011).

O retículo sarcoplasmático (RS) é um sistema de membranas intracelulares em células do músculo cardíaco que tem um papel fundamental no acoplamento excitação-contração cardíaco (Frank e cols., 2003).

O canal de liberação de Ca^{2+} do RS (ou receptor de rianodina, RyR2) é um componente fundamental no mecanismo de excitação-contração (EC) cardíaco. A liberação do Ca^{2+} advindo do RS através dos canais de RyR2 inicia o processo de contração do coração. Os canais de RyR2 tem três sítios de fosforilação bem definidos: Ser²⁰³⁰ (Xiao e cols., 2005), Ser²⁸⁰⁹ e Ser²⁸¹⁵, embora possam haver outros (Rodriguez e cols., 2003). Ser²⁰³⁰ e Ser²⁸⁰⁹ são fosforilados por PKA (Rodriguez e cols., 2003) e Ser²⁸¹⁵, pela proteína kinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) (Wehrens e cols., 2004).

Três isoformas de canais de RyR em mamíferos codificadas por genes específicos foram identificadas e clonadas. RyR2 é a isoforma predominante no coração e está diretamente envolvida no mecanismo de EC (Tunwell e cols., 1996). Os canais de RyR são tetrâmeros de alto peso molecular localizados na membrana do RS (Takeshima e cols., 1989; Otsu e cols., 1990). São caracterizados por enormes domínios N-terminais protusos através do citosol. Muitos dos canais modulatórios se ligam a esse domínio citoplasmático, incluindo calmodulina (Fruen e cols., 2000, Balshaw e cols., 2001), a calstabin 2 (FKBP 12.6) (Brillantes e cols., 1994; Marx e cols., 2001), proteína kinase A (PKA) (Marx e cols., 2000), proteínas fosfatases PP1 e PP2A e sorcina (Meyers e cols., 1995; Marx e cols., 2000). Os canais de RyR também ligam proteínas à superfície luminal do RS.

As proteínas FK são imunofilinas e são assim nominadas baseadas na ligação com o imunossupressor *tacrolimus* (originalmente denominado FK506) (Brillantes e cols., 1994). No músculo cardíaco estão presentes as isoformas FKBP12 e FKBP12.6 (Timerman e cols., 1993; Timerman e cols., 1996), sendo esta a moduladora-chave da função do canal de RyR2 (Wehrens e cols., 2005; Yano e cols., 2005). A FKBP12.6 é uma proteína de estabilização dos canais de Ca^{2+} que se liga aos canais de RyR2 em cada monômero. Durante a fase de repouso do mecanismo de contração (diástole) essa proteína mantém o canal em seu estado fechado (Brillantes e cols., 1994; Wehrens e cols., 2003), prevenindo a excessiva liberação de Ca^{2+} . Um dos fatores que poderiam levar a essa dissociação é a fosforilação do resíduo Ser^{2809} pela PKA (Ahern e cols., 1994; Brillantes e cols., 1994; Kaftan e cols., 1996). Entretanto, alguns investigadores encontraram que a FKBP12.6 ainda se liga ao canal de RyR2 após essa fosforilação (Stange e cols., 2003; Xiao e cols., 2004).

As proteínas fosfatases se ligam ao canal de RyR2, via proteínas específicas: a PP1 utiliza a esfinofilina e a PP2A, a PR130 (Allen e cols., 1997; Marx e cols., 2001). Terentyev e cols. (2003) sugeriram que a PP1 aumenta a atividade do canal de RyR2, mas a maioria dos estudos relata que essa proteína reduz sua atividade (Sonnleitner e cols., 1997; Carr e cols., 2002; DuBell e cols., 2002; Santana e cols., 2002). A aplicação da PP1 e PP2A para permeabilizar miócitos levou a uma ativação aguda de Ca^{2+} , seguida pela deleção do conteúdo do íon do RS (Terentyev e cols., 2003), sugerindo que a depressão do acoplamento EC pelas fosfatases pode envolver a depleção dos estoques de Ca^{2+} no RS, devido à ativação dos canais de RyR2. Além disso, as fosfatases têm mostrado aumentar a atividade dos canais de RyR2 em alguns (Terentyev e cols., 2003; Carter e cols., 2006), mas não em todos os canais estudados (Hain e cols., 1994). Todavia, o mecanismo preciso de ação de PP1 e PP2A no manejo do Ca^{2+} intracelular ainda necessita de mais investigações.

Os canais de RyR2 no músculo cardíaco são ativados pelo influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L (CCTL). A ativação do limiar de aproximadamente 10^{-8} e 10^{-7} M abre os canais de RyR2, sendo que sua ativação máxima ocorre entre 10^{-6} e 10^{-5} M e declina com o aumento nas concentrações e inibição máxima a aproximadamente 10^{-2} M de Ca^{2+} (Meissner, 2002).

Após a despolarização da membrana do cardiomiócito, os CCTL são ativados na membrana do sarcolema atingindo os túbulos transversos (TT). O influxo subsequente de Ca^{2+} muito maior que o efluxo através dos canais de RyR2 no RS desencadeia um processo denominado “liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ”. Durante a sístole, um aumento de cerca de dez vezes na concentração intracelular de Ca^{2+} resulta na formação de pontes cruzadas entre actina e miosina após a ligação do Ca^{2+} com a troponina C (TnC). A troponina T (TnT) interage com a tropomiosina e esta então disponibiliza para ligação os sítios de ligação da miosina presentes na actina. A ligação do Ca^{2+} em um único sítio da troponina C cardíaca (TnCc) reforça a afinidade da TnC com a troponina I (TnI) e favorece o movimento do complexo troponina-tropomiosina. Com ATP suficiente, ocorre o deslizamento dos miofilamentos. Esse processo permite a contração muscular (Gordon, 2000). As fases da contração (sístole e diástole) são intimamente controladas pelo estado funcional dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, RyRs, TnC, TnI, SERCA, FLB, NCX e outras proteínas (Sheehan e cols., 2007).

A estimulação catecolaminérgica do coração, resultante da ativação do sistema nervoso simpático durante o estresse, está ligada à fosforilação do canal de RyR2, no resíduo Ser²⁸⁰⁸ por PKA e, tem um papel importante durante o rápido aumento da liberação de Ca^{2+} no momento do acoplamento EC (Gomez e cols., 1997).

A liberação pontual de Ca^{2+} seguida de sua rápida absorção, fenômeno conhecido como “ Ca^{2+} spark”, é o resultado da abertura simultânea de um grupo de canais de RyR2 (Cheng e cols., 1993). Atualmente, acredita-se que o Ca^{2+} spark possa ser desencadeado por 3 mecanismos: abertura de 1 ou mais CCTL, durante um potencial de ação, através do processo de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} ; por aberturas espontâneas do canal de rianodina, principalmente quando a carga de Ca^{2+} no retículo está alta; e através da difusão do íon nas proximidades das unidades de liberação de Ca^{2+} que acabaram de lançá-lo para fora do retículo sarcoplasmático (Rovetti e cols., 2010). O “ Ca^{2+} spark” constitui um evento elementar do acoplamento excitação-contracção cardíaco (Cheng e Lederer, 2008). Em geral são recrutadas de 4 a 6 canais de RyR2, embora 12% dos eventos sejam provocados pela abertura de um único canal (Wang e cols., 2004).

Para facilitar a coordenação da liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , grupos de canais de RyR2 são localizados em áreas estratégicas na membrana do RS (conhecidas

como Unidades de Liberação de Cálcio), diretamente adjacentes aos CCTL, dentro dos TT do sarcolema (Franzini-Armstrong e cols., 1999; Yin e Lai, 2000). Nas concentrações diastólicas de Ca^{2+} , a TnI inibe a interação entre alguns monômeros de actina e miosina (Layland e cols., 2005). O influxo de Ca^{2+} através dos CCTL ativa os canais de RyR2 próximos, os quais são acoplados funcionalmente (Marx e cols., 2001), induzindo a liberação sincronizada do Ca^{2+} (Cheng e cols., 1993; Bers, 2002). Essa liberação gera uma concentração transitória de Ca^{2+} intracelular suficiente para induzir a contração. O aumento na concentração do Ca^{2+} citosólico durante a contração é imediatamente seguido de sua remoção, resultando na desativação da maquinaria contrátil e relaxamento miocárdico durante a diástole. O Ca^{2+} citosólico é bombeado de volta para o RS pela SERCA2a. Esta bomba controla o processo de contração e relaxamento do cardiomiócito e a fosfolamban (FLB) regula sua atividade. A SERCA2a utiliza a energia fornecida pela hidrólise do ATP para transportar o Ca^{2+} através da membrana. Dois íons Ca^{2+} são transportados para cada molécula de ATP hidrolisada (Simmerman e Jones, 1998; MacLennan e Kranias, 2003).

Em sua forma não-fosforilada, a FLB inibe a atividade da SERCA2a; a fosforilação da FLB reverte a inibição. O Ca^{2+} também é transportado para fora da célula via NCX1. Em ratos, 7% do Ca^{2+} são removidos pelo NCX1, 92% pela SERCA2a e o restante (1%) por sistemas mais lentos (Bers, 2002).

No coração, a atividade da SERCA2a é regulada por duas pequenas proteínas de baixo peso molecular: a FLB (MacLennan e cols., 2003; Vangheluwe e cols., 2005; Bhupathy e cols., 2007) e a sarcolipina (Vangheluwe e cols., 2005; Vangheluwe e cols., 2006; Bhupathy e cols., 2007).

A fosfolamban é uma proteína integral de membrana que consiste de 52 aminoácidos e se expressa predominantemente no músculo cardíaco e em pequenas quantidades no músculo esquelético de contração lenta, músculo liso e células endoteliais (Lalli e cols., 1997; Sutliff e cols., 1999). Ela pode ser fosforilada em 3 sítios distintos após uma estimulação adrenérgica: no resíduo Ser^{16} pela PKA e no resíduo Thr^{17} pela CAMKII. Edes e Kranias (1990) mostraram que a fosforilação no resíduo Ser^{10} pela PKC não é fisiologicamente relevante (Edes e Kranias, 1990). A fosforilação da FLB no resíduo Ser^{16} pela PKA (Simmerman e cols., 1986) e conseqüente ativação da SERCA2a, permite a rápida captação do Ca^{2+} de volta para o

RS, potencializando a cinética do relaxamento e fornecendo conteúdo adicional de Ca^{2+} para a próxima liberação. Posteriormente, com o aumento de Ca^{2+} intracelular e níveis celulares ótimos de AMPc (Napolitano e cols., 1992) a CaMKII é ativada e causa fosforilação da FLB no resíduo de Thr¹⁷, levando também à ativação da SERCA2a. A fosforilação da FLB no resíduo Ser¹⁶ ocorre rapidamente após a estimulação adrenérgica e permite a fosforilação no resíduo Thr¹⁷, subsequente ao aumento do Ca^{2+} intracelular (Kuschel e cols., 1999). A defosforilação da FLB pode contribuir para o acúmulo de Ca^{2+} no RS, resultante da deficiência no transporte deste íon pela SERCA2a na presença de fosfatases (Macdougall e cols. 1991; Steenaart e cols. 1992).

Alguns estudos mostram que a FLB defosforilada age como uma inibidora da SERCA2a e que a fosforilação induz um aumento substancial no transporte de Ca^{2+} em quatro vezes ou mais (MacLennan e Kranias, 2003; Mattiazzi e cols., 2005).

Estudos imunohistológicos têm mostrado que os CCTL estão localizados predominantemente nos túbulos T (Brette e Orchard, 2003), na proximidade dos canais de RyR2 (Scriven e cols., 2000), na díade: na região juncional, onde o influxo de Ca^{2+} leva à liberação de Ca^{2+} pelo RS. Essas proteínas parecem estar localizadas nos elementos transversos do sistema de túbulos T (Chen-Izu e cols., 2006), sugerindo uma homogeneidade também dentro deles. O tamanho da junção pode diferir em diferentes regiões da célula (Inoue e Bridge, 2005). Os miócitos advindos de corações debilitados têm reduzido conteúdo de Ca^{2+} no RS e um transiente sistólico de Ca^{2+} que é menor quando comparado aos de miócitos controle (Orchard e Brette, 2008).

Na década de 70, a calsequestrina foi extraída do RS pela primeira vez por MacLennan e Wong (1971). Seu nome é devido a sua capacidade de sequestrar Ca^{2+} dentro do RS (MacLennan e Wong, 1971). A CSQ é uma proteína importante para o armazenamento de Ca^{2+} no RS, mas tem também papel crucial no controle e na estabilização do estoque deste íon (Terentyev e cols., 2003).

Em humanos há dois tipos de CSQ codificadas por 2 diferentes genes: CSQ1, presente em fibras de contração rápida, e CSQ2, expressa no coração e em fibras de contração lenta. Esta última se ancora ao canal de RyR2 pela triadina e junctina e assim, se forma o complexo de liberação de Ca^{2+} do RS (Zhang e cols., 1997). As porções monoméricas de CSQ2 parecem ser responsáveis pela função regulatória da proteína (Qin e cols., 2008).

A CASQ2 inibe a atividade do canal de RyR2 a baixas concentrações de Ca^{2+} luminal, e essa inibição é cessada quando essas concentrações aumentam (Gyorke e Terentyev, 2008). Embora esse efeito direto da CASQ2 no canal de RyR2 esteja descrito, de acordo com muitos achados, as interações dessa proteína dependentes de Ca^{2+} com RyR2 são mediadas pelas proteínas integrais de membrana triadina e/ou junctina. De acordo com Gyorke e Terentyev (2008), a CASQ2 modula a função dos canais de RyR2 da seguinte maneira: quando a $[\text{Ca}^{2+}]$ no RS é baixa, a CASQ2 se liga a triadina e/ou junctina e inibe a atividade do canal; com a carga de Ca^{2+} restaurada, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ no RS inibe a ligação da CASQ2 com as proteínas de membrana, liberando a atividade do canal de RyR2 (Gyorke e Terentyev, 2008).

Em um estudo utilizando um treinamento de baixa intensidade em esteira, observou-se o aumento da expressão de proteínas envolvidas na mobilização do Ca^{2+} em camundongos *knockout* para os adreno-receptores α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} ARKO), nos quais a liberação de noradrenalina circulante leva à hiperatividade simpática, resultando em um quadro de insuficiência cardíaca. Aos 7 meses de idade, quando os animais apresentavam insuficiência cardíaca severa, o exercício restaurou os níveis de expressão do NCX1, SERCA2a e FLB, além de restaurar os níveis de fosforilação em ambos os resíduos Ser¹⁶ e Thr¹⁷, em relação ao controle. Isso resultou na melhora da função ventricular esquerda (Rolim e cols., 2007).

Um efeito importante das modificações gênicas do miocárdio com hipertrofia patológica é a redução da expressão de genes envolvidos na homeostase intracelular de íons, como, por exemplo, a redução nos níveis de SERCA2a. Além disso, essa enzima sofre efeito inibitório adicional da FLB, que permanece defosforilada. Esse conjunto de efeitos contribui para a elevação da concentração de Ca^{2+} citosólico na diástole, explicando o retardo de relaxamento do miocárdio hipertrofiado (Matsubara e Matsubara, 2003).

Apesar de existirem poucos trabalhos que abordem os efeitos do exercício físico sobre a expressão de proteínas envolvidas no gerenciamento do cálcio em cardiomiócitos de animais hipertensos, a maioria deles mostra efeitos benéficos da prática regular de exercício para a melhora da mobilização deste íon no coração. Visto isto, a meta deste trabalho foi avaliar os efeitos da natação na expressão de RNAs

mensageiros destas proteínas no tecido cardíaco de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

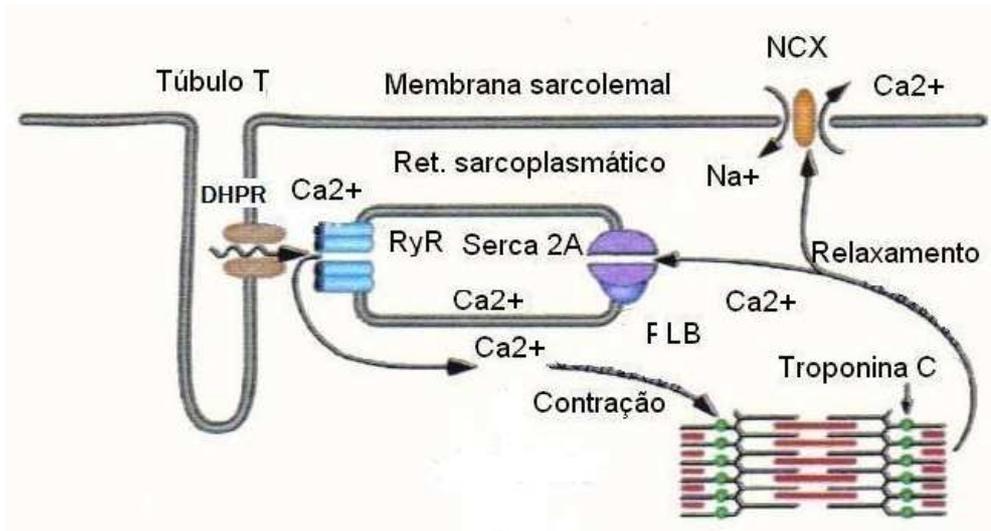


Figura 1: Desenho ilustrativo mostrando a participação de algumas proteínas no processo de contração e relaxamento do cardiomiócito.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar os efeitos do treinamento aeróbico em natação sobre a expressão de RNAs mensageiros de proteínas reguladoras de Ca^{2+} no músculo cardíaco de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

2.2. Objetivos Específicos:

Avaliar:

- Os efeitos da natação sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca basais, em ratos Fischer normotensos e com hipertensão 2R1C.
- As alterações no peso do coração de ratos Fischer normotensos e com hipertensão 2R1C sedentários e submetidos ao exercício físico.
- Através de análises histológicas alterações na morfologia cardíaca em ratos Fischer normotensos e com hipertensão 2R1C sedentários e submetidos ao exercício físico.
- Os níveis de expressão de RNAs mensageiros de SERCA2a, fosfolamban, NCX1, calsequestrina e BNP em ratos Fischer normotensos e com hipertensão renovascular 2R1C sedentários e submetidos ao exercício físico.

3.0. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Fischer, pesando entre 150 e 200 gramas, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo quatro animais por caixa, receberam água e ração *ad libitum*, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 6:00 às 18:00h). Todos os protocolos realizados foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2010/45), conforme anexo I. Os animais foram pesados antes da cirurgia e da última sessão de treino do protocolo.

3.2. Desenho Experimental

Tabela 1: Representação das etapas dos experimentos.

1º dia	Após 4 dias	Após 6 semanas	Após 24 horas	Sóleo	Ventrículo esquerdo	Rins
Cirurgias SHAM e 2R1C	Início do protocolo de natação (gupos SED e EX)	Canulação da artéria femoral	PA e FC, eutanasia e retirada de órgãos	Atividade da citrato sintase	<i>Western Blot</i> , histologia e PCR em tempo real	Peso seco

3.3. Cirurgia para desenvolvimento da Hipertensão Renovascular

Para induzir a hipertensão arterial foi utilizado o método 2 rins 1 clipe (2R1C) descrito por Goldblatt e cols. (1934). Os ratos foram submetidos a 24 horas de jejum com consumo livre de água. No dia da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina e Xilasina (50 mg/Kg e 10 mg/Kg, ip, respectivamente), colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica e submetidos à tricotomia e assepsia na região abdominal com álcool iodado. Logo abaixo do processo xifóide foi feita uma

incisão mediana de 4 a 6 cm. Foram colocados refratores bilateralmente na incisão cirúrgica e as alças intestinais foram retraídas. Em seguida, a artéria renal foi isolada com o auxílio de pinças e cotonetes. Um clipe de prata 950 (contendo 5% de liga de cobre e com ótimo grau de dureza) apresentando 8 mm de comprimento e 2 mm de largura, em forma de U, cuja abertura era previamente fixada através do uso de um calibrador, foi colocado ao redor da artéria renal. O grau de constrição do clipe escolhido foi de 0,20 mm de diâmetro interno, diâmetro este que se mostrou mais eficiente para obtenção do índice PA > 130 mmHg (nível de pressão escolhido para selecionar os animais hipertensos) (Britto e cols., 1997 e Wang e cols., 2005).

Outro grupo de animais foi submetido à cirurgia fictícia (SHAM), que consistia na realização de todos os procedimentos acima, exceto a colocação do clipe de prata em torno da artéria renal. Estes animais SHAM foram utilizados como controle (normotensos).

Em todos os animais foi feita a sutura no abdômen, envolvendo com pontos contínuos a camada muscular e pontos separados, a pele. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, em todos os animais foi administrado antibiótico (0,01 ml/100 g do peso corporal - pentabiótico veterinário da marca Fort Dodge).

3.4. Protocolo de exercício físico

Após quatro dias da cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: ratos sedentários e ratos submetidos ao exercício físico (natação sem carga). Os animais foram submetidos ao treinamento de natação sem carga, por este ser considerado um modelo descrito na literatura de indução de hipertrofia cardíaca fisiológica em ratos e camundongos (Evangalista e cols., 2003).

No primeiro dia de treino aeróbico em natação, a sessão durou 20 minutos, no segundo, 40 e do terceiro ao trigésimo (6 semanas), a duração foi de 60 minutos, 5 dias por semana.

Os grupos de animais sedentários foram colocados em baldes (4 ratos por balde) com água rasa (± 15 cm de altura, em temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$), para que os mesmos fossem semelhantemente manipulados e expostos às condições de estresse dos grupos exercitados. No primeiro dia foram mantidos em água rasa por 20 minutos e do segundo ao trigésimo dia, por 40 minutos, 5 vezes por semana. No caso dos animais exercitados,

a natação foi realizada em um tanque adaptado com 12 divisórias de 38 por 60 cm de largura e 50 cm de profundidade e a temperatura da água era mantida em $30 \pm 2^\circ\text{C}$, através do uso do termostato.

3.5. Atividade da citrato sintase

Após o sacrifício dos animais, os músculos sóleos esquerdos foram retirados para a dosagem da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS). A CS catalisa a reação entre acetil coenzima A (acetil CoA) e ácido oxalacético, para formar ácido cítrico. A hidrólise do tioéster de acetil CoA resulta na formação de coenzima A com um grupo thiol. Este, por sua vez, reage com DTNB [5,5-dithiobis-(2-ácido nitrobenzóico)] para formar TNB (5-thio-2-ácido nitrobenzóico). O produto de cor amarela é observado espectrofotometricamente pela mensura da absorbância a 412 nm. Para a dosagem da atividade, foi utilizado o Citrate Synthase Assay Kit (Catálogo CS0720, Sigma Aldrich). Todos os procedimentos estão descritos no manual do kit.

A escolha do músculo sóleo deveu-se ao fato deste ter uma grande quantidade de fibras vermelhas (aproximadamente 95%), as quais caracterizam o uso predominante da via oxidativa.

3.6. Confeção de Cânulas Vasculares

Cânulas foram confeccionadas a partir de 4 cm de tubos de polietileno PE 10, polimerizados por aquecimento e 16 cm de tubos de polietileno PE 50. O interior das cânulas foi preenchido com uma solução salina (NaCl, 0,9%) e a extremidade livre de PE 50 foi fechada com um oclisor metálico antes das canulações.

3.7. Registro Direto da PAM e FC

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os ratos anestesiados. Após 42 dias do início da AF, os animais 2R1C e SHAM foram anestesiados com Ketamina e Xilasina (50 mg/Kg e 10 mg/Kg, ip, respectivamente).

Para registro dos parâmetros cardiovasculares realizou-se uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vâsculo-nervoso femoral. A cânula foi introduzida na aorta abdominal, via artéria femoral previamente heparinizada, para registro direto da pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e

freqüência cardíaca (FC). Para facilitar o manuseio com o animal acordado, as cânulas foram dirigidas pelo tecido subcutâneo por meio de um trocáter, e exteriorizados no dorso do animal. Após esse procedimento os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*.

A avaliação dos diferentes parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) foi realizada através do registro direto da PA, através das canulações arteriais dos ratos acopladas ao sistema computadorizado de aquisição de dados (Powerlab). O registro da PA foi feito 24 h após a canulação da artéria femoral, com injeções de heparina na cânula antes da conexão junto ao transdutor.

A PA foi monitorada por um transdutor de pressão modelo Gould, conectado a um amplificador (PM-1000, CWE). O sinal de pressão arterial pulsátil foi derivado para um cardiômetro (PM-1000, CWE) para se obter a FC. A PAP e a FC foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/ digital de 12 bits (Powerlab 4/ 20), a uma freqüência de 800 Hz e armazenados em disco rígido. Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Powerlab 4/ 20) para se obter a PAM, as características temporais e as alterações máximas dos parâmetros desejados. Simultaneamente, a PAM e a FC foram calculadas a partir de pulsos de PA. Essas variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais distintos no monitor e armazenadas em disco rígido do computador.

3.8. Coleta de Órgãos e Tecidos e Análise Histológica

Ao término dos experimentos *in vivo*, os animais foram sacrificados por decaptação, submetidos a uma laparotomia mediana para ressecção dos tecidos. Em necropsia, rins, coração e tíbia esquerda foram coletados.

Durante a primeira fase do trabalho, o coração foi pesado (peso úmido) e os rins desidratados em estufa e pesados (peso seco). Utilizando-se um paquímetro analógico, a tíbia foi medida em seu comprimento (mm).

Para as análises histológicas do ventrículo esquerdo (ápice), fragmentos não excedentes a 01 cm de espessura dos tecidos foram fixados em formalina e processados por técnicas histopatológicas de rotina. Estes órgãos foram desidratados, diafanizados, embebidos e emblocados em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro micrômetros de espessura foram obtidas através de técnicas de microtomia, fixadas em

lâminas de vidro tratadas com albumina. As lâminas obtidas foram coradas pela técnica da Hematoxilina/Eosina (HE) para avaliações das principais de alterações estruturais.

Foram realizadas avaliações quantitativas por técnicas de morfometria digital. Para isso, foram obtidas 20 imagens aleatórias do tecido cardíaco no microscópio Leica BM5000 com câmera digital (Leica DFC 300 FX) acoplada com módulo RGB ativada e associada ao *software* de captura de imagens Leica Application Suite em objetiva microscópica de 40 vezes. As imagens foram analisadas no *software* Leica Qwin V.3.2.1 (Leica Switzerland). Para a avaliação do quadro inflamatório no coração, o número total de células presentes no campo microscópio foi determinado pela contagem automática de núcleos celulares. Além disso, no coração foi avaliada a espessura das fibras miocárdicas através de medidas interativas, pelo desenho de uma reta ligando os limites celulares superior e inferior na região do núcleo. Somente fibras com núcleos e limites celulares visíveis foram incluídas, com total de cem cardiomiócitos analisados para cada animal.

3.9. Extração de RNA, síntese de c-DNA e PCR em tempo real

O RNA total das células foi obtido com a utilização do Tri-Reagent-LS (Trizol, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Foi adicionado 1 ml do Tri-Reagent-LS diretamente sobre parte do ventrículo esquerdo, que a seguir foi homogeneizado. O lisado celular foi coletado e incubado por 5 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionou-se 134 µl de 1-bromo-3-cloropropano, e em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após, separou-se o sobrenadante, que continha o RNA, o qual foi precipitado com a adição de 650 µl de isopropanol, por 10 minutos, à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 35 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1,3 ml de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras colocadas a - 80°C por no mínimo 1 h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA deixado por 10 minutos à temperatura ambiente, para evaporação do excesso de etanol.

O RNA foi ressuspensionado em 10-50µl de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc.), e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (turbo-DNA-free™, Ambion Inc.). Resumidamente, a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1µl de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação (qual), seguido por incubação por 2 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000g por 2 minutos para precipitar o reagente de inativação (qual) com a DNase.

A concentração de RNA foi determinada por leitura da razão OD₂₆₀/ OD₂₈₀ em espectrofotômetro. A reação de transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada com 1 µg de RNA total, utilizando 2µl de oligonucleotídeos randômicos (0,2µg/µl) e 2µl de dNTPs (10mM), em reação com volume final de 26µl corrigido com H₂O/DEPC. O tubo contendo essa mistura de reação foi aquecido por 5 minutos a 65°C. Imediatamente após a incubação, foi transferido para uma cuba com gelo, adicionando-se 8 µl de tampão de PCR 5x, 2µl de DTT 10mM, 2µl do inibidor de ribonuclease 40U/µl, e 2µl de Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, catálogo 18080044), finalizando um volume de 40 µl por reação. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 3 minutos a 42°C, 5 minutos a 25°C, e 50 minutos a 50°C, sendo a reação inativada a 70°C por 15 minutos, e o cDNA mantido a 4°C. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo.

Para esses ensaios, foram preparadas soluções contendo os seguintes primers em concentração de 2µmol/µl, cujas sequências estão representadas na tabela 2: calsequestrina, SERCA2a, FLB, NCX1, BNP, *Mas* e o normalizador 26S (Sigma Aldrich). Todos os primers foram desenhados no PUBMED, passando por pelo menos um íntron, contendo 5000 pares de bases. Uma solução contendo Platinum Supermix 2X (100mM de KCl, 40mM de Tris-HCl, 400µM de dNTPS, PlatinumTaq DNA polimerase 0,1U/µl e 6mM de MgCl₂, Invitrogen) complementado com 1,8µl/tubo de MgCl₂ 50mM, 1µl/tubo de dNTPs 10mM e 0,45µl/tubo de Platinum Taq polimerase 200 U/ml e H₂O foi acrescentada para completar o volume final de 30µl/poço. Essa solução foi alíquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos eppendorf, e o cDNA de cada amostra dos diferentes tratamentos descritos acima adicionado

(3,5µl/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (30µl/poço). Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad Laboratories), nas seguintes condições: 7 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

A análise dos dados foi feita pela comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais, ou entre diferentes tempos, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença do valor médio para o gene de interesse e para o RNA 26S. A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene foi expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Nos experimentos temporais, foi considerado controle o valor médio de menor expressão. (PUBMED) TM, colocar o desenho.

Tabela 2: Sequência de bases dos primers utilizados.

RNAm		Seqüência (5'→3')
26S	f	CGATTCCTGACAACCTTGCTATG
	r	CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT
BNP	f	CAGAACAATCCACGATGCAG
	r	CCTTGGTCCTTTGAGAGCTG
Calsequestrina	f	ATAGGCTTTGTGATGGTG
	r	TACCGAGCACAGTGCTGCTT
Fosfolamban	f	TGTGACGATCACAGAAGCC
	r	GCAGCAGACATATCAAGATGAG
<i>Mas</i>	f	ACTGTGCGGGCGGTATCATC
	r	GGTGGAGAAAAGCAAGGAGA
NCX1	f	GTGGAGGTCTGGGAAGAATT
	r	GCTTCCTCGTCATCTTGGTC
SERCA2	f	TCTGTCATTCGGGAGTGGGG
	r	GCCCACACAGCCAACGAAAG

3.10. Análise estatística

As médias e os desvios-padrão referentes aos valores das variáveis estudadas foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Essas análises foram realizadas pelo *software GraphPad Prism 4*. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

4.0. RESULTADOS

4.1. Atividade da citrato sintase

A atividade da citrato sintase foi utilizada como marcador de exercício físico. O treinamento físico aumentou em 92% a atividade máxima da enzima citrato sintase no grupo SHAM EX em relação ao SHAM SED, enquanto nos animais 2R1C EX, esse aumento foi de 97%, conforme valores da tabela 3. A atividade da enzima está representada na figura 12.

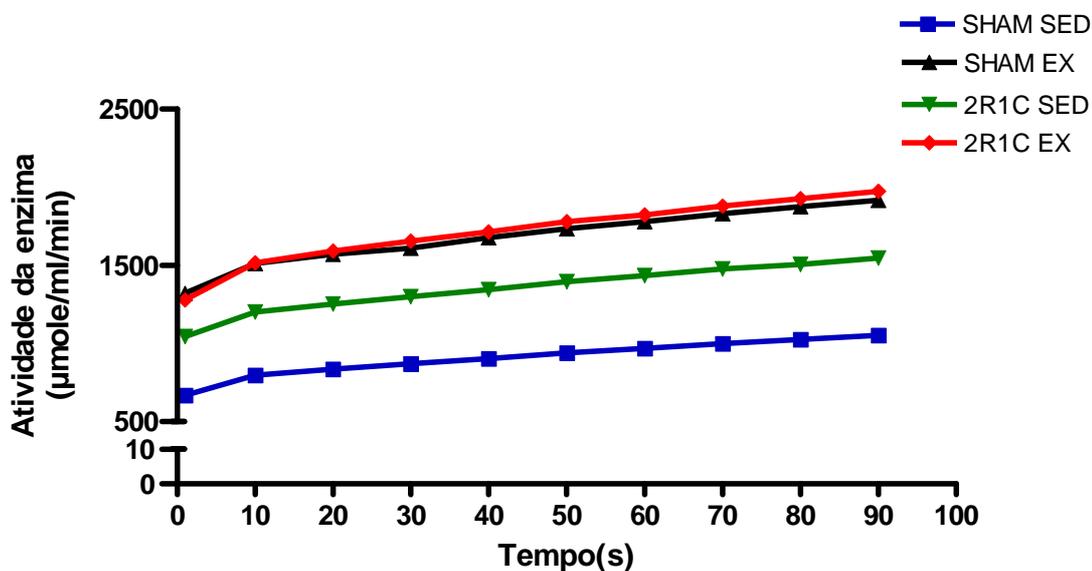


Figura 2: Atividade da enzima citrato sintase durante 90 segundos nos animais SHAM e 2R1C.

Tabela 3: Atividade da enzima citrato sintase nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.

	SHAM		2R1C	
	SED	EX	SED	EX
Atividade da citrato sintase	997,3±98,5	1916±812,6*	1545±708,5	1974±310,6*

Valores expressos em média ± desvio padrão da média. *p<0,05 vs. SHAM SED (ANOVA seguida de Tukey). n= 4.

4.2. Parâmetros da hipertensão renovascular

4.2.1. Níveis basais de PAM e FC

Na figura 3, observa-se que a PAM basal nos ratos 2R1C SED foi maior do que a dos ratos SHAM SED e SHAM EX. Os valores de PAM basal dos ratos 2R1C EX foram menores em relação aos dos ratos hipertensos 2R1C SED. Entre os grupos SHAM SED e SHAM EX não houve diferença significativa.

Os valores basais de FC dos ratos 2R1C SED foram maiores comparados aos dos ratos SHAM SED e SHAM EX. Os animais 2R1C EX apresentaram redução na FC em relação aos animais 2R1C SED (fig. 4).

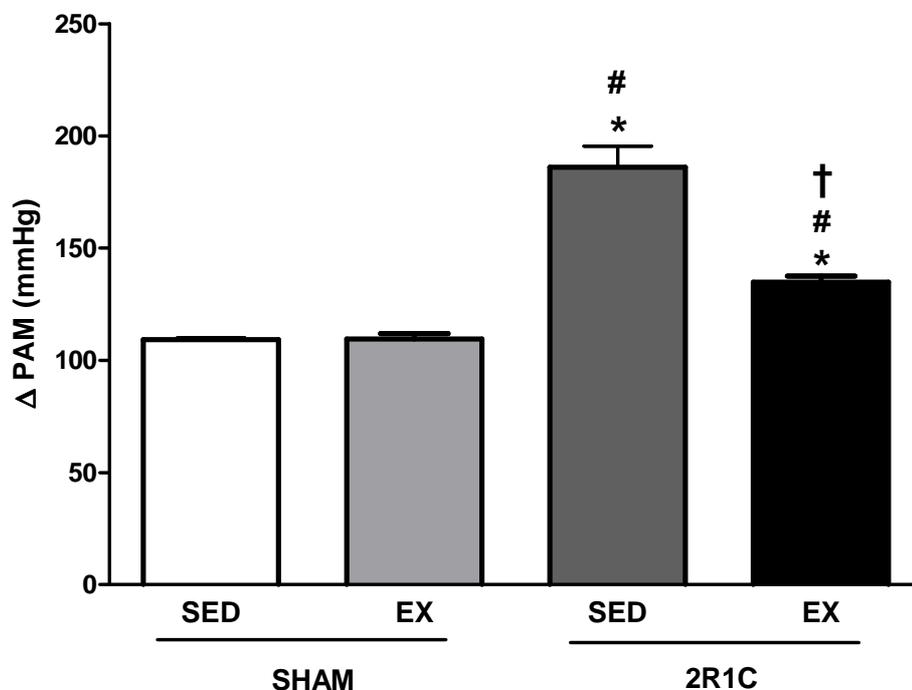


Figura 3: Pressão arterial basal em ratos SHAM e 2R1C.

* $p < 0,005$ vs. SHAM SED. [#] $p < 0,005$ vs. SHAM EX. [†] $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6$ e 6 .

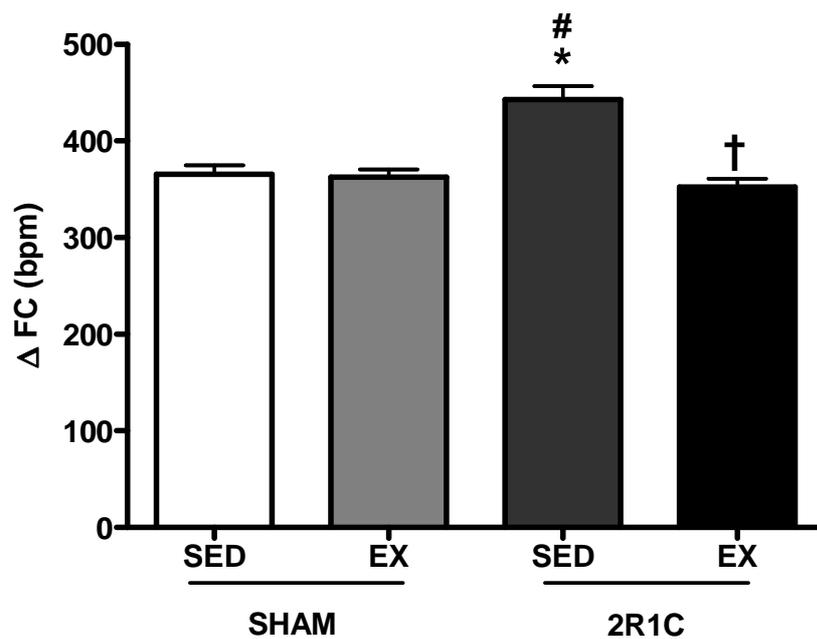


Figura 4: Frequência cardíaca basal em ratos SHAM e 2R1C.

* $p < 0,005$ vs. SHAM SED. # $p < 0,005$ vs. SHAM EX. † $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

4.2.2. Massa seca dos rins

A figura 5 mostra que houve diferença significativa na massa seca relativa do rim esquerdo (clipado) e rim direito dos animais 2R1C SED em relação ao grupo EX, bem como em relação ao grupo SHAM SED.

Os valores de percentual de redução dos animais 2R1C EX foram similares aos dos SHAM EX. Entretanto, os valores de percentual de redução dos animais 2R1C SED foram significativamente maiores do que os valores dos animais SHAM SED (fig. 6).

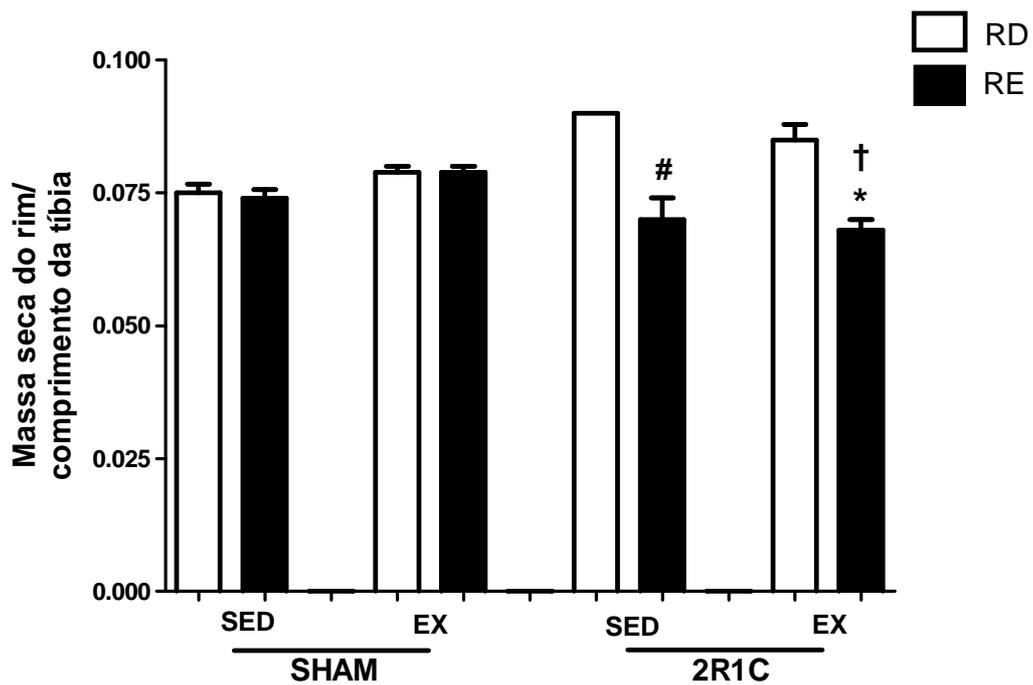


Figura 5: Massa seca do rim relativa ao comprimento da tibia.

* $p < 0,05$ vs. SHAM EX (RE). [#] $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (RD). [†] $p < 0,005$ vs. 2R1C EX (RD) (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$. RE: Rim Esquerdo; RD: Rim Direito.

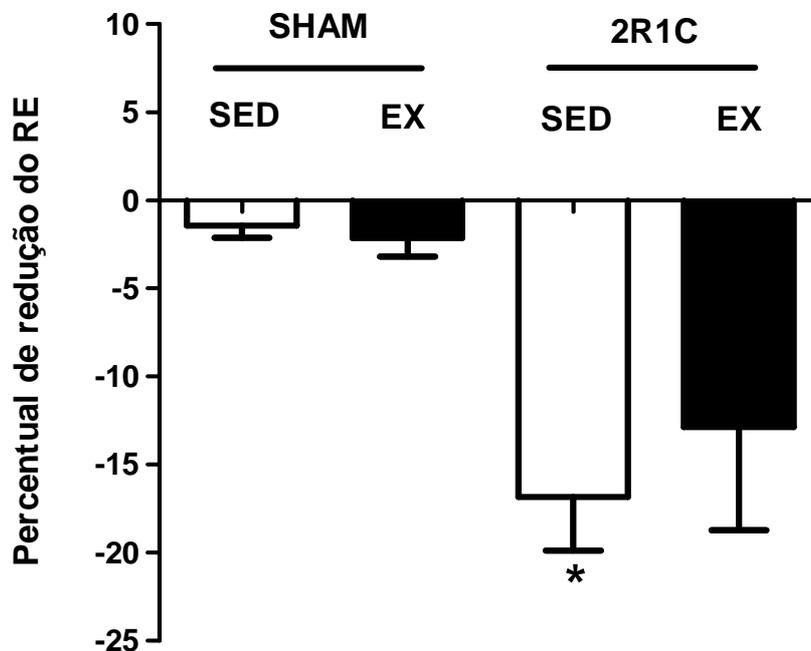


Figura 6: Percentual de redução da massa seca do rim esquerdo relativo ao comprimento da tibia.

* $p < 0,05$ vs. SHAM SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

4.2.3. Massa úmida do coração

A figura 7 e a tabela 2 mostram a relação entre a massa úmida do coração e o comprimento da tibia dos animais 2R1C e SHAM. Os animais SHAM EX apresentaram maiores valores em relação ao grupo SHAM SED. O grupo 2R1C SED apresentou aumento significativo nos valores em relação ao grupo SHAM SED, enquanto os animais 2R1C EX também mostraram maiores valores em relação ao grupo SHAM SED. Entretanto, os valores de massa úmida relativa do coração dos animais 2R1C EX foram semelhantes aos dos animais 2R1C SED.

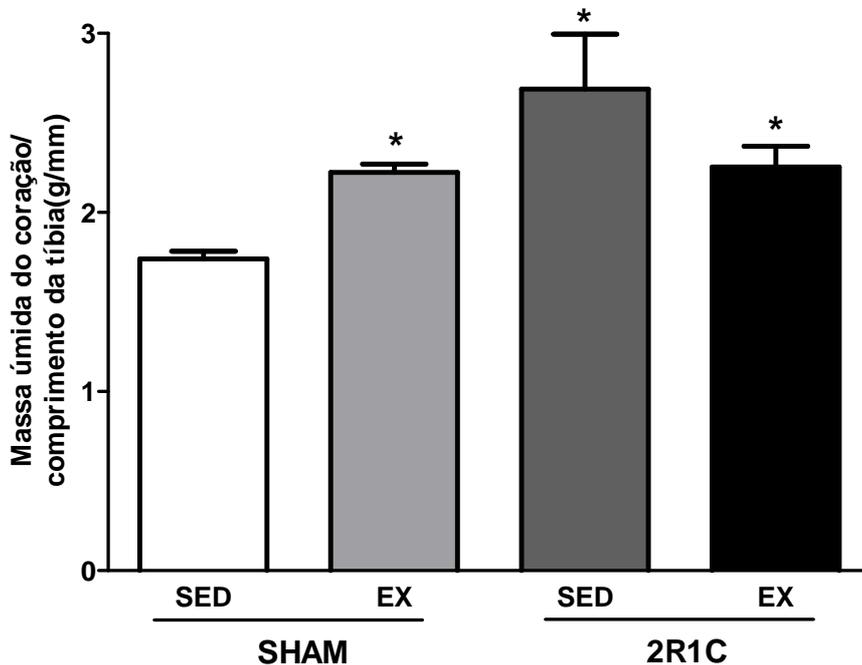


Figura 7: Massa úmida do coração relativa ao comprimento da tibia.

* $p < 0,05$ vs. SHAM SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

4.3. Avaliação histológica do coração

A figura 8 apresenta a área do ventrículo esquerdo e observa-se que não houve diferença entre os quatro grupos experimentais ($p > 0,05$) (SHAM e 2R1C).

A figura 9 mostra os resultados da contagem de células no ventrículo esquerdo de ratos SHAM e 2R1C. Os animais SHAM EX, 2R1C SED, 2R1C EX apresentaram menor número de células em uma mesma área em relação aos animais SHAM SED. Já

os grupos SHAM EX e 2R1C SED tiveram menor número de células em relação aos animais 2R1C EX.

Em relação à espessura, observa-se na figura 10 que os animais SHAM EX apresentaram valores maiores em comparação aos SHAM SED. Em contrapartida, o grupo 2R1C EX apresentou valores diferentes em relação aos demais grupos (SHAM SED, SHAM EX e 2R1C SED) (fig. 10). Na figura 11, observamos fotomicrografias do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais SHAM e 2R1C.

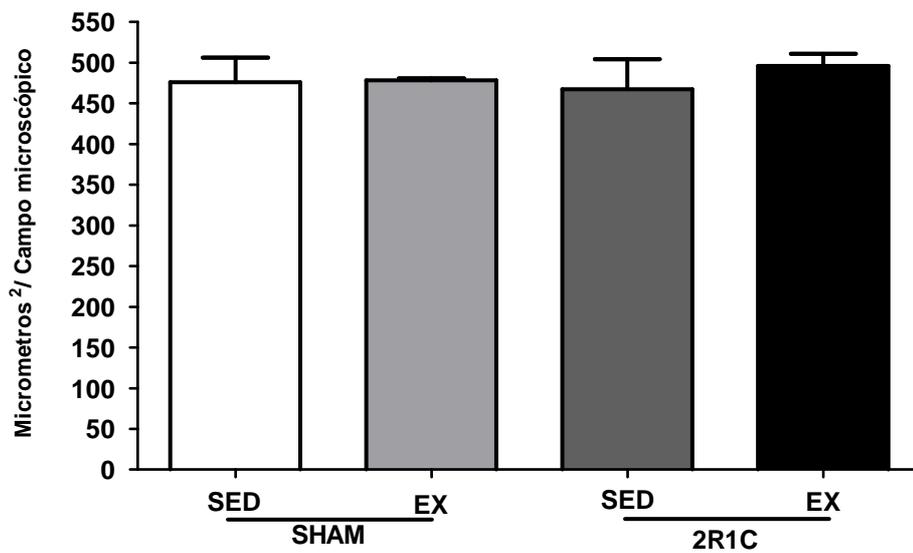


Figura 8: Área total analisada do ventrículo esquerdo nos grupos SHAM e 2R1C. $p > 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

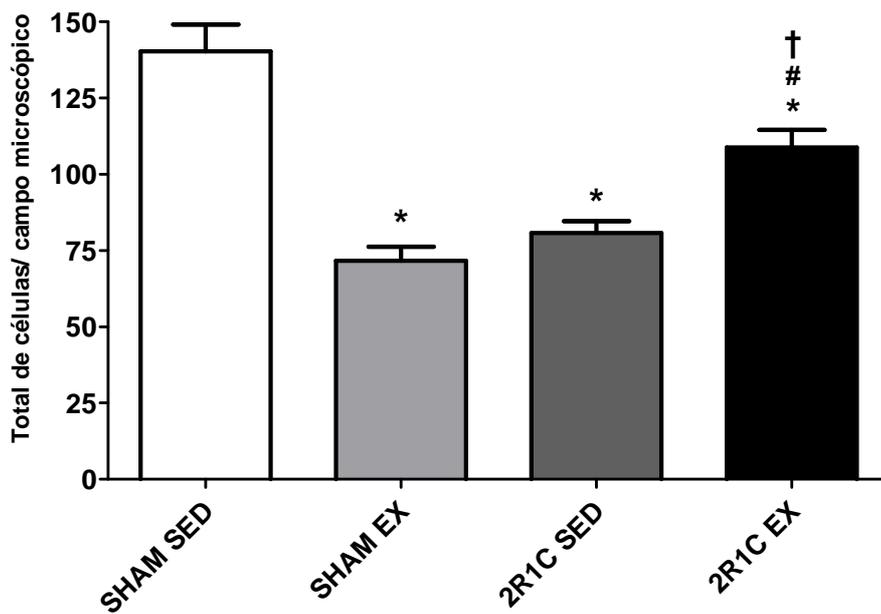


Figura 9: Total de células inflamatórias em uma mesma área do ventrículo esquerdo nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.

* $p < 0,05$ vs. SHAM SED. # $p < 0,01$ vs. SHAM EX. † $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

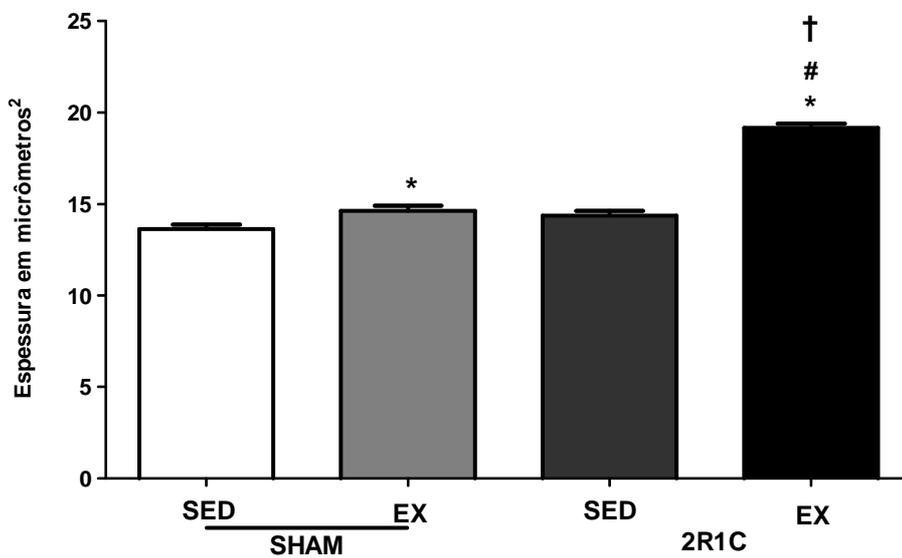


Figura 10: Espessura das fibras cardíacas nos grupos experimentais SHAM e 2R1C. * $p < 0,05$ vs. SHAM SED. # $p < 0,005$ vs. SHAM EX. † $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 10, 9, 6, 6$.

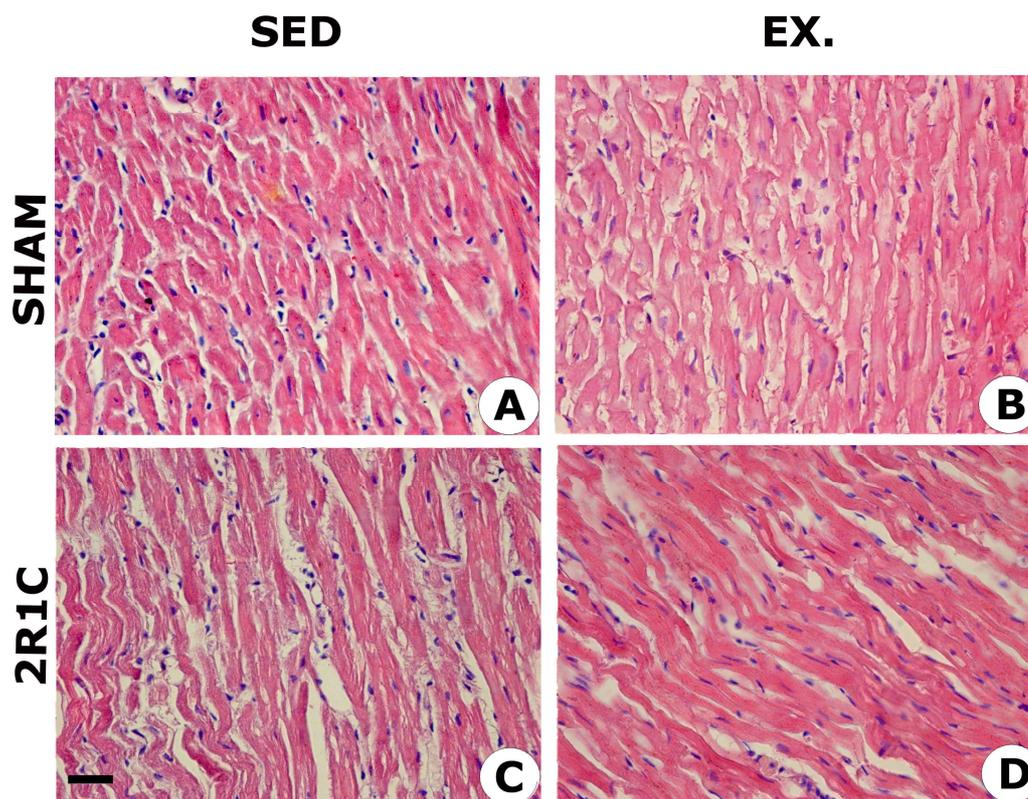


Figura 11: Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos ratos e 2R1C. Hematoxilina Eosina. Barra= 25micrômetros (μm).

4.4. Expressão de RNAm de BNP em cardiomiócitos

Na figura 15, observa-se que em animais 2R1C SED e 2R1C EX houve aumento na expressão de RNAm de BNP, em relação aos animais SHAM SED. Os animais 2R1C EX apresentaram redução na expressão desse marcador em relação aos animais 2R1C SED. Na tabela 4, estão representados os valores das médias e desvios-padrão dos grupos experimentais.

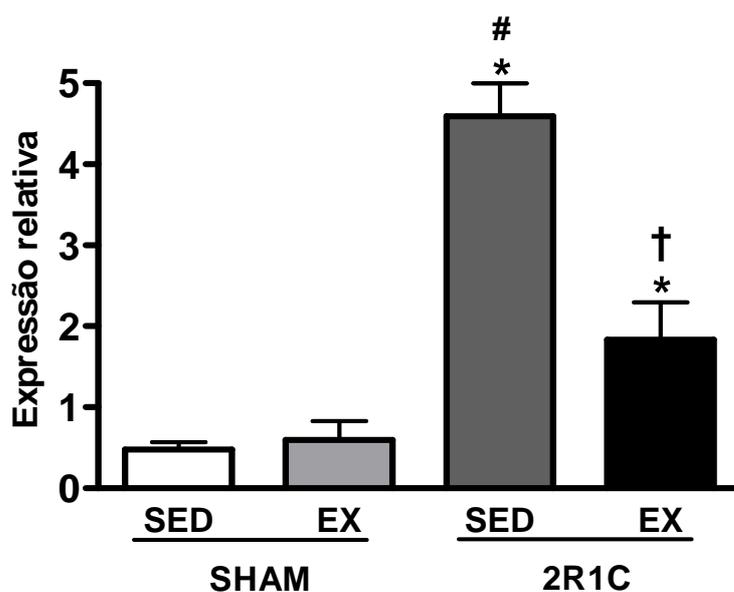


Figura 12: Níveis de expressão relativa de RNAm de BNP nos animais SHAM e 2R1C. * $p < 0,05$ vs. SHAM SED. [#] $p < 0,005$ vs. SHAM EX. [†] $p < 0,005$ vs. 2R1C SED. (ANOVA seguida de Tukey). $n = 6$ para todos os grupos.

Tabela 4: Expressão relativa do *brain natriuretic peptide* nos grupos experimentais.

	SHAM		2R1C	
	SED	EX	SED	EX
Expressão relativa	0,4786±0,1989	0,5924±0,5235	4,595±0,8966 ^{*#}	1,834±1,029 ^{*†}

Valores expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs. SHAM SED. [#] $p < 0,005$ vs. SHAM EX. [†] $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 6$ para todos os grupos.

4.5. Expressão de proteínas envolvidas na mobilização do cálcio no tecido cardíaco

4.5.1. SERCA2a

Na figura 16, observa-se que os níveis de SERCA2a aumentaram em animais SHAM submetidos ao exercício em comparação aos animais SHAM sedentários. Já no grupo 2R1C SED, houve redução na expressão em comparação aos animais SHAM EX.

Os animais 2R1C EX apresentaram aumento na expressão de RNAm da SERCA2a em comparação aos animais SHAM SED e 2R1C SED. A tabela 5 ilustra os valores das médias e desvios-padrão dos grupos SHAM e 2R1C.

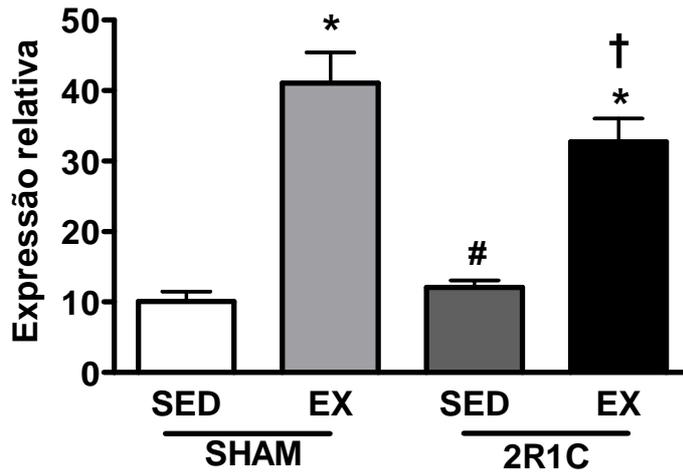


Figura 13: Níveis de expressão relativa de RNAm de SERCA2a nos grupos experimentais SHAM e 2R1C.

*p<0,005 vs. SHAM SED. #p<0,005 vs. SHAM EX. †p<0,005 vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). n= 6 para todos os grupos.

Tabela 5: Expressão relativade RNAm da SERCA2a nos animais SHAM e 2R1C.

	SHAM		2R1C	
	SED	EX	SED	EX
Expressão relativa	10,04±3,170	41,08±9,599*	12,08±2,153 [#]	35,75±6,590 ^{#†}

Valores expressos em média ± desvio padrão da média. *p<0,005 vs. SHAM SED. #p<0,005 vs. SHAM EX. †p<0,005 vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). n= 6 para todos os grupos.

4.5.2. Fosfolamban

De acordo com a figura 17 e a tabela 6, observa-se que o exercício físico foi capaz de aumentar os níveis de expressão da fosfolamban no grupo SHAM em relação aos sedentários. Nos animais hipertensos sedentários houve uma queda em relação ao grupo SHAM EX.

Em contrapartida, no grupo hipertenso submetido ao exercício físico observamos aumento na expressão, em relação aos grupos sedentários (SHAM e 2R1C).

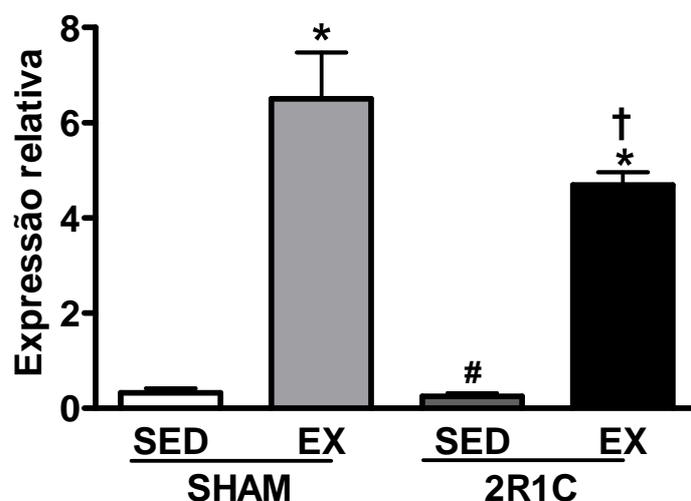


Figura 14: Níveis de expressão relativa de fosfolamban nos animais SHAM e 2R1C.

* $p < 0,005$ vs. SHAM SED. # $p < 0,005$ vs. SHAM EX. † $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 6$ para todos os grupos.

Tabela 6: Expressão relativa da fosfolamban nos grupos experimentais.

	SHAM		2R1C	
	SED	EX	SED	EX
Expressão relativa	0,3214±0,2191	6,504±2,172*	0,2470±0,1598#	4,690±0,6177*†

Valores expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,005$ vs. SHAM SED. # $p < 0,005$ vs. SHAM EX. † $p < 0,005$ vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). $n = 6$ para todos os grupos.

4.5.3. NCX1

Os níveis de expressão de RNAm do NCX1 aumentaram em animais 2R1C SED, em relação ao SHAM (SED e EX). O exercício físico foi capaz de diminuir a expressão dessa proteína no grupo 2R1C em relação aos animais 2R1C SED (figura 18 e tabela 7).

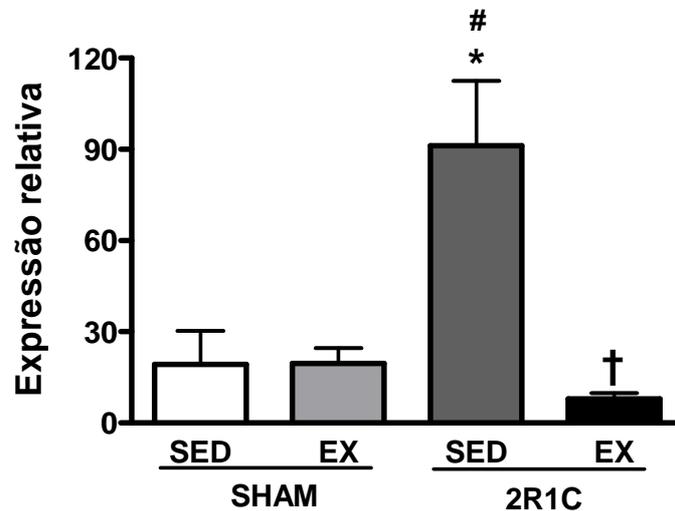


Figura 15: Níveis de expressão relativa de NCX1 nos grupos experimentais SHAM e 2R1C. *p<0,05 vs. SHAM SED. #p<0,05 vs. SHAM EX. †p<0,05 vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). n= 6 para todos os grupos.

Tabela 7: Expressão relativa do NCX1 nos animais SHAM e 2R1C.

	SHAM		2R1C	
	SED	EX	SED	EX
Expressão relativa	19,28±22,02	19,57±10,25	91,19±47,71*#	7,92±3,58†

Valores expressos em média ± desvio padrão da média. *p<0,05 vs. SHAM SED. #p<0,05 vs. SHAM EX. †p<0,05 vs. 2R1C SED (ANOVA seguida de Tukey). n=6 para todos os grupos.

5.0. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, em síntese, mostram que o treinamento em natação melhorou a expressão das proteínas reguladoras de cálcio no tecido cardíaco de animais com hipertensão renovascular 2R1C.

Vários estudos da literatura (Vieira e cols., 1987; Lawler e cols., 1994; Siu e cols., 2003) têm utilizado a atividade da enzima citrato sintase (CS) na adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos para confirmar a eficiência do treinamento em natação. Outros autores também demonstraram que o treinamento físico com natação é eficiente em aumentar a atividade máxima oxidativa muscular (Lancha Junior, 1991; Medeiros e cols., 2000), que é uma adaptação marcante do músculo esquelético ao treinamento físico aeróbico. Pinho e cols. (2006) observaram aumento na atividade desta enzima em ratos submetidos a um protocolo de treinamento em esteira durante 12 semanas. Radák e cols. (1999) também mostraram aumento na CS de ratos após 9 semanas de treinamento em natação. Nossos resultados corroboram com esses achados, nos quais se observou o aumento da atividade da CS em animais submetidos ao exercício físico no grupo SHAM em comparação ao seu respectivo grupo controle.

A hipertensão arterial, patologia clínica multifatorial, é conceituada como uma síndrome caracterizada pela presença de alterações metabólicas, hormonais e hipertrofia cardíaca e vascular. Essas alterações podem influenciar também mecanismos celulares e moleculares, alterando, por exemplo, o comportamento de enzimas, tais como a citrato sintase. Os resultados deste trabalho mostram que em animais 2R1C EX não houve aumento significativo na atividade desta enzima em relação aos animais 2R1C SED. Diante do exposto, acreditamos que o metabolismo de repouso dos animais hipertensos seja mais elevado em relação aos animais normotensos.

Alguns trabalhos reportam que o exercício físico regular reduz os níveis pressóricos em indivíduos com hipertensão arterial (Matsusaki e cols., 1992; Zanettini e cols., 1997). Ainda são escassos os estudos que abordam o efeito do treinamento aeróbico com duração de 6 semanas. Rodrigues e cols. (2007) e Soares e cols. (2011) mostram que o treinamento em natação com duração de 4 semanas promoveu a redução nos níveis de pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Ainda não existem estudos conclusivos sobre os mecanismos pelos quais o exercício físico reduz os níveis de pressão sanguínea. Sherman (2000) defende a teoria de que há uma melhora na função endotelial, através da manutenção do tônus vasomotor e regulação do crescimento vascular; outra teoria defende que o exercício aumenta o estresse nas paredes de vasos (conhecido como *shear stress*), estimulando a produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador (Kalman, 1990; Sherman, 2000). Outros autores (Duncan e cols., 1985, Meredith e cols., 1991) observaram que após a prática de exercício físico ocorre uma menor atividade nervosa simpática, associada com a redução nos níveis de noradrenalina plasmática ou da atividade nervosa simpática periférica.

Reduções na pressão arterial após exercício físico estão relacionadas a uma menor atividade do sistema renina-angiotensina, com reduções nos níveis de renina (Hayashi e cols., 2000), Ang II, aldosterona e vasopressina plasmáticas (Braith e cols., 1999). Acreditamos que a redução observada em nosso estudo, após 6 semanas de treinamento aeróbico, seja de caráter multifatorial, com a participação principal do sistema renina-angiotensina, sofrendo ainda influência do metabolismo oxidativo periférico.

A bradicardia de repouso em resposta ao treinamento ocorre tanto em humanos (Sandercock e cols., 2005) quanto em animais (Medeiros e cols., 2004; Evangelista e cols., 2005). No presente também se observou a redução nos valores da frequência cardíaca em repouso nos animais 2R1C, submetidos ao exercício, que pode estar associada ao aumento da atividade parassimpática (Robergs e Roberts, 1996; Medeiros e cols., 2004).

Nossos resultados de hipertrofia corroboram com Medeiros e cols. (2004), que observaram aumento na massa do ventrículo esquerdo de animais submetidos a um protocolo de natação com duração de 60 min/dia, durante 8 semanas, assim como Evangelista e cols. (2003), que encontraram hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos submetidos a um protocolo de natação com duração de 6 semanas. O sistema renina-angiotensina é capaz de alterar o padrão de hipertrofia cardíaca. Em um estudo com animais SHR, o treinamento de natação promoveu a diminuição da concentração de Ang II plasmática, embora sua concentração não tenha se alterado no tecido cardíaco (Filho e Ferreira, 2008). Já os níveis de Ang(1-7), que tem importante

papel na regulação do sistema cardiovascular (McDowell e cols., 2004; Kyoji e cols., 2006), se elevaram no coração, enquanto sua concentração plasmática não foi alterada.

Shyu e cols. (1995) mostraram que o estiramento cíclico de cardiomiócitos “in vitro”, aumenta a expressão gênica do angiotensinogênio. Além disso, o aumento no ventrículo após coartação da aorta foi completamente abolido por inibidor da enzima conversora de angiotensinogênio (Baker e cols., 1990). Considerando que em nosso modelo experimental de hipertensão arterial 2R1C ocorre hiperatividade do SRA, pode-se especular que haja alguns fatores e/ou interações entre este tipo de hipertensão e o treinamento em natação, porém mais estudos ainda são necessários para elucidar essas possíveis interações.

Já está bem estabelecido que o exercício físico seja capaz de aumentar a expressão das proteínas reguladoras de cálcio. Neste estudo, os níveis de RNAm de SERCA2 aumentaram nos grupos submetidos ao treinamento em natação. Em animais 2R1C EX houve normalização dos níveis de expressão de RNAm do NCX1, em relação aos animais SHAM. Lu e cols. (2002) observaram que o exercício foi capaz de normalizar a expressão do RNAm de SERCA2 e do NCX1 em cães que foram submetidos a um protocolo de corrida durante 4 semanas, em relação aos animais sedentários (controle).

Em um estudo com camundongos que apresentavam insuficiência cardíaca induzida pela hiperatividade simpática foi observado que os níveis de RNAm de SERCA2a se elevaram, enquanto os níveis do NCX1 foram restaurados, em comparação aos animais sedentários, após 8 semanas de treinamento em esteira (Rolim e cols., 2007). Em outro trabalho utilizando o mesmo modelo de insuficiência, Medeiros e cols. (2008) observaram aumento na expressão da SERCA2a, com um protocolo de natação de mesma intensidade e duração.

Outros trabalhos também relataram o aumento na expressão da SERCA2. Buttrick e cols. (1994) reportaram aumento dos níveis dessa proteína no coração de animais submetidos a um protocolo de 6 semanas de natação e normalização dos níveis em relação aos sedentários, em animais com hipertensão renovascular. Em outro estudo, o treinamento em esteira também promoveu o aumento nos níveis de expressão desta proteína (Tate e cols., 1996).

Wisloff e colaboradores (2001) utilizando dois protocolos de exercício em esteira com duração de 4 e 13 semanas mostraram que o treinamento foi capaz de induzir a melhora na função contrátil de cardiomiócitos, com aumento na expressão da SERCA2. Bupha-Intr e cols. (2009) observaram que em 9 semanas de treinamento em esteira com ratas ovariectomizadas, houve normalização na atividade da SERCA2 no coração em relação ao grupo SHAM. Em outro trabalho utilizando um protocolo de esteira de 12 semanas, também foi relatado aumento nos níveis de expressão da SERCA2 no coração dos animais exercitados (Jiao e cols., 2009).

Sabe-se que a hipertensão arterial leva ao comprometimento da função cardíaca (Mostarda e cols., 2011; Shah e cols., 2011), devido ao aumento do conteúdo de colágeno e células inflamatórias no tecido cardíaco, disfunção ventricular e do barorreflexo, dentre outras alterações. O aumento nos níveis de RNAm de NCX1 no grupo 2R1C SED em comparação à redução nos níveis de RNAm da SERCA2a pode representar um mecanismo compensatório na retirada de cálcio do citoplasma.

Em nosso estudo observamos que o treinamento em natação aumentou os níveis de RNAm da SERCAa tanto em animais SHAM quanto em 2R1C. Em contrapartida, em animais 2R1C EX, ocorreu a normalização nos níveis de NCX1. Diante disso, podemos considerar que o treinamento favorece a recaptação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático, prevenindo a saída deste íon através do sarcolema, a qual poderia levar a um desequilíbrio no potencial de ação da célula.

No presente trabalho, houve aumento nos níveis de expressão de RNAm da fosfolamban, em animais exercitados. Alguns estudos da literatura (Collins e cols., 2005; Sugizaki e cols., 2011) mostram que o exercício promove normalização/ aumento nos níveis de expressão e atividade dessa proteína, além de promover aumento em suas formas fosforiladas. Wisloff e cols. (2001) detectaram aumento na expressão de fosfolamban em corações de ratos submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira, 2 horas por dia, durante 5 dias por semana.

Medeiros e cols. (2008) relataram aumento na fosforilação da fosfolamban no resíduo de Ser¹⁶ em camundongos submetidos a um protocolo de esteira com duração de 8 semanas, que apresentavam insuficiência cardíaca induzida pela hiperatividade simpática. Nesse mesmo trabalho, não houve diferença na fosforilação no resíduo de

Thr¹⁷. Já Rolim e cols. (2007), utilizando o mesmo protocolo de treinamento, observaram aumentos significativos na fosforilação nos resíduos de Ser¹⁶ e Thr¹⁷.

Nossos dados do presente estudo sugerem que os mecanismos envolvidos na melhora da função ventricular incluem a prevenção de anormalidades relacionadas com a regulação do Ca²⁺, pela alteração na expressão das proteínas ligadas a liberação e recaptção deste íon no retículo sarcoplasmático. Ainda não se sabe de que forma o exercício pode interferir nas vias celulares envolvidas nessa resposta, porém, acredita-se que haja uma relação entre o sistema renina-angiotensina e esses mecanismos. Mais investigações devem ser feitas, a fim de elucidar essas vias e possíveis respostas do coração ao treinamento aeróbico em animais com hipertensão renovascular.

6.0. CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados do presente estudo mostraram:

- O treinamento em natação promoveu a redução nos níveis basais de pressão arterial e frequência cardíaca em animais com hipertensão renovascular.
- O treinamento aeróbico promoveu a adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos SHAM, conforme avaliação da atividade da enzima citrato sintase.
- O exercício físico promoveu hipertrofia cardíaca tanto em animais SHAM quanto em animais 2R1C.
- Os animais 2R1C SED apresentaram maiores níveis de expressão do BNP. Entretanto, o exercício promoveu a redução significativa destes níveis neste grupo.
- Os níveis de RNAm de SERCA2a e fosfolamban se apresentaram significativamente maiores no grupo 2R1C EX, em relação aos animais 2R1C SED.
- A expressão de RNAm do NCX1 foi maior no grupo 2R1C SED, enquanto que no grupo 2R1C EX houve redução significativa desses níveis, tanto em relação aos animais SHAM (SED e EX), quanto aos 2R1C SED.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1991 guidelines for the prevention of hypertension and associated cardiovascular disease. Joint World Health Organization/International Society of Hypertension Meeting. J Hypertens, v.10, n.1, Jan, p.97-9. 1992.

American College of Sports Medicine. Position Stand. Physical activity, physical fitness, and hypertension. Med Sci Sports Exerc, v.25, n.10, Oct, p.i-x. 1993.

Ahern, G. P., P. R. Junankar, *et al.* Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. FEBS Lett, v.352, n.3, Oct 3, p.369-74. 1994.

Allen, P. B., C. C. Ouimet, *et al.* Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.18, Sep 2, p.9956-61. 1997.

Anversa, P., A. Leri, *et al.* Myocyte growth and cardiac repair. J Mol Cell Cardiol, v.34, n.2, Feb, p.91-105. 2002.

Anversa, P., R. Ricci, *et al.* Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. J Am Coll Cardiol, v.7, n.5, May, p.1140-9. 1986.

Armstrong, N. Young People's physical activity patterns has assessed by heart rate monitoring. Journal of Sport Sciences, v.16, p.S9-S16. 1998.

Baker, K.M., M.I. Cherin, *et al.* Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. Am J Physiol. v.259, p. h324-h332, 1990.

- Balshaw, D. M., L. Xu, *et al.* Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). J Biol Chem, v.276, n.23, Jun 8, p.20144-53. 2001.
- Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205. 2002.
- Bers, D. M. e S. Despa. Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts. J Pharmacol Sci, v.100, n.5, p.315-22. 2006.
- Bhupathy, P., G. J. Babu, *et al.* Sarcoplipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. J Mol Cell Cardiol, v.42, n.5, May, p.903-11. 2007.
- Bouchard, C., R. Shephard, *et al.* Physical Activity. Fitness and Health – consensus statement. Human Kinetics, Champaign, Illinois.1993.
- Bowman, J. C., S. F. Steinberg, *et al.* Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. J Clin Invest, v.100, n.9, Nov 1, p.2189-95. 1997.
- Braith, R. W., M. A. Welsch, *et al.* Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. J Am Coll Cardiol, v.34, n.4, Oct, p.1170-5. 1999.
- Brette, F. e C. Orchard. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. Circ Res, v.92, n.11, Jun 13, p.1182-92. 2003.
- Brillantes, A. B., K. Ondrias, *et al.* Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, v.77, n.4, May 20, p.513-23. 1994.

Britto, R. R., R. A. Santos, *et al.* Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. Hypertension, v.30, n.3 Pt 2, Sep, p.549-56. 1997.

Brittsan, A. G. e E. G. Kranias. Phospholamban and cardiac contractile function. J Mol Cell Cardiol, v.32, n.12, Dec, p.2131-9. 2000.

Brown, J. J., J. Casals-Stenzel, *et al.* Angiotensin II, aldosterone and arterial pressure: a quantitative approach. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. Hypertension, v.1, n.3, May-Jun, p.159-79. 1979.

Brum, P. C., G. J. Da Silva, *et al.* Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. Hypertension, v.36, n.6, Dec, p.1018-22. 2000.

Bupha-Intr, T., J. Laosiripisan, *et al.* Moderate intensity of regular exercise improves cardiac SR Ca²⁺ uptake activity in ovariectomized rats. J Appl Physiol, v.107, n.4, Oct, p.1105-12. 2009.

Buttrick, P. M., M. Kaplan, *et al.* Alterations in gene expression in the rat heart after chronic pathological and physiological loads. J Mol Cell Cardiol, v.26, n.1, Jan, p.61-7. 1994.

Carr, A. N., A. G. Schmidt, *et al.* Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. Mol Cell Biol, v.22, n.12, Jun, p.4124-35. 2002.

Carter, S., J. Colyer, *et al.* Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation. Circ Res, v.98, n.12, Jun 23, p.1506-13. 2006.

Caspersen, C. J., K. E. Powell, *et al.* Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. Public Health Rep, v.100, n.2, Mar-Apr, p.126-31. 1985.

Ceci, M., J. Ross, Jr., *et al.* Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT. J Mol Cell Cardiol, v.37, n.5, Nov, p.905-12. 2004.

Cheng, H., W. J. Lederer, *et al.* Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. Science, v.262, n.5134, Oct 29, p.740-4. 1993.

Chen-Izu, Y., S. L. Mcculle, *et al.* Three-dimensional distribution of ryanodine receptor clusters in cardiac myocytes. Biophys J, v.91, n.1, Jul 1, p.1-13. 2006.

Chen-Izu, Y., R. P. Xiao, *et al.* G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca²⁺ channels. Biophys J, v.79, n.5, Nov, p.2547-56. 2000.

Collis, L. P., M. B. Meyers, *et al.* Expression of a sorcin missense mutation in the heart modulates excitation-contraction coupling. Faseb J, v.21, n.2, Feb, p.475-87. 2007.

Cook, S. A., P. H. Sugden, *et al.* Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.8, Aug, p.1429-34. 1999.

Cooper, G. T. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. Annu Rev Physiol, v.49, p.501-18. 1987.

Cornelissen, V. A. e R. H. Fagard. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. Hypertension, v.46, n.4, Oct, p.667-75. 2005.

Davidson, S. R. Passmore, *et al.* Human nutrition and dietetics. Churchill Livingstone, New York, ed. 7. 1979.

Debosch, B., I. Treskov, *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. Circulation, v.113, n.17, May 2, p.2097-104. 2006.

Delprincipe, F., M. Egger, *et al.* L-type Ca^{2+} current as the predominant pathway of Ca^{2+} entry during I(Na) activation in beta-stimulated cardiac myocytes. J Physiol, v.527 Pt 3, Sep 15, p.455-66. 2000.

Di Bello, V., R. Pedrinelli, *et al.* Ultrasonic videodensitometric analysis of two different models of left ventricular hypertrophy. Athlete's heart and hypertension. Hypertension, v.29, n.4, Apr, p.937-44. 1997.

Dias-Peixoto, M. F., R. A. Santos, *et al.* Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. Hypertension, v.52, n.3, Sep, p.542-8. 2008.

Diretrizes Brasileiras De Hipertensão Arterial, V. Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006.

Dorn, G. W., 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. Hypertension, v.49, n.5, May, p.962-70. 2007.

Dubell, W. H., M. S. Gigena, *et al.* Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.282, n.1, Jan, p.H38-48. 2002.

Duncan, J.J., J.E. Farr, *et al.* The effect of aerobic exercise on plasma catecholamine and blood pressure in patients with mild essential hypertension. Jama., 1985.

Edes, I. e E. G. Kranias. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. Circ Res, v.67, n.2, Aug, p.394-400. 1990.

Emter, C. A., S. A. Mccune, *et al.* Low-intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.5, Nov, p.H2030-8. 2005.

Evangelista, F. S., P. C. Brum, *et al.* Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Braz J Med Biol Res, v.36, n.12, Dec, p.1751-9. 2003.

Evangelista, F. S., S. E. Martuchi, *et al.* Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. Braz J Med Biol Res, v.38, n.7, Jul, p.1141-6. 2005.

Fagard, R. H. Exercise characteristics and the blood pressure response to dynamic physical training. Med Sci Sports Exerc, v.33, n.6 Suppl, Jun, p.S484-92; discussion S493-4. 2001.

Fatt, P. e B. Katz. The electrical properties of crustacean muscle fibres. J Physiol, v.120, n.1-2, Apr 28, p.171-204. 1953.

Filho, A. G., A. J. Ferreira, *et al.* Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. Exp Physiol, v.93, n.5, May, p.589-98. 2008.

Frank, K. F., B. Bolck, *et al.* Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. Cardiovasc Res, v.57, n.1, Jan, p.20-7. 2003.

Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, *et al.* Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. Biophys J, v.77, n.3, Sep, p.1528-39. 1999.

Frey, N. e E. N. Olson. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. Annu Rev Physiol, v.65, p.45-79. 2003.

Fruen, B. R., J. M. Bardy, *et al.* Differential Ca²⁺ sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. Am J Physiol Cell Physiol, v.279, n.3, Sep, p.C724-33. 2000.

Geenen, D. L., A. Malhotra, *et al.* Angiotensin receptor 1 blockade does not prevent physiological cardiac hypertrophy in the adult rat. J Appl Physiol, v.81, n.2, Aug, p.816-21. 1996.

Godfrey, R. J., Z. Madgwick, *et al.* The exercise-induced growth hormone response in athletes. Sports Med, v.33, n.8, p.599-613. 2003.

Goldblatt, H., J. Lynch, *et al.* Studies on Experimental Hypertension : I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. J Exp Med, v.59, n.3, Feb 28, p.347-79. 1934.

Gomez, A. M., H. H. Valdivia, *et al.* Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. Science, v.276, n.5313, May 2, p.800-6. 1997.

Gordon, A. M., E. Homsher, *et al.* Regulation of contraction in striated muscle. Physiol Rev, v.80, n.2, Apr, p.853-924. 2000.

Gyorke, S. e D. Terentyev. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. Cardiovasc Res, v.77, n.2, Jan 15, p.245-55. 2008.

Hagberg, J. M., S. J. Montain, *et al.* Effect of exercise training in 60- to 69-year-old persons with essential hypertension. Am J Cardiol, v.64, n.5, Aug 1, p.348-53. 1989.

Hagiwara, S., S. Ozawa, *et al.* Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. J Gen Physiol, v.65, n.5, May, p.617-44. 1975.

Hain, J., S. Nath, *et al.* Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. Biophys J, v.67, n.5, Nov, p.1823-33. 1994.

Hayashi, A., A. Kobayashi, *et al.* Effects of voluntary running exercise on blood pressure and renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), v.46, n.4, Aug, p.165-70. 2000.

Hunt, D. J., P. P. Jones, *et al.* K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca²⁺ release and [3H]ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association. Biochem J, v.404, n.3, Jun 15, p.431-8. 2007.

Hussain, M. e C. H. Orchard. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, L-type Ca²⁺ current and the Ca²⁺ transient in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. J Physiol, v.505 (Pt 2), Dec 1, p.385-402. 1997.

Inoue, M. e J. H. Bridge. Variability in couplon size in rabbit ventricular myocytes. Biophys J, v.89, n.5, Nov, p.3102-10. 2005.

Iso, T., M. Arai, *et al.* Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. Am J Physiol, v.273, n.1 Pt 2, Jul, p.H113-8. 1997.

Iwata, M., R. T. Cowling, *et al.* Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.6, Dec, p.H2356-63. 2005.

Kaftan, E., A. R. Marks, *et al.* Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. Circ Res, v.78, n.6, Jun, p.990-7. 1996.

Kalman, J. M. Nitrate tolerance: a new look at an old problem. Focus Crit Care, v. 17, n. 5, p. 407-9. 1990.

Kamp, T. J. e J. W. Hell. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. Circ Res, v.87, n.12, Dec 8, p.1095-102. 2000.

Kapiloff, M. S., N. Jackson, *et al.* mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. J Cell Sci, v.114, n.Pt 17, Sep, p.3167-76. 2001.

Kaplan, M. L., Y. Cheslow, *et al.* Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. Am J Physiol, v.267, n.3 Pt 2, Sep, p.H1167-73. 1994.

Karczewski, P., M. Kuschel, *et al.* Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum. Basic Res Cardiol, v.92 Suppl 1, p.37-43. 1997.

Kemi, O. J., M. Ceci, *et al.* Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. J Cell Physiol, v.214, n.2, Feb, p.316-21. 2008.

Kingwell, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. Faseb J, v.14, n.12, Sep, p.1685-96. 2000.

Krieger, E. M., P. C. Brum, *et al.* Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. Biol Res, v.31, n.3, p.273-9. 1998.

Kojima, M. N. Minamino, *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain matriuretic peptide. Biochem Biophys Res Commun, v.159, p.1420-6, 1989.

Krinski, K., H. M. Elsangedy, *et al.* Efeitos do exercício físico em indivíduos portadores de diabetes e hipertensão arterial sistêmica. EFDeportes.com, Buenos Aires. Disponível em <http://www.efdeportes.com>, v. 10, n. 93. 2006. Acesso em 15/06/2011.

Kubalova, Z., D. Terentyev, *et al.* Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.39, Sep 27, p.14104-9. 2005.

Kuru, O., U. K. Senturk, *et al.* Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. Eur J Appl Physiol, v.87, n.2, Jun, p.134-40. 2002.

Kuschel, M., P. Karczewski, *et al.* Ser¹⁶ prevails over Thr¹⁷ phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. Am J Physiol, v.276, n.5 Pt 2, May, p.H1625-33. 1999.

Kyoi, S., H. Otani, *et al.* Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. Cardiovasc Res, v.69, n.4, Mar 1, p.888-98. 2006.

Lalli, J., J. M. Harrer, *et al.* Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle. Circ Res, v.80, n.4, Apr, p.506-13. 1997.

Lancha Junior, A. H. Resistência ao esforço físico: efeito da suplementação nutricional de carnitina, aspartato e asparagina. Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1991.

Latronico, M. V., S. Costinean, *et al.* Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. Ann N Y Acad Sci, v.1015, May, p.250-60. 2004.

Lattanzi, F., V. Di Bello, *et al.* Normal ultrasonic myocardial reflectivity in athletes with increased left ventricular mass. A tissue characterization study. Circulation, v.85, n.5, May, p.1828-34. 1992.

Lauschke, J. e B. Maisch. Athlete's heart or hypertrophic cardiomyopathy? Clin Res Cardiol, v.98, n.2, Feb, p.80-8. 2009.

Layland, J., R. J. Solaro, *et al.* Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. Cardiovasc Res, v.66, n.1, Apr 1, p.12-21. 2005.

Lawler, J. M., S. K. Powers, *et al.* Metabolic and antioxidant enzyme activities in the diaphragm: effect of acute exercise. Respir Physiol, v.96, p.139-49, 1994.

Lee, Y. I., J. Y. Cho, *et al.* Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. Eur J Appl Physiol, v.97, n.2, May, p.216-24. 2006.

Lopes, H. F., J. A. S. Barreto-Filho, *et al.* Tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo, São Paulo, v.13, n.1, p. 148-155. 2003.

Lu, L., D. F. Mei, *et al.* Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. J Appl Physiol, v.92, n.4, Apr, p.1524-30. 2002.

Macdougall, L. K., L. R. Jones, *et al.* Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. Eur J Biochem, v.196, n.3, Mar 28, p.725-34. 1991.

Maclennan, D. H., M. Asahi, *et al.* The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. Ann N Y Acad Sci, v.986, Apr, p.472-80. 2003.

Maclennan, D. H. e E. G. Kranias. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol, v.4, n.7, Jul, p.566-77. 2003.

Maclennan, D. H. e P. T. Wong. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A, v.68, n.6, Jun, p.1231-5. 1971.

Magyar, J., A. Jenes, *et al.* Long Term Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channel by Small G Proteins. Curr Med Chem, Jul 21.

Marcus, K. D. e C. M. Tipton. Exercise training and its effects with renal hypertensive rats. J Appl Physiol, v.59, n.5, Nov, p.1410-5. 1985.

Marx, S. O., S. Reiken, *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. J Cell Biol, v.153, n.4, May 14, p.699-708. 2001.

_____. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, v.101, n.4, May 12, p.365-76. 2000.

Matsubara, B. B., Matsubara, L. S. Mecanismos de hipertrofia e fibrose na hipertensão arterial sistêmica. Hipertensão Arterial, v. 13. n. 1. 2003.

Matsusaki, M., M. Ikeda, *et al.* Influence of workload on the antihypertensive effect of exercise. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.19, n.7, Jul, p.471-9. 1992.

Mattiazzi, A., C. Mundina-Weilenmann, *et al.* Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. Cardiovasc Res, v.68, n.3, Dec 1, p.366-75. 2005.

Mcdowell, S. A., E. Mccall, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase regulates excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.286, n.2, Feb, p.H796-805. 2004.

Mcmullen, J. R., F. Amirahmadi, *et al.* Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.2, Jan 9, p.612-7. 2007.

Mcmullen, J. R. e G. L. Jennings. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.34, n.4, Apr, p.255-62. 2007.

Mcmullen, J. R., T. Shioi, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.21, Oct 14, p.12355-60. 2003.

Medeiros, A., R. M. Gianolla, *et al.* Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. Rev. Paul. Educ. Fís., São Paulo, v.14, n.1, p.7-15, Jan./Jun. 2000.

Medeiros, A., N. P. Rolim, *et al.* Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. J Appl Physiol, v.104, n.1, Jan, p.103-9. 2008.

Medeiros, A., E. M. Oliveira, *et al.* Swimming training increases cardiac vagal effect and induces cardiac hypertrophy in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto. 2004.

Meissner, G. Regulation of mammalian ryanodine receptors. Front Biosci, v.7, Nov 1, p.d2072-80. 2002.

Meredith, I.T., P. Friberg, *et al.* Exercise training lowers resting renal but not cardiac sympathetic activity in humans. Hypertension, v.18, p. 558-582, 1991.

Meyers, M. B., V. M. Pickel, *et al.* Association of sorcin with the cardiac ryanodine receptor. J Biol Chem, v.270, n.44, Nov 3, p.26411-8. 1995.

Mockel, M. e Stork, T. Diastolic dysfunction in various forms of left ventricular hypertrophy: contribution of active Doppler stress echo. Int J Sports Med, v. 17, n. 3, p. S184-90. 1996.

Montoye, H., H. Kemper, *et al.* Measuring Physical Activity and Energy Expenditure. Human Kinetics. Champaign, Illinois. 1996.

Moraes-Silva, I. C., R. N. De La Fuente, *et al.* Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.37, n.3, Mar, p.e114-20.

Morton, J. J. e E. C. Wallace. The importance of the renin-angiotensin system in the development and maintenance of hypertension in the two-kidney one-clip hypertensive rat. Clin Sci (Lond), v.64, n.4, Apr, p.359-70. 1983.

Mostarda, C., I. C. Moraes-Silva, *et al.* Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. J Card Fail, v.17, n.6, Jun, p.519-25, 2011.

Mukoyama, M., K. Nakao, *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans – evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. J Clin Invest, v.87, p.1402-12, 1991.

Nag, A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. Cytobios, v.28, n.109, p.41-61. 1980.

Napolitano, R., L. Vittone, *et al.* Phosphorylation of phospholamban in the intact heart. A study on the physiological role of the Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase system. J Mol Cell Cardiol, v.24, n.4, Apr, p.387-96. 1992.

Navar, L. G., L. Zou, *et al.* Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. News Physiol Sci, v.13, Aug, p.170-176. 1998.

Ogawa, Y., K. Nakao, *et al.* Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats – the ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. Cir Res, v.69, p.491-500, 1991.

Orchard, C. e F. Brette. T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. Cardiovasc Res, v.77, n.2, Jan 15, p.237-44. 2008.

Oscai, L. B., P. A. Mole, *et al.* Cardiac growth and respiratory enzyme levels in male rats subjected to a running program. Am J Physiol, v.220, n.5, May, p.1238-41. 1971.

Otsu, K., H. F. Willard, *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem, v.265, n.23, Aug 15, p.13472-83. 1990.

Pinho, R., P. C. L. Silveira, *et al.* Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. Rev Bras Med Esporte, v.12, n.2, Mar/Abr, p.81-84. 2006.

Ploth, D. W. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. Am J Physiol, v.245, n.2, Aug, p.F131-41. 1983.

Qin, J., G. Valle, *et al.* Luminal Ca²⁺ regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. J Gen Physiol, v.131, n.4, Apr, p.325-34. 2008.

Raskoff, W. J., S. Goldman, *et al.* The "athletic heart". Prevalence and physiological significance of left ventricular enlargement in distance runners. Jama, v.236, n.2, Jul 12, p.158-62. 1976.

Ray, C. A. Sympathetic adaptations to one-legged training. J Appl Physiol, v.86, n.5, May, p.1583-7. 1999.

Reboredo Mde, M., D. M. Henrique, *et al.* Exercise training during hemodialysis reduces blood pressure and increases physical functioning and quality of life. Artif Organs, v.34, n.7, Jul, p.586-93.

Richard, S., E. Perrier, *et al.* 'Ca²⁺-induced Ca²⁺ entry' or how the L-type Ca²⁺ channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. Prog Biophys Mol Biol, v.90, n.1-3, Jan-Apr, p.118-35. 2006.

Richey, P. A. e S. P. Brown. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. J Sports Sci, v.16, n.2, Feb, p.129-41. 1998.

Robergs, S. O. e Roberts R. A. Exercise Physiology: exercise, performance and clinical applications. Mosby. 1996.

Rodrigues, M. C., M. J. Campagnole-Santos, *et al.* Evidence for a role of AT2 receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats. Peptides, v.28, n.7, Jul, p.1375-82. 2007.

Rodriguez, P., M. S. Bhogal, *et al.* Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. J Biol Chem, v.278, n.40, Oct 3, p.38593-600. 2003.

Rolim, N. P., A. Medeiros, *et al.* Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. Physiol Genomics, v.29, n.3, May 11, p.246-52. 2007.

Rovetti, R., X. Cui, *et al.* Spark-induced sparks as a mechanism of intracellular calcium alternans in cardiac myocytes. Circ Res, v.106, n.10, May 28, p.1582-91, 2010.

Sandercock, G. R., P. D. Bromley, *et al.* Effects of exercise on heart rate variability: inferences from meta-analysis. Med Sci Sports Exerc, v.37, n.3, Mar, p.433-9. 2005.

Santana, L. F., E. G. Chase, *et al.* Functional coupling of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes. J Physiol, v.544, n.Pt 1, Oct 1, p.57-69. 2002.

Santos, R. A., C. H. Castro, *et al.* Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, v.47, n.5, May, p.996-1002. 2006.

Schaible, T. F., G. J. Ciambone, *et al.* Cardiac conditioning ameliorates cardiac dysfunction associated with renal hypertension in rats. J Clin Invest, v.73, n.4, Apr, p.1086-94. 1984.

Scriven, D. R., P. Dan, *et al.* Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Biophys J, v.79, n.5, Nov, p.2682-91. 2000.

Shah, A. M., C. S. Lam, *et al.* The relationship between renal impairment and left ventricular structure, function, and ventricular-arterial interaction in hypertension. J Hypertens, v. 29, n.9, Sep, p.1829-1836, 2011.

Shapiro, L. M. e R. G. Smith. Effect of training on left ventricular structure and function. An echocardiographic study. Br Heart J, v.50, n.6, Dec, p.534-9. 1983.

Sheehan, K. A., Y. Ke, *et al.* p21-Activated kinase-1 and its role in integrated regulation of cardiac contractility. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.293, n.3, Sep, p.R963-73. 2007.

Sherman, D. L. Exercise and endothelial function. Coron Artery Dis, v.11, n.2, Mar, p.117-22. 2000.

Shiojima, I. e K. Walsh. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. Genes Dev, v.20, n.24, Dec 15, p.3347-65. 2006.

Shyu, K.G., J. J. Chen, *et al.* Angiotensinogen gene expression is induced by cyclical mechanical stretch in cultured rat cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun, v. 211, n. 241–248, 1995.

Shorofsky, S. R., R. Aggarwal, *et al.* Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. Circ Res, v.84, n.4, Mar 5, p.424-34. 1999.

Simmerman, H. K., J. H. Collins, *et al.* Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. J Biol Chem, v.261, n.28, Oct 5, p.13333-41. 1986.

Simmerman, H. K. e L. R. Jones. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. Physiol Rev, v.78, n.4, Oct, p.921-47. 1998.

Siscovick, D. S., R. E. Laporte, *et al.* The disease-specific benefits and risks of physical activity and exercise. Public Health Rep, v.100, n.2, Mar-Apr, p.180-8. 1985.

Siu, P. M., D.A. Donley, *et al.* Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. J Appl Physiol, v.94, p.555-60, 2003.

- Soares, E. R., W. G. Lima, *et al.* Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. Braz J Med Biol Res, v.44, n.6, Jun, p.573-82.
- Sonnleitner, A., S. Fleischer, *et al.* Gating of the skeletal calcium release channel by ATP is inhibited by protein phosphatase 1 but not by Mg²⁺. Cell Calcium, v.21, n.4, Apr, p.283-90. 1997.
- Spotnitz, H. M. e E. H. Sonnenblick. Structural conditions in the hypertrophied and failing heart. Am J Cardiol, v.32, n.4, Sep 20, p.398-406. 1973.
- Stange, M., L. Xu, *et al.* Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. J Biol Chem, v.278, n.51, Dec 19, p.51693-702. 2003.
- Steenart, N. A., J. R. Ganim, *et al.* The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. Arch Biochem Biophys, v.293, n.1, Feb 14, p.17-24. 1992.
- Sudoh, T., K. Kangawa, *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature, v. 332, p.78-81, 1988.
- Sugizaki, M. M., A. P. Leopoldo, *et al.* Upregulation of mRNA myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and food restriction. Arq Bras Cardiol, v.97, n.1, Jul, p.46-52, 2011.
- Sutliff, R. L., J. B. Hoying, *et al.* Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from phospholamban gene-ablated mice. Circ Res, v.84, n.3, Feb 19, p.360-4. 1999.
- Suzuk, M., M. Hamada, *et al.* Brain natriuretic peptide as a risk marker for incident hypertensive cardiovascular events. Hypertens Res, v.25, p. 669–676, 2002.

Takeshima, H., S. Nishimura, *et al.* Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature, v.339, n.6224, Jun 8, p.439-45. 1989.

Tallant, E. A., C. M. Ferrario, *et al.* Angiotensin(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.4, Oct, p.H1560-6. 2005.

Tate, C. A., T. Helgason, *et al.* SERCA2a and mitochondrial cytochrome oxidase expression are increased in hearts of exercise-trained old rats. Am J Physiol, v.271, n.1 Pt 2, Jul, p.H68-72. 1996.

Taylor, C. B., J. F. Sallis, *et al.* The relation of physical activity and exercise to mental health. Public Health Rep, v.100, n.2, Mar-Apr, p.195-202. 1985.

Terentyev, D., S. Viatchenko-Karpinski, *et al.* Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. J Physiol, v.552, n.Pt 1, Oct 1, p.109-18. 2003.

Timerman, A. P., E. Ogunbumni, *et al.* The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem, v.268, n.31, Nov 5, p.22992-9. 1993.

Timerman, A. P., H. Onoue, *et al.* Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. J Biol Chem, v.271, n.34, Aug 23, p.20385-91. 1996.

Tunwell, R. E., C. Wickenden, *et al.* The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. Biochem J, v. 318 (Pt 2), n. 1, p.477-87. 1996.

Turner, M. J., R. J. Spina, *et al.* Effect of endurance exercise training on left ventricular size and remodeling in older adults with hypertension. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v. 55, n. 4, Apr, p. M245-51. 2000.

Vangheluwe, P., M. Schuermans, *et al.* Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. Biochem J, v.389, n.Pt 1, Jul 1, p.151-9. 2005.

Vangheluwe, P., K. R. Sipido, *et al.* New perspectives on the role of SERCA2's Ca²⁺ affinity in cardiac function. Biochim Biophys Acta, v.1763, n.11, Nov, p.1216-28. 2006.

Vieira, R., A. M. Duarte, *et al.* A rotating wheel cage for rats allowing free movement, feeding and drinking. Braz J Med Biol Res, v.20, n.6, p.825-8. 1987.

Wakatsuki, T., J. Schlessinger, *et al.* The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. Trends Biochem Sci, v.29, n.11, Nov, p.609-17. 2004.

Wang, D. S., H. H. Xie, *et al.* Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.32, n.7, Jul, p.545-52. 2005.

Wang, S. Q., M. D. Stern, *et al.* The quantal nature of Ca²⁺ sparks and in situ operation of the ryanodine receptor array in cardiac cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.11, Mar 16, p.3979-84. 2004.

Weber, K. T. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. Circulation, v.102, n.12, Sep 19, p.1342-5. 2000.

Weber, K. T., C. G. Brilla, *et al.* Myocardial remodeling and pathologic hypertrophy. Hosp Pract (Off Ed), v.26, n.4, Apr 15, p.73-80. 1991.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, *et al.* FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, v.113, n.7, Jun 27, p.829-40. 2003.

_____. Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.27, Jul 5, p.9607-12. 2005.

_____. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.3, Jan 17, p.511-8. 2006.

Wehrens, X. H., S. E., Lehnart, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res, v.94, n.6, Apr 2, p.e61-70. 2004.

Whelton, S. P., A. Chin, *et al.* Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Intern Med, v.136, n.7, Apr 2, p.493-503. 2002.

Wisloff, U., J. P. Loennechen, *et al.* Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. Cardiovasc Res, v.50, n.3, Jun, p.495-508. 2001.

Xiao, B., M. T. Jiang, *et al.* Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. Circ Res, v.96, n.8, Apr 29, p.847-55. 2005.

Xiao, B., C. Sutherland, *et al.* Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). Circ Res, v.94, n.4, Mar 5, p.487-95. 2004.

- Xiao, J., X. Tian, *et al.* Removal of FKBP12.6 does not alter the conductance and activation of the cardiac ryanodine receptor or the susceptibility to stress-induced ventricular arrhythmias. J Biol Chem, v.282, n.48, Nov 30, p.34828-38. 2007.
- Xu, P., A. C. Costa-Goncalves, *et al.* Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. Hypertension, v.51, n.2, Feb, p.574-80. 2008.
- Yano, M., Y. Ikeda, *et al.* Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. J Clin Invest, v.115, n.3, Mar, p.556-64. 2005.
- Yin, C. C. e F. A. Lai. Intrinsic lattice formation by the ryanodine receptor calcium-release channel. Nat Cell Biol, v.2, n.9, Sep, p.669-71. 2000.
- Zamo F. S, E. M. Oliveira, *et al.* Exercise training reduced hypertension and RAS activity but not the cardiac hypertrophy. J Hypertens, v.22, p.72. 2004.
- Zanettini, R., D. Bettega, *et al.* Exercise training in mild hypertension: effects on blood pressure, left ventricular mass and coagulation factor VII and fibrinogen. Cardiology, v.88, n.5, Sep-Oct, p.468-73. 1997.
- Zak, R. Growth of the heart in health and disease. New York, Raven Press, pp.1–24, 131–185, 381–420. 1984
- Zhang, L., J. Kelley, *et al.* Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem, v.272, n.37, Sep 12, p.23389-97. 1997.
- Zhang, T. e J. H. Brown. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res, v.63, n.3, Aug 15, p.476-86. 2004.

ANEXOS

I – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética

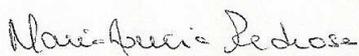
	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370 Email: ceua@propp.ufop.br</p>	
---	---	---

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2010/45, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado “*Mecanismos de contração dos cardiomiócitos de ratos com hipertensão 2R1C submetidos à atividade física*” e que tem como responsável o Prof. Dr. Mauro César Isoldi a foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em junho/2011.

Ouro Preto, 25 de março de 2011.


Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP