

Exercício Físico e Regulação de Cálcio Intracelular em Cardiomiócitos de Ratos Hipertensos

Physical Exercise and Regulation of Intracellular Calcium in Cardiomyocytes of Hypertensive Rats

Joel Alves Rodrigues,¹ Thales Nicolau Prímola-Gomes,¹ Leôncio Lopes Soares,¹ Tiago Ferreira Leal,¹ Clara Nóbrega,² Danilo Laviola Pedrosa,¹ Leonardo Mateus Teixeira Rezende,¹ Edilamar Menezes de Oliveira,² Antonio Jose Natali¹

Universidade Federal de Viçosa (UFV),¹ Viçosa, MG - Brasil

Universidade de São Paulo (USP),² São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A regulação intracelular de cálcio (Ca^{2+}) em cardiomiócitos é alterada pela hipertensão, e o exercício físico aeróbico traz benefícios para hipertensos.

Objetivo: Verificar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a contratilidade e a concentração intracelular de Ca^{2+} transitória em miócitos e a expressão do microRNA 214 no ventrículo esquerdo (VE) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Métodos: SHR e ratos Wistar normotensos com 16 semanas de idade foram divididos em 4 grupos de 13 animais cada: hipertenso sedentário (HS); hipertenso treinado (HT); normotenso sedentário (NS); normotenso treinado (NT). Os animais dos grupos HT e NT foram submetidos a um programa de treinamento progressivo de corrida em esteira, 5 dias/semana, 1 hora/dia, em intensidade de 60-70% da velocidade máxima de corrida, durante 8 semanas. Adotou-se $p \leq 0,05$ como nível de significância em todas as comparações.

Resultados: O treinamento físico reduziu a pressão arterial sistólica nos animais hipertensos. Nos animais normotensos, o treinamento físico reduziu o tempo para 50% de relaxamento celular e o tempo para o pico de contração celular, mas aumentou o tempo para 50% de decaimento da concentração intracelular de Ca^{2+} transitória. Nos animais SHR, o treinamento físico aumentou a amplitude e reduziu o tempo para 50% de decaimento da concentração intracelular de Ca^{2+} transitória, sem alterar a contratilidade celular. O treinamento físico aumentou a expressão do miR-214 apenas nos animais hipertensos.

Conclusão: O treinamento aeróbico utilizado aumenta a disponibilidade e acelera o sequestro de Ca^{2+} intracelular em miócitos do VE de ratos hipertensos, apesar do aumento da expressão de miR-214 e da manutenção da contratilidade celular. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):172-179)

Palavras-chave: Hipertensão; Exercício; Ratos; Sinalização do Cálcio; Proteínas Sensoras de Cálcio Intracelular.

Abstract

Background: Regulation of intracellular calcium (Ca^{2+}) in cardiomyocytes is altered by hypertension; and aerobic exercise brings benefits to hypertensive individuals.

Objective: To verify the effects of aerobic exercise training on contractility and intracellular calcium (Ca^{2+}) transients of cardiomyocytes and on the expression of microRNA 214 (miR-214) in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods: SHR and normotensive Wistar rats of 16 weeks were divided into 4 groups –sedentary hypertensive (SH); trained hypertensive (TH); sedentary normotensive (SN); and trained normotensive (TN). Animals of the TH and TN groups were subjected to treadmill running program, 5 days/week, 1 hour/day at 60-70% of maximum running velocity for 8 weeks. We adopted a $p \leq 0.05$ as significance level for all comparisons.

Results: Exercise training reduced systolic arterial pressure in hypertensive rats. In normotensive rats, exercise training reduced the time to 50% cell relaxation and the time to peak contraction and increased the time to 50% decay of the intracellular Ca^{2+} transients. In SHR, exercise increased the amplitude and reduced the time to 50% decay of Ca^{2+} transients. Exercise training increased the expression of miR-214 in hypertensive rats only.

Conclusion: The aerobic training applied in this study increased the availability of intracellular Ca^{2+} and accelerated the sequestration of these ions in left ventricular myocytes of hypertensive rats, despite increased expression of miR-214 and maintenance of cell contractility. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):172-179)

Keywords: Hypertension; Exercise; Rats; Calcium Signaling; Intracellular Calcium; Sensing Proteins.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Joel Alves Rodrigues •

Rua Ana koester, 65 AP 302. CEP 36570-000, Centro, Viçosa, MG – Brasil

E-mail: joel.a.rodrigues1@gmail.com, joel.rodrigues@ufv.br

Artigo recebido em 27/09/2017, revisado em 15/03/2018, aceito em 11/04/2018

DOI: 10.5935/abc.20180113

Introdução

A hipertensão arterial sustentada leva ao remodelamento progressivo do miocárdio. Enquanto a função cardíaca é aumentada em resposta ao processo hipertrófico ativo dos miócitos do ventrículo esquerdo (VE) durante a fase compensada, o remodelamento do VE é caracterizado pela combinação de hipertrofia de cardiomiócitos e proliferação de outros tecidos. Por exemplo, há aumento da deposição de colágeno, o que resulta em fibrosamento do tecido ventricular e, conseqüentemente, enrijecimento do miocárdio.^{1,2} Este quadro tem sido observado no início da fase compensatória da hipertensão (ex. 3 – 4 meses), mas a função cardíaca é preservada.¹ Aumento de marcadores pró-inflamatórios (ex. IL-6; TNF α) tem sido observado no VE de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) com apenas 5 a 6 meses de idade.^{3,4}

Os benefícios do treinamento físico aeróbico para hipertensos estão bem estabelecidos na literatura.^{5,6} No modelo animal para esta doença – SHR na fase compensada (~ 6 meses de idade) – este tipo de treinamento físico tem se mostrado eficaz em atenuar a disfunção sistólica e restaurar a elasticidade ventricular em SHR fêmeas.⁷ No miocárdio de SHR, o treinamento aeróbico reduziu apoptose,^{4,8} aumentou a função contrátil de cardiomiócitos isolados do VE e normalizou a expressão de proteínas reguladoras do ciclo intracelular de cálcio, dentre elas a cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e a fosfolambam.⁹⁻¹¹

Na hipertrofia cardíaca fisiologia ou patológica, os microRNAs (miRNAs) sofrem alterações na sua expressão relacionada ao remodelamento cardíaco.¹² O microRNA 214 (miR-214) está envolvido no processo de contração muscular do tecido cardíaco e sequestro de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático, pois regula negativamente a expressão da SERCA-2a.¹³ Em relação ao exercício físico, melhoras na função contrátil de cardiomiócitos, com aumento da proteína SERCA-2a e redução da expressão de miR-214, foi observada em ratos normotensos e infartados em resposta ao treinamento resistido.^{13,14} Entretanto, pouco se sabe sobre a expressão do miR-214 em animais SHR submetidos ao treinamento físico aeróbico. Assim, o objetivo deste estudo é verificar os efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade de cardiomiócitos e a expressão de miR-214 no VE de ratos hipertensos.

Métodos

Animais experimentais

SHR e normotensos (Wistar), com 16 semanas de idade, obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, foram divididos em grupos de 13 animais cada: NS (normotenso sedentário); NT (normotenso treinado); HS (hipertenso sedentário); e HT (hipertenso treinado). O tamanho da amostra foi definido por conveniência, sendo que em cada grupo, 8 animais foram utilizados para isolamento de cardiomiócitos e 5 para análise de expressão gênica. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais

(CEUA-UFV; processo n° 29/2014). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola), receberam água e ração comercial *ad libitum* sendo mantidos em ambiente com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de doze horas de escuridão e doze horas de claridade.

Protocolo de treinamento físico e teste de esforço em esteira rolante

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

Os animais dos grupos NT e HT foram submetidos a um programa de treinamento físico por oito semanas, 5 dias/semana (segunda a sexta-feira). Eles iniciaram correndo em esteira, em intensidade de 5 a 6 m/min, 0° de inclinação e duração de 10 minutos no primeiro dia. Nesta primeira semana, a duração foi aumentada em 5 minutos por dia e a intensidade foi mantida. Na segunda semana, a duração continuou sendo aumentada em 5 minutos/dia e a intensidade em 2% da VMC por dia, de maneira que a partir do primeiro dia da 3ª até o final da 8ª semana, os animais correram a uma intensidade de 60% da VMC (~ 18 a 22 m/min), durante 60 minutos por dia.

Os testes na esteira rolante para determinação da VMC foram realizados em cada animal dos grupos experimentais antes do treinamento, e no final da 4ª semana nos animais dos grupos treinados (NT e HT) para avaliação do tempo total de exercício até a fadiga (TTF) e redefinição da intensidade de treinamento. Quarenta e oito horas após a última sessão de treino, os testes foram repetidos em todos os animais dos grupos experimentais para avaliação dos efeitos do treinamento físico sobre a capacidade de corrida.

Durante o período experimental, os animais dos grupos sedentários NS e HS foram manuseados e colocados na esteira rolante 3 dias/semana (segundas, quartas e sextas-feiras), 10 min/dia, 0° de inclinação à intensidade de 5 m/min para expô-los a condições experimentais similares àquelas dos grupos treinados.

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida no início e ao final do período experimental, isto é, 48 horas após a última sessão de exercício. As medidas foram realizadas pela manhã, sem anestesia, por meio de pletismografia de cauda (LE 5001, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha), sendo realizadas três medidas para adoção do valor intermediário.

Isolamento do cardiomiócito

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício, miócitos do VE foram isolados conforme descrito por Locatelli et al.¹⁵ Resumidamente, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo o coração removido e pesado. Em seguida, foi canulado via artéria aorta em um sistema Langendorff e perfundido com solução de isolamento

[composição (mM): 130 Na⁺; 5,4 K⁺; 1,4 Mg⁺; 140 Cl⁻; 0,75 Ca²⁺; 5,0 HEPES; 10 glicose; 20 taurina; e 10 creatina; pH = 7,3 em temperatura ambiente]. Em seguida, o coração foi perfundido com solução livre de cálcio contendo 0,1 mM de *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)*, por um período de 4-6 min. Na sequência, o coração foi perfundido com a solução de isolamento contendo 1,0 mg/mL de colagenase tipo 2 (*Worthington*, EUA) e 0,1 mg/mL de protease (*Sigma-Aldrich*, EUA) por 15 a 20 min. As soluções utilizadas foram oxigenadas (O₂ 100% - *White Martins*, Brasil) e mantidas em temperatura de 35°C. Após perfusões, os ventrículos foram separados dos átrios e pesados. Em seguida, o VE foi colocado em frasco contendo 5,0 mL da solução enzimática (colagenase + protease). O frasco foi agitado moderadamente durante 05 min, em banho-maria a 37°C, após o qual o tecido foi retirado do frasco e o restante foi centrifugado (3.000 rpm) por 30s. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos na solução de isolamento e armazenados em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

Medida da contratilidade celular

As contrações dos miócitos isolados foram medidas por meio da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos usando-se o sistema de detecção de bordas (*Ionoptix*, Milton, MA-EUA) montado num microscópio invertido (*Nikon Eclipse - TS100*, Japão), conforme descrito previamente.¹⁵ Resumidamente, os miócitos foram acomodados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados por solução tampão com a seguinte composição (em mM): 136,9 NaCl; 5,4 KCl; 0,37 NaH₂PO₄; 0,57 MgCl₂; 5,0 HEPES = 5; 5,6 Glicose e 1,8 CaCl₂ (pH = 7,4 em temperatura ambiente). Os miócitos foram visualizados em um monitor através de uma câmera (*Myocam*, *Ionoptix*, frequência de 240 Hz) acoplada ao microscópio utilizando-se um programa de detecção de imagens (*IonWizard*, *Ionoptix*). Os cardiomiócitos foram estimulados externamente na frequência de 1,0 Hz (20 Volts, duração de 5 min), em temperatura ambiente (~25°C), utilizando-se um par de eletrodos de platina e um estimulador elétrico de campo (*Myopacer*, *Ionoptix*). Os movimentos das bordas longitudinais dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (*IonWizard*, *Ionoptix*) e armazenados para análise posterior. Foram utilizados para as medidas de contração somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações voluntárias. As contrações foram analisadas conforme descrito previamente.¹⁵

Medida da concentração intracelular de Ca²⁺ transitória

As medidas da concentração intracelular de Ca²⁺ transitória nos cardiomiócitos isolados foram realizadas por meio de sistema de fluorescência (*Ionoptix*, EUA) montado em um microscópio invertido (*Nikon Eclipse - TS100*, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, *Nikon*, EUA), conforme descrito por Natali et al.¹⁶ Em resumo, os miócitos foram incubados com uma sonda de Ca²⁺ (5 μM por 10 min) (*Fura-2AM*, *ThermoFisher*, *Waltham*, EUA). A razão entre a fluorescência emitida a 510 nm em resposta a excitações a 340 nm e a emitida em resposta a excitações a

380 nm foi usada como índice da concentração intracelular de Ca²⁺ transitória. Os miócitos foram estimulados eletricamente (*Myopacer*, *Field Stimulator*, *Ionoptix*, EUA) por um par de eletrodos de platina com um pulso supra-limiar de 0,2 ms (20V), na frequência de 1 Hz, em temperatura ambiente (~ 25°C). Os parâmetros da concentração intracelular de Ca²⁺ transitória foram analisados usando-se o software *IonWizard* (*IonWizard*, 6.3, *IonOptix*, *Milton*, EUA).

Análise de expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, após eutanásia, fragmentos do VE foram coletados e armazenados em Freezer a -80°C. O RNA total do VE foi isolado em 1 mL de *Trizol* (*Invitrogen*) conforme indicação do fabricante e armazenado a -70°C. As amostras de RNA foram diluídas na proporção de 1:100 em água, e analisadas por espectrofotometria em 260 a 280 nm.

Para análise da expressão gênica do miRNA-214 foi utilizado o kit *TaqMan MicroRNA Assays* (*Applied Biosystems*) seguindo as indicações do fabricante. A quantificação da expressão gênica foi feita em dois passos: primeiro, o DNA complementar específico (cDNA) foi obtido através da transcrição reversa da amostra de RNA total utilizando-se um *primer* específico para o miRNA analisado do tipo stem-loop e *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*; e segundo, por reação de *Real Time-PCR*, os produtos de PCR foram amplificados da amostra de cDNA obtida anteriormente, utilizando *TaqMan® MicroRNA Assay* e *TaqMan® Universal PCR Master Mix II*. Foi utilizado como controle o normalizador *U6 snRNA*. As análises foram feitas em equipamento *ABI 7500 Real Time-PCR Systems* (*Applied Biosystems*).

Análise estatística

As pressuposições da análise de variância (ANOVA) – homogeneidade de variâncias entre os grupos e de normalidade das observações, foram checadas e não foram detectadas violações que merecessem atenção. As variáveis se apresentam normais e contínuas. Foi utilizado os testes de *Levene*, *Qui quadrado* e *Kolmogorov-Smirnov*. As comparações entre os valores iniciais e finais de PAS e de TTF de cada grupo experimental foram feitas usando-se o teste *t* de *Student* pareado. Para as comparações entre os quatro grupos, usou-se ANOVA *two-way*, seguida do *post-hoc* de *Tukey*. Utilizou-se o programa *SigmaPlot* (*Systat Software, Inc.*, *San Jose, CA, EUA*) e adotou-se como nível de significância 5%. Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão da média (DP).

Resultados

O programa de treinamento físico aplicado aumentou o TTF dos animais normotensos e hipertensos (Figura 1A). A figura 1B apresenta a velocidade de corrida desses animais durante os treinamentos.

Os animais hipertensos apresentaram menor peso corporal (PC), igualdade no peso de VE (PVE), maior PVE/PC e nos animais HT maior peso dos ventrículos (PV)/PC em relação aos normotensos (Tabela 1). O treinamento físico aplicado não afetou estes parâmetros.

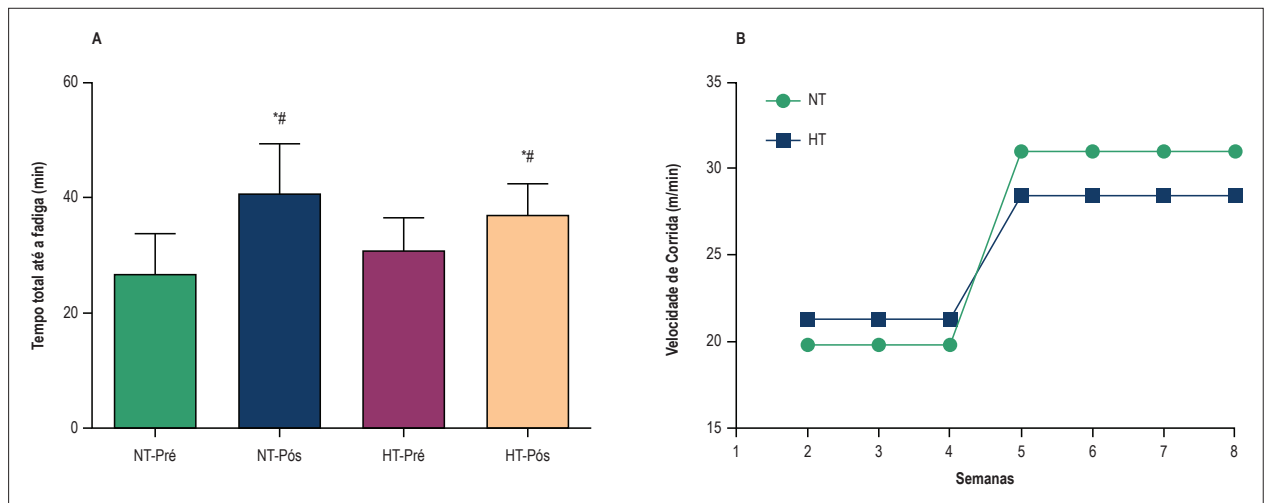


Figura 1 – (A) Tempo total até a fadiga dos animais normotensos e hipertensos antes (pré) e após (pós) o treinamento. (B) Velocidade de corrida durante os treinamentos. NT, normotenso treinado. HT hipertenso treinado. Dados são média \pm DP de 8 animais em cada grupo. ^{*}diferente NT-Pré; [#] diferente HT-Pré ($p < 0.05$).

Tabela 1 – Peso corporal e dos ventrículos nos grupos experimentais

	NS (n = 8)	NT (n = 8)	HS (n = 8)	HT (n = 8)	Valor de p
PC (g)	411,30 \pm 21,51	447,10 \pm 43,94	350,60 \pm 21,97 ^{*§}	338,90 \pm 30,67 [§]	0,001
PV (g)	1,62 \pm 0,20	1,49 \pm 0,25	1,47 \pm 0,17	1,66 \pm 0,23	0,954
PVE (g)	1,12 \pm 0,13	1,08 \pm 0,13	1,18 \pm 0,14	1,25 \pm 0,15	0,265
PV/PC (mg/g)	3,97 \pm 0,62	3,46 \pm 0,47	4,19 \pm 0,45	4,93 \pm 0,80 [§]	0,000
PVE/PC (mg/g)	2,75 \pm 0,42	2,42 \pm 0,23	3,39 \pm 0,39 [§]	3,72 \pm 0,48 [§]	0,000

NS: normotenso sedentário; NT: normotenso treinado; HS: hipertenso sedentário; HT: hipertenso treinado; PC: peso corporal; PV: peso dos ventrículos; PVE: peso do ventrículo esquerdo; n, número de animais; ^{*} diferente NS; [§] diferente NT ($p < 0.05$).

Os resultados referentes à PAS são apresentados na Figura 2. O programa de exercício físico aplicado não alterou a PAS nos animais normotensos em relação ao pré-treinamento; por outro lado, no grupo experimental hipertenso, o treinamento físico reduziu a PAS em relação ao pré-treinamento (Figura 2A).

A figura 3 apresenta os dados da contratilidade celular. A amplitude de contração não foi afetada pela hipertensão nem pelo treinamento físico (Figura 3A). Da mesma forma, o tempo para o pico de contração não foi alterado em nenhum dos grupos experimentais (Figura 3B). Entretanto, o treinamento físico foi capaz de diminuir o tempo para 50% de relaxamento (Figura 3C) nos animais normotensos, mas não nos hipertensos.

A Figura 4A mostra que o treinamento físico não modificou a amplitude de $[Ca^{2+}]_i$ nos animais normotensos. Porém, o treinamento físico aumentou a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ no grupo HT, comparado ao HS. O treinamento físico também diminuiu o tempo para o pico do $[Ca^{2+}]_i$ nos animais do grupo NT, em relação aos do grupo NS (Figura 4B), mas não nos animais hipertensos. O tempo para 50% de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4C) foi aumentado no grupo NT em relação ao NS. Nos animais hipertensos, todavia, o treinamento físico reduziu este parâmetro ($p < 0,05$).

O protocolo de treinamento físico aplicado não causou nenhuma modificação na expressão de mir-214 nos animais normotensos (Figura 5). Entretanto, nos animais hipertensos houve aumento no grupo HT em relação ao HS e aos demais grupos.

Discussão

Neste estudo, verificaram-se os efeitos do treinamento aeróbico sobre a contratilidade e a concentração intracelular de Ca^{2+} transitória em miócitos e a expressão do miR-214 no VE de ratos hipertensos. Os resultados mostram que o treinamento aeróbico aplicado, além de reduzir a PAS dos animais hipertensos, aumentou amplitude e reduziu o tempo para 50% de decaimento da concentração intracelular de Ca^{2+} transitória, assim como aumentou a expressão de miR-214. Todavia, a contratilidade de miócitos isolados do VE não foi alterada.

A eficiência do programa de treinamento físico usado no presente estudo foi confirmada quando os animais treinados apresentaram uma maior capacidade física, representada pelo TTF, comparada aos seus respectivos controles. Esta maior capacidade física de SHR em resposta ao treinamento aeróbico já foi demonstrada em estudos prévios.^{10,17,18} Mais importante, o treinamento físico reduziu a PAS nos animais hipertensos, e esse efeito está bem estabelecido na literatura.^{11,19}

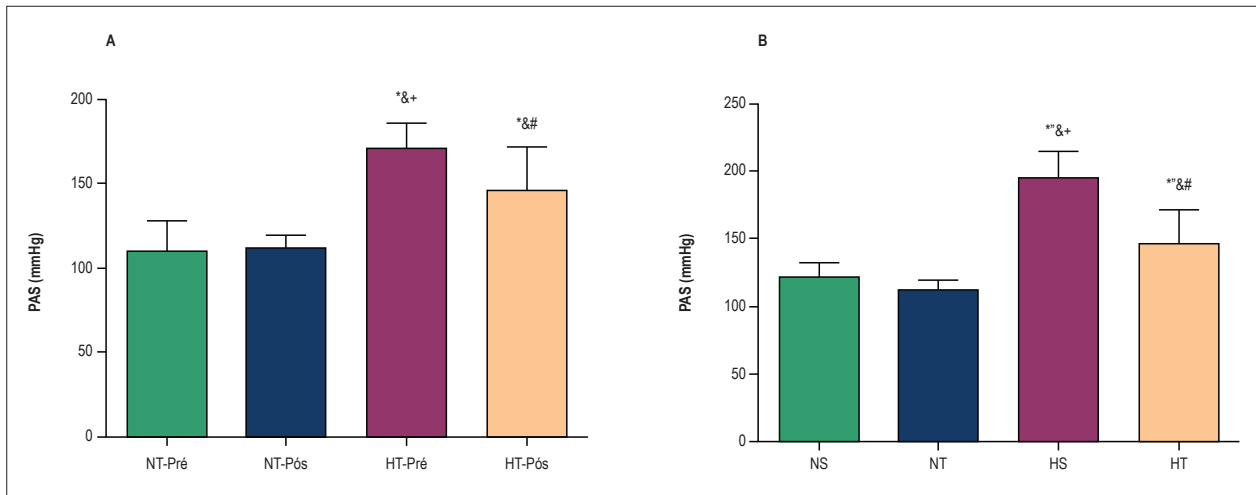


Figura 2 – Pressão arterial sistólica (PAS) dos animais normotensos e hipertensos. (A) PAS pré-treinamento vs. pós-treinamento. (B) PAS final de todos os grupos experimentais. NS, normotenso sedentário. NT, normotenso treinado. HS, hipertenso sedentário. HT, hipertenso treinado. Dados são média \pm DP de 8 animais em cada grupo. * diferente NT-Pré (A) NS(B); # diferente NT-Pós (A) NT (B); & diferente HT-Pré (A) NS(B); + diferente HT-Pós (A) HT (B) ($p < 0.05$).

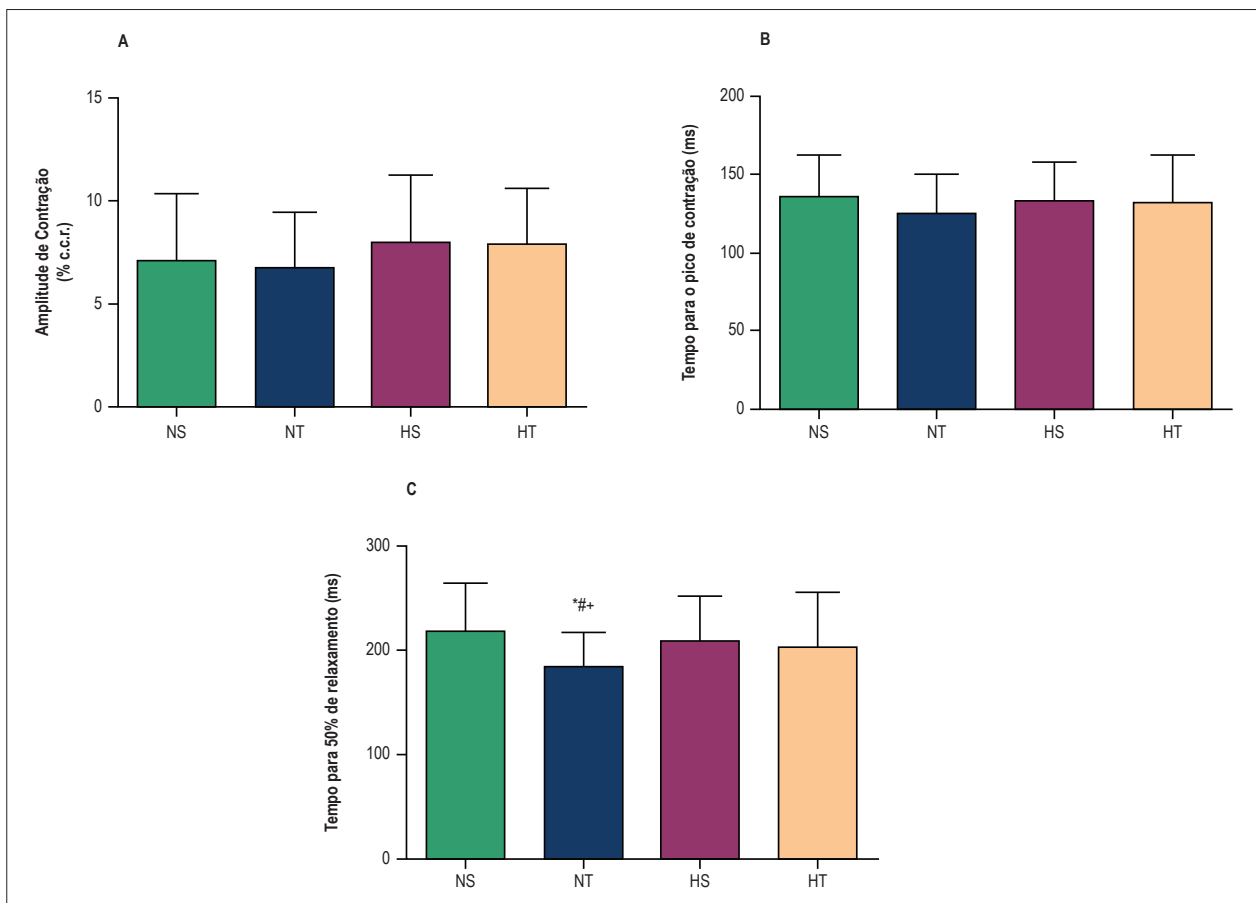


Figura 3 – Contratilidade de cardiomiócitos dos animais normotensos e hipertensos. (A) Amplitude de contração é expressa como percentual de variação do comprimento celular de repouso (% c.c.r.) após o estímulo elétrico a 1HZ; (B) Tempo para o pico de contração; (C) Tempo para 50% de relaxamento; NS: normotenso sedentário; NT: normotenso treinado; HS: hipertenso sedentário; HT: hipertenso treinado. Dados são média \pm DP de 60 a 80 células de 8 animais em cada grupo. * diferente NS; # diferente HT ($p < 0.05$).

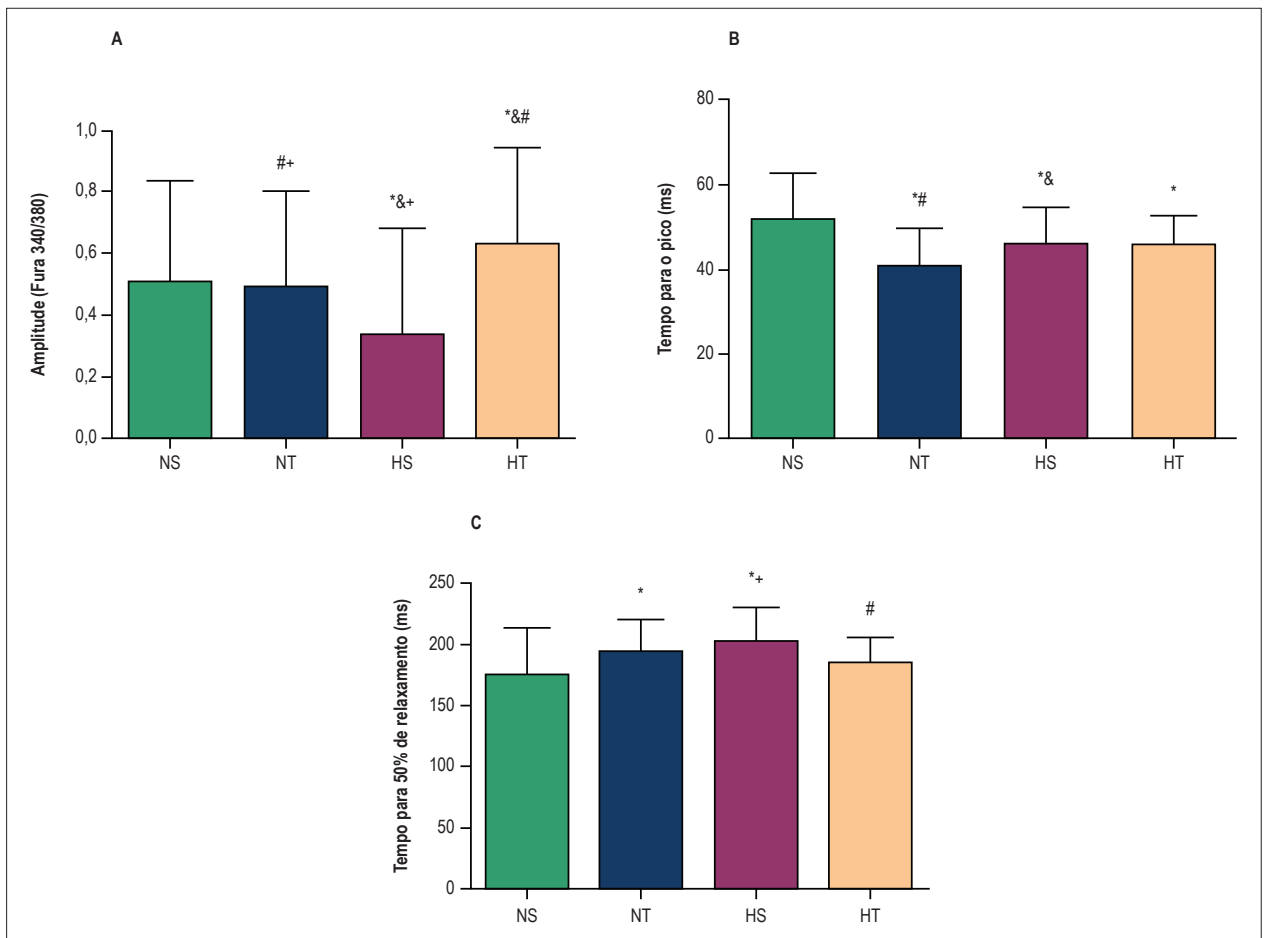


Figura 4 – Concentração intracelular de cálcio transitória em cardiomiócitos de animais normotensos e hipertensos. (A) Amplitude do cálcio intracelular. (B) Tempo para o pico de cálcio intracelular. (C) Tempo para 50% de decaimento do cálcio intracelular. NS: normotenso sedentário; NT: normotenso treinado; HS: hipertenso sedentário; HT: hipertenso treinado. Dados são média \pm DP de 40-50 células de 8 animais em cada grupo). * diferente NS; & diferente NT; # diferente HT ($p < 0.05$).

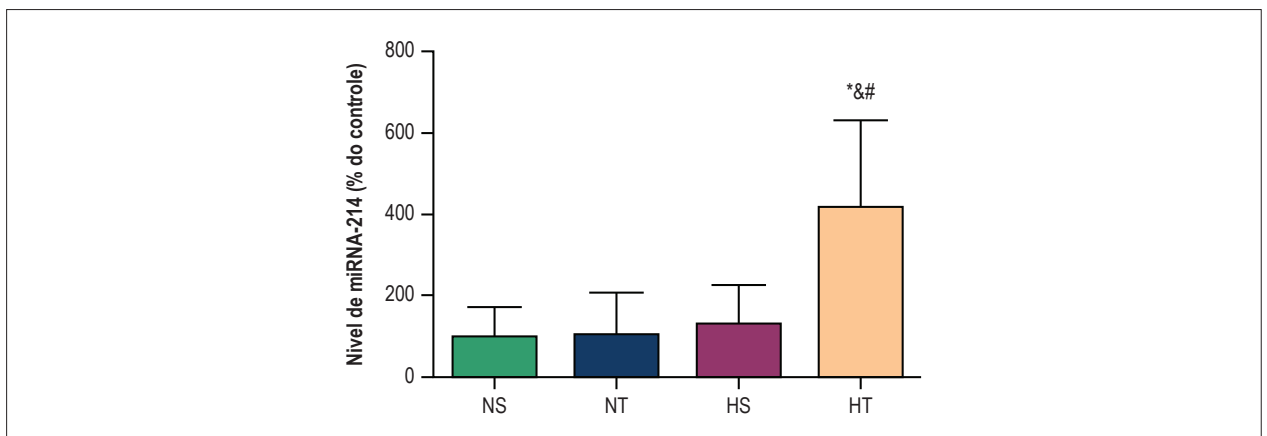


Figura 5 – Expressão de microRNA 214 no ventrículo esquerdo dos animais normotensos e hipertensos. NS: normotenso sedentário; NT: normotenso treinado; HS: hipertenso sedentário; HT: hipertenso treinado. Dados são média \pm DP de 5 animais em cada grupo. * diferente NS; & diferente NT; # diferente HT ($p < 0.05$).

No presente estudo, em relação à contratilidade de cardiomiócitos do VE, apesar do treinamento físico aeróbico reduzir o tempo de relaxamento celular nos animais normotensos, nos animais SHR a contratilidade celular nos animais treinados foi mantida nos mesmos níveis dos sedentários.

Embora a contratilidade dos cardiomiócitos dos SHR não tenha sido afetada pelo treinamento físico, a concentração intracelular de Ca^{2+} transitória apresentou maior amplitude e menor tempo de decaimento nos animais treinados que seus controles sedentários. Isso indica maior disponibilidade de Ca^{2+} no citosol, assim como maior velocidade de remoção desse íon e consequente relaxamento celular.²⁰ Tais achados corroboram os de outro estudo,²¹ o qual demonstrou aumento da expressão de SERCA2a, principal responsável pela remoção do Ca^{2+} do citosol para dentro do retículo sarcoplasmático.²⁰

Em relação ao miR-214, regulador antagonista da SERCA2a, os resultados deste estudo são contraditórios aos existentes na literatura, pois o exercício físico utilizado causou aumento na expressão deste microRNA no VE dos animais hipertensos. Esperava-se que o treinamento físico aeróbico reduzisse a expressão de miR-214, o que justificaria a redução do tempo para 50% de decaimento da concentração intracelular de Ca^{2+} transitória nos cardiomiócitos do VE dos SHR, em função de um esperado aumento na expressão de SERCA2a. Apesar da expressão de SERCA2a no VE não ter sido avaliada no presente estudo, um estudo¹⁴ demonstrou que o VE de ratos normotensos submetidos a treinamento físico resistido apresentou redução na expressão de miR-214 e aumento na expressão de SERCA2a. Tais adaptações estavam associadas à maior velocidade de relaxamento dos miócitos isolados do VE dos animais treinados. Resultados similares apresentando redução na expressão de miR-214 e aumento na expressão de SERCA2a também foram observados em ratos infartados submetidos ao treinamento físico resistido.¹³ Assim, pouco se sabe sobre os efeitos do exercício aeróbico sobre as propriedades do cardiomiócito hipertenso, e estudos futuros são necessários para investigar outras possíveis alterações associadas à regulação intracelular de Ca^{2+}

em cardiomiócitos de ratos hipertensos submetidos ao treinamento físico aeróbico.

Conclusão

O treinamento físico aeróbico utilizado aumentou a disponibilidade intracelular e acelera o sequestro de Ca^{2+} em miócitos do VE de ratos hipertensos, apesar do aumento da expressão de miR-214 e da manutenção da contratilidade celular.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Rodrigues JA, Prímola-Gomes TN, Natali AJ; Obtenção de dados: Rodrigues JA, Soares LL, Leal TF, Nóbrega C, Pedrosa DL, Rezende LMT, Oliveira EM, Natali AJ; Análise e interpretação dos dados: Rodrigues JA, Soares LL, Leal TF, Nóbrega C, Oliveira EM, Natali AJ; Análise estatística: Rodrigues JA, Soares LL, Leal TF, Nóbrega C, Natali AJ; Obtenção de financiamento: Prímola-Gomes TN, Natali AJ; Redação do manuscrito: Rodrigues JA, Natali AJ; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Natali AJ.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPEMIG (APQ-00876-14).

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Joel Alves Rodrigues pela Universidade Federal de Viçosa.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob o número de protocolo 29/2014.

Referências

1. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83(6):1849-65.
2. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*. 2002;105(21):2512-7.
3. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- κ B. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:21.
4. Huang CY, Yang AL, Lin YM, Wu FN, Lin JA, Chan YS, et al. Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(5):883-91.
5. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA, et al; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(3):533-53.
6. Sharman JE, La Gerche A, Coombes JS. Exercise and cardiovascular risk in patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 2015;28(2):147-58.
7. Libonati JR, Sabri A, Xiao C, MacDonnell SM, Renna BF. Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111(6):1637-43.
8. Kolwicz SC, MacDonnell SM, Renna BF, Reger PO, Seqqat R, Rafiq K, et al. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(4):H1361-8.

9. Garcarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2009;53(4):708-14.
10. Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Amadeu MA, et al. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(11):960-5.
11. Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Apr;57:119-28.
12. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101(12):921-8.
13. Melo SF, Barauna VG, Neves VJ, Fernandes T, Lara Lda S, Mazzotti DR, et al. Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca²⁺ handling after myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015 Dec 9;15(1):166.
14. Melo SF, Barauna VG, Júnior MA, Bozi LH, Drummond LR, Natali AJ, et al. Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6855-67.
15. Locatelli J, Paiva NC, Carvalho SH, Lavorato VN, Gomes LH, Castro QJ, et al. Swim training attenuates the adverse remodeling of LV structural and mechanical properties in the early compensated phase of hypertension. *Life Sci*. 2017 Oct 15;187:42-9.
16. Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2002;541(Pt 3):863-75.
17. Chen Y, Zhang H, Zhang Y, Lu N, Zhang L, Shi L. Exercise intensity-dependent reverse and adverse remodeling of voltage-gated Ca²⁺ channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2015;38(10):656-65.
18. Huang CC, Lin TJ, Chen CC, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107(6):697-706.
19. Petriz BA, Almeida JA, Gomes CP, Ernesto C, Pereira RW, Franco OL. Exercise performed around MLSS decreases systolic blood pressure and increases aerobic fitness in hypertensive rats. *BMC Physiol*. 2015 Mar 14;15:1.
20. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
21. Carneiro-Junior MA, Primola-Gomes TN, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, et al. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115(1):107-15.

