



O TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO CORRIGE A RAREFAÇÃO CAPILAR E AS ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DOS TIPOS DE FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

AEROBIC EXERCISE TRAINING CORRECTS CAPILLARY RAREFACTION AND ALTERATIONS IN PROPORTIONS OF THE MUSCLE FIBERS TYPES IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Tiago Fernandes
Fernanda Roberta Roque
Flávio de Castro Magalhães
Everton Crivoi do Carmo
Edilamar Menezes de Oliveira

Laboratório de Bioquímica e
Biologia Molecular do Exercício,
Escola de Educação Física e Esporte,
Universidade de São Paulo-USP –
São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência:

Edilamar Menezes de Oliveira
Escola de Educação Física e Esporte
da Universidade de São Paulo,
Departamento de Biodinâmica do
Movimento do Corpo Humano.
Av. Professor Mello Moraes, 65,
Butantã.
05508-900 – São Paulo, SP, Brasil
E-mail: edilamar@usp.br

RESUMO

O treinamento físico (TF) aeróbio tem sido utilizado como um importante tratamento não farmacológico na hipertensão arterial (HA), uma vez que ele reduz a pressão arterial. Estudos mostram que as anormalidades do músculo esquelético na HA estão associados à rarefação capilar, um aumento na porcentagem de fibras de contração rápida (tipo II), com predominância do metabolismo glicolítico e um aumento da fadiga muscular. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos do TF sobre estes parâmetros na HA. Nós hipotetizamos que o TF corrija a rarefação capilar potencialmente contribuindo para a restauração da proporção dos tipos de fibras musculares. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR, n=14) e Wistar Kyoto (WKY, n=14) com 12 semanas de vida e divididos em 4 grupos: SHR, SHR treinado (SHR-T), WKY e WKY treinado (WKY-T) foram estudados. Como esperado, 10 semanas de TF foi efetivo em reduzir a pressão arterial em SHR-T. Além disso, avaliamos os principais marcadores de TF. A bradicardia de repouso, o aumento da tolerância a realização de esforço, do consumo de oxigênio de pico e da atividade da enzima citrato sintase muscular nos grupos de animais treinados (WKY-T e SHR-T) mostram que a condição aeróbia foi alcançada com este TF. O TF também corrigiu a rarefação capilar no músculo sóleo em SHR-T. Em paralelo, foi observada uma redução na porcentagem de fibras do tipo IIA e IIX, ao passo que aumentou a porcentagem de fibras do tipo I induzidas pelo TF na HA. Estes resultados sugerem que o TF previne as alterações na composição dos tipos de fibras no músculo sóleo em SHR, uma vez que a angiogênese e o aumento da atividade da enzima citrato sintase são umas das mais importantes adaptações ao TF aeróbio, atuando na manutenção do metabolismo oxidativo e do perfil de fibras do músculo.

Palavras-chave: treinamento físico, hipertensão arterial, angiogênese, tipo de fibra.

ABSTRACT

Aerobic exercise training (ET) has been established as an important non-pharmacological treatment of hypertension, since it decreases blood pressure. Studies show that the skeletal muscle abnormalities in hypertension are directly associated with capillary rarefaction, higher percentage of fast-twitch fibers (type II) with glycolytic metabolism predominance and increased muscular fatigue. However, little is known about these parameters in hypertension induced by ET. We hypothesized that ET corrects capillary rarefaction, potentially contributing to the restoration of the proportion of muscle fiber types and metabolic proprieties. Twelve-week old Spontaneously Hypertensive Rats (SHR, n=14) and Wistar Kyoto rats (WKY, n=14) were randomly assigned into 4 groups: SHR, trained SHR (SHR-T), WKY and trained WKY (WKY-T). As expected, ten weeks of ET was effective in reducing blood pressure in SHR-T group. In addition, we analyzed the main markers of ET. Resting bradycardia, increase of exercise tolerance, peak oxygen uptake and citrate synthase enzyme activity in trained groups (WKY-T and SHR-T) showed that the aerobic condition was achieved. ET also corrected the skeletal muscle capillary rarefaction in SHR-T. In parallel, we observed reduction in percentage of type IIA and IIX fibers and simultaneous augmented percentage of type I fibers induced by ET in hypertension. These data suggest that ET prevented changes in soleus fiber type composition in SHR, since angiogenesis and oxidative enzyme activity increased are important adaptations of ET, acting in the maintenance of muscle oxidative metabolism and fiber profile.

Keywords: exercise training, hypertension, angiogenesis, muscle fiber type.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma síndrome multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), considerada um dos fatores de risco mais relevantes na etiologia das doenças cardiovasculares (DCV)^{1,2}. Estudos experimentais e clínicos mostram que a disfunção no tônus vasomotor e alterações na estrutura micro-

vascular são os processos primários na patogênese da HA³⁻⁶. Diversos estudos têm mostrado rarefação capilar no músculo esquelético de animais e pacientes hipertensos³⁻⁶, com aumento na porcentagem de fibras de contração rápida, as quais apresentam predomínio de metabolismo glicolítico^{8,12} e classificadas como fibras do tipo II⁷⁻¹¹. O músculo esquelético apresenta alta plasticidade e sofre transição de tipo de fibra

pela mudança nas isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) em várias condições, tais como: desuso, crescimento, envelhecimento, estímulo elétrico, exposição à microgravidade, exercícios físicos e DCV^{8,11}.

Considerando as alternativas e uma maior efetividade de tratamento para HA, o TF aeróbio tem sido intensivamente investigado. Modificações no estilo de vida, tais como a introdução da prática regular de exercício físico aeróbio, têm-se mostrado efetivas como medidas não farmacológicas no tratamento da HA, prevenindo e reduzindo os níveis pressóricos elevados^{13,14}. Estudos epidemiológicos vêm demonstrando, nas últimas décadas, a relação inversa existente entre o nível de condição física e o desenvolvimento de DCV¹⁵. Assim, a inatividade física está associada ao maior risco do desenvolvimento de HA, sendo o TF considerado um componente chave na prevenção e no tratamento da HA, contribuindo para melhora de outros fatores de risco cardiovascular¹³⁻¹⁵. Estudos apontam importantes efeitos do TF aeróbio sobre a microcirculação em SHR, tais como aumento na densidade capilar e razão capilar: fibra no músculo esquelético, promovendo uma reversão da rarefação capilar ocorrida na HA. Além disso, o exercício aeróbio normaliza a resistência vascular periférica para a musculatura esquelética e a razão parede: luz arteriolar¹⁶⁻¹⁸. O restauro da rede microvascular pode contribuir determinantemente para o efeito da diminuição da PA por meio da redução da resistência vascular periférica, a qual vem sendo mostrada como a responsável pela HA primária em adultos^{3,4,16-18}.

Embora o efeito terapêutico do TF aeróbio sobre a PA na HA tenha sido mostrado implicado sobremaneira na recuperação da rede microvascular, estudos com abordagem não farmacológica, como o TF, no que concerne a regulação do perfil de tipos de fibras muscular esquelética, ainda foram pouco estudados. Portanto, a proposta para este estudo é verificar: 1) a possível alteração na proporção dos tipos de fibras musculares associada ao dano microvascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR); e 2) o efeito do TF sobre a correção da rarefação capilar e a restauração da distribuição dos tipos de fibra muscular na HA.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Para a realização do presente estudo foram utilizados 28 SHR, com 12 semanas de vida em que o quadro de HA já está estabelecido e 28 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os ratos estavam pesando entre 240 e 270g no início do protocolo.

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de três ou quatro animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22 e 24°C, com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo este projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) (nº 2007/35).

Identificação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com sete animais em cada grupo, conforme o protocolo experimental:

- ratos Wistar Kyoto (WKY);
- ratos Wistar Kyoto treinados (WKY-T);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- ratos espontaneamente hipertensos treinados (SHR-T).

Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TF de natação foi realizado segundo protocolo de Fernandes *et*

*al.*¹⁹. Os animais foram treinados durante 10 semanas, sessões de 60 min, uma vez ao dia, cinco vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 4% do peso corporal. O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento do peso corporal.

Pré e pós o período de TF, os animais foram submetidos a análises hemodinâmicas, teste de tolerância ao esforço e consumo de oxigênio de pico. Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram mortos por anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (80mg/kg). As amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises histológicas e bioquímicas.

Avaliação das respostas hemodinâmicas

A PA foi realizada pré e pós o período de TF por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC RTBP1001 para ratos e camundongos, Litchfield, EUA), nos quatro grupos de animais. Os animais estavam acordados, em repouso e mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Para evitar erros de medida e análise, os ratos foram submetidos a um período de uma semana de ambientação com a técnica de medida.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300mmHg. Em uma região mais distal da cauda, é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais. Este método de medida indireta da PA permite quantificar a PA e a frequência cardíaca (FC) ao longo de todo o período do protocolo experimental.

Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais dos quatro grupos foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento do animal, foi iniciado o teste de esforço. A velocidade inicial foi de 6m/min (sem inclinação), que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3min, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão do animal e a interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr dentro da caixa metabólica mediante o incremento de velocidade da esteira.

Esta avaliação foi feita pré e pós o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho do animal entre os grupos. Embora o teste em esteira não seja específico ao TF realizado no presente estudo, utilizamos esse teste para auxiliar na verificação da eficácia do TF como predição de uma melhora na capacidade de realização de esforço. Foram comparados o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida para cada rato.

Avaliação do consumo de oxigênio (VO₂) de pico

Após a semana de adaptação à caixa metabólica, os ratos foram submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de Brooks e White²⁰, com incremento de carga de 3m/min a cada 3min, até a exaustão, para a obtenção do VO₂ pico. O VO₂ pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO₂) durante o teste de exercício progressivo até a exaustão. Neste protocolo os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de "T", para a retirada de amostras de

ar (1.000ml/min) para ser analisada a FeO₂ em um analisador de gases. A outra via do tubo em "T" é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500ml/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500ml/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, em seguida, o teste foi iniciado com velocidade de 3m/min. Durante cada estágio (3 min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO₂ dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Foram consideradas as frações expiradas dos 30 últimos segundos de cada estágio para a determinação do VO₂ pico de cada estágio.

Ao atingir a exaustão, o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 min e as frações expiradas foram registradas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores.

O VO₂ foi calculado através da seguinte fórmula matemática: VO₂ = fluxo de ar x (FiO₂-FeO₂)/peso corporal.

Onde: VO₂ = mL.kg⁻¹.min⁻¹, Fluxo de ar = 1.000ml/min (analisador) + 2.500ml/min (bomba de aspiração) = 3.500ml/min, FiO₂ = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente), FeO₂ = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura), peso corporal = kg.

Avaliação histoquímica do músculo esquelético

O músculo esquelético sóleo foi dissecado e extraído cuidadosamente e fixado em uma massa de montagem a base de tissue tek (para manter o tecido na posição correta pré-congelamento) pela região tendinosa. Posteriormente à fixação na massa de montagem à base de tissue tek, o sóleo foi mergulhado em isopentano (crioprotetor que evita artefatos nas amostras) e em seguida em nitrogênio líquido para o congelamento, em que foram mantidos até que os cortes fossem realizados. Após a obtenção dos cortes de 10µm realizado em Criostato Mícron HM505E (Zeiss, Walldorf, Germany), foram realizadas reações adaptadas de Brooke e Kaiser²¹, que permitiram a avaliação da atividade da enzima ATPase miosínica por meio de soluções com diferentes pHs (4,3 e 10,3), com o intuito de realizar a tipagem das fibras e a marcação dos capilares.

Determinação da área de secção transversa e tipos de fibras musculares

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador, acoplado a um sistema de vídeo, por meio de um programa de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro. Foi calculada a área de secção transversa por cada tipo de fibra muscular em µm².

Para a identificação dos tipos de fibras pela técnica da ATPase miosínica em pH 10,3 (alcalino), as fibras escuras foram caracterizadas de tipo IIA, as de cor cinza de tipo IIX e as claras de tipo I. Já no pH 4,3 (ácido), a marcação dos tipos de fibra é contrário ao alcalino, sendo este utilizado para confirmação da análise em pH 10,3.

Análise da razão capilar por fibra

A razão capilar por fibra do músculo sóleo foi avaliada por meio da reação histoquímica para ATPase miosínica no pH 10,3, como descrito por Sillau e Banchemo²². Resumidamente, após a obtenção dos cortes histológicos realizados no criostato, o ATP presente no meio de incubação da reação histoquímica é hidrolisado pela ATPase endotelial dos capilares, o qual é revelado pela deposição de sulfeto. Uma vez visualizados, os capilares foram quantificados pela análise de 10 campos aleatórios e não sobrepostos, com uma amplificação de 200x, usando um sistema computacional morfométrico (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK). Para calcular a razão capilar por fibra, o número total de capilares foi dividido pelo número total de fibras contadas no mesmo campo. Somente vasos com um diâmetro menor que 12µm foram quantificados.

Avaliação da atividade da enzima citrato sintase

Para avaliar a atividade da enzima citrato sintase, o músculo sóleo foi homogeneizado a 4°C em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50mM) e EDTA (1mM). As amostras foram centrifugadas a 3.000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogeneizado foi realizada segundo o método de Bradford.

A atividade da enzima foi determinada segundo Alp *et al.*²³, a partir da quantificação do complexo formado entre a coenzima A com o ácido 5,5-ditio-bis 2 nitrobenzoico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio consistiu de Tris-base (100mM), DTNB (0,4mM), acetil-CoA (1,24mM) e Triton X-100 1% (v/v) no qual foi acrescentado o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (18,9mM) ao meio e a leitura foi realizada a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412nm com o uso do Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter/ PerkinElmer, MA, EUA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias (TF e HA como fatores independentes), para comparar os valores dos grupos e teste de Tukey como *post hoc* (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Todos os resultados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM) e foi adotado um p < 0,05 de significância para todos os experimentos.

RESULTADOS

Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de PA expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da FC expressos em batimentos por minuto (bpm) pré e pós-TF foram sumarizados na tabela 1. Pré-TF, podemos observar que os grupos de SHR apresentavam níveis elevados de PAS comparados aos grupos controle, WKY, indicando que a HA estava estabelecida. Não houve alterações da FC entre os grupos, pré-TF.

Pós-TF, observa-se que o TF de natação de baixa intensidade e de longa duração foi eficaz em reduzir a PAS do grupo SHR-T (162 ± 4,4mmHg) comparado ao grupo SHR (207 ± 5,5mmHg), sem nenhuma alteração da PAS nos grupos de animais controle, WKY e WKY-T. Além disso, observamos bradicardia de repouso nos grupos de animais treinados, portanto, reduzindo os valores de FC destes grupos quando comparado aos grupos mantidos sedentários no mesmo período experimental (pós-TF-WKY: 393 ± 12; WKY-T: 322 ± 14; SHR: 407 ± 11; SHR-T: 338 ± 8bpm).

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos.

	PAS. mmHg	FC, bpm
Pré TF		
WKY	127±3,0	390±12,2
WKY-T	124±1,6	393±8,2
SHR	184±3,9*	409±7,7
SHR-T	184±2,9*	415±6,5
Pós TF		
WKY	132±3,9	393±11,8
WKY-T	131±3,7	322±14,2F
SHR	207±5,4*§	407±11,2
SHR-T	162±4,4*†§	338±7,8F

Valores expressos em média ± EPM. Resultados de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos Pré e Pós período de TF em ratos Wistar Kyoto (WKY), WKY treinados (WKY-T), ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e SHR treinados (SHR-T). *P < 0,001 vs WKY e WKY-T; †P < 0,01 vs SHR Pós TF; ‡P < 0,01 vs WKY e SHR Pós TF; §P < 0,05 vs SHR e SHR-T pré TF. TF: treinamento físico, bpm: batimentos por minuto.

Teste de esforço físico máximo

O teste de tolerância ao esforço foi um dos parâmetros avaliados para comprovarmos a eficácia do TF. Os resultados do teste realizado antes e após as 10 semanas de protocolo experimental estão apresentados na figura 1. As figuras 1A, 1B e 1C mostram que os valores de velocidade (WKY: $30 \pm 1,5$; WKY-T: $30,5 \pm 0,9$; SHR: $31,8 \pm 0,7$; SHR-T: $31,5 \pm 1$ m.min⁻¹), tempo (WKY: $27 \pm 0,5$; WKY-T: $27 \pm 0,6$; SHR: $28 \pm 0,6$; SHR-T: $27 \pm 0,3$ min) e distância percorrida (WKY: $475 \pm 17,5$; WKY-T: 467 ± 22 ; SHR: 508 ± 28 ; SHR-T: 478 ± 10 m), respectivamente, foram semelhantes entre os grupos pré-TF. Entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a velocidade (WKY: $28,5 \pm 0,7$; WKY-T: 37 ± 1 ; SHR: $31 \pm 1,2$; SHR-T: $39,5 \pm 0,9$ m.min⁻¹), o tempo (WKY: $24 \pm 0,4$; WKY-T: $31 \pm 0,9$; SHR: 26 ± 1 ; SHR-T: $35 \pm 0,6$ min) e a distância percorrida (WKY: 381 ± 15 ; WKY-T: $601 \pm 3,5$; SHR: 449 ± 32 ; SHR-T: $739 \pm 36,8$ m) no teste pós-TF.

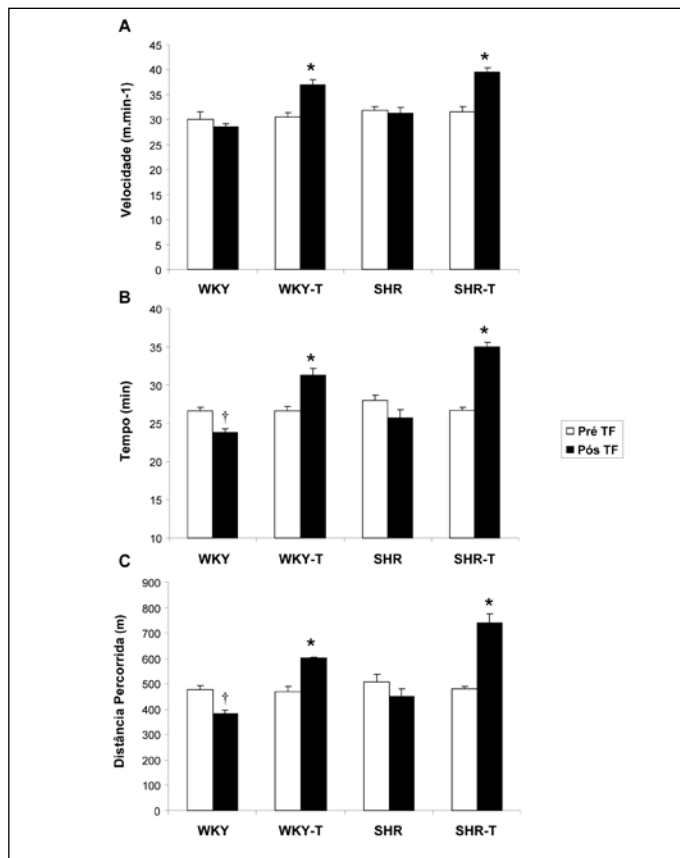


Figura 1. Teste de esforço físico máximo. Velocidade (A), tempo (B) e distância percorrida (C) pré e pós-TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado com o pré-TF e WKY e SHR pós-TF; † $P < 0,05$ comparado ao pré-TF e WKY-T e SHR-T pós-TF.

Medida do consumo de oxigênio de pico

A figura 2 mostra o VO_2 pico dos animais pré e pós o protocolo experimental. No período pré-TF observa-se que todos os grupos apresentaram o mesmo nível médio de VO_2 pico (pré-TF- WKY: $69 \pm 3,5$; WKY-T: $69 \pm 2,5$; SHR: 72 ± 2 ; SHR-T: 73 ± 36 mL. kg⁻¹.min⁻¹); entretanto, pós-TF observa-se a eficácia do treinamento com aumento do VO_2 para os grupos que treinaram (WKY-T e SHR-T) e redução para os grupos controle (WKY e SHR) (pós-TF- WKY: $58 \pm 2,5$; WKY-T: 78 ± 4 ; SHR: 61 ± 2 ; SHR-T: $84,5 \pm 2$ mL.kg⁻¹.min⁻¹).

Medida da atividade da enzima citrato sintase

A figura 3 mostra que houve aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de ratos dos grupos controle e hipertensos treinados em relação aos grupos controles sedentários (WKY: 86 ± 12 , WKY-T: 120 ± 11 , SHR: 76 ± 9 e SHR-T: 144 ± 15 nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹).

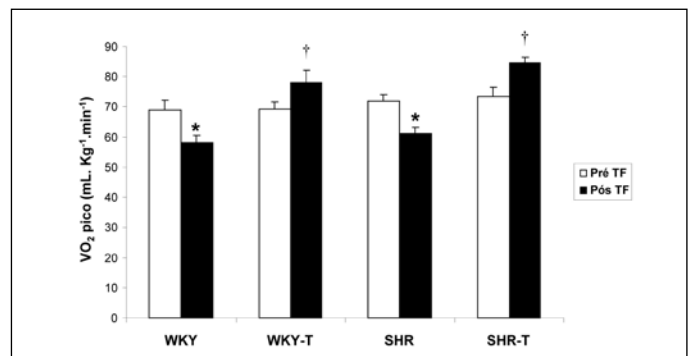


Figura 2. Consumo de oxigênio (VO_2) de pico pré e pós-TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado pré-TF e WKY-T e SHR-T pós-TF; † $P < 0,05$ comparado ao pré-TF e WKY e SHR pós-TF.

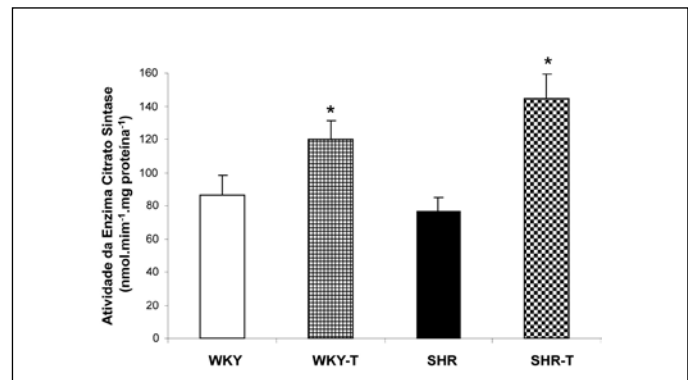


Figura 3. Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Resultados expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao WKY e SHR.

Determinação da área de seção transversa, tipos de fibra e razão capilar por fibra muscular esquelética

Análises morfológicas após o processamento histológico revelaram importantes mudanças na microcirculação muscular esquelética induzida pelo TF em ratos normotensos e hipertensos. A figura 4 mostra os resultados obtidos através da avaliação histoquímica do músculo esquelético sóleo por meio da reação da ATPase miosínica.

Como esperado, a rarefação capilar foi observada no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF foi efetivo em aumentar 47% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo WKY-T e corrigiu a rarefação capilar no grupo SHR-T quando comparados ao grupo WKY (WKY: $1,2 \pm 0,06$; WKY-T: $1,8 \pm 0,04$; SHR: $0,7 \pm 0,02$ e SHR-T: $1,1 \pm 0,04$ n° de capilares/fibra muscular) (figura 4A).

Não foi observada alteração da área de seção transversa nos diferentes tipos de fibra, como as do tipo I (WKY: 2.987 ± 52 , WKY-T: 3.053 ± 152 , SHR: 2.884 ± 145 e SHR-T: 2.939 ± 109 μ m²), tipo IIA (WKY: 2.171 ± 44 , WKY-T: 2.167 ± 20 , SHR: 1.982 ± 107 e SHR-T: 2.149 ± 47 μ m²) e tipo IIX (WKY: 1.846 ± 169 , WKY-T: 1.851 ± 65 , SHR: 1.770 ± 160 e SHR-T: 1.731 ± 144 μ m²) no músculo sóleo dos quatro grupos estudados (figura 4B). Entretanto, o TF foi efetivo em recuperar a proporção na distribuição dos tipos de fibras no grupo SHR-T, reduzindo a porcentagem de fibras do tipo IIA (tipo IIA – WKY: $4,8 \pm 1,5$; WKY-T: $2,7 \pm 1$; SHR: $18,5 \pm 1,4$ e SHR-T: $11 \pm 0,9$ %) e tipo IIX (tipo IIX – WKY: $1,1 \pm 0,2$; WKY-T: $0,88 \pm 0,1$; SHR: $3,9 \pm 0,4$ e SHR-T: $1,9 \pm 0,5$ %) em detrimento do aumento na porcentagem de fibras do tipo I (tipo I – WKY: $92,7 \pm 1,5$; WKY-T: $96,5 \pm 1,1$; SHR: $77,5 \pm 1,8$ e SHR-T: $87,2 \pm 1,3$ %), equiparando-se ao animal controle (figura 4C). É possível observar essas alterações na figura 4D pelas imagens representativas dos cortes histológicos do músculo sóleo para cada grupo estudado, pela caracterização histoquímica da atividade da ATPase miosínica.

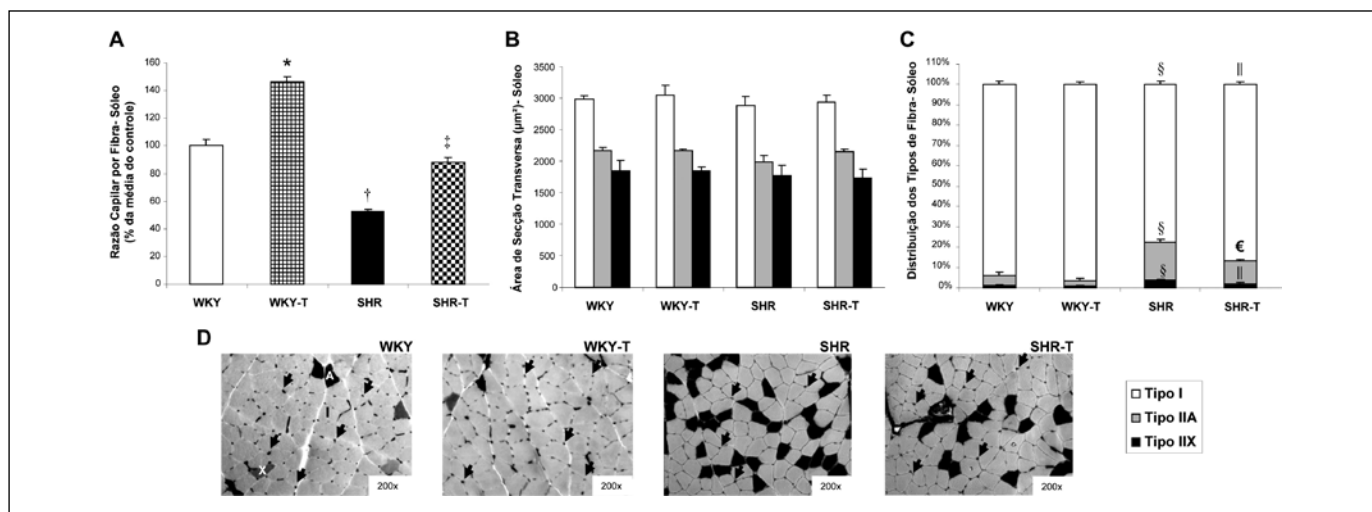


Figura 4. Caracterização histoquímica do sóleo pela reação da ATPase miosínica. Razão capilar por fibra (A), área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, IIA e IIX (B), distribuição dos tipos de fibra (D) e imagens representativas dos cortes histológicos de secções transversas do músculo no pH 10,3. As setas nas imagens apontam para os capilares e as simbologias I, A e X representam as fibras do tipo I, IIA e IIX, respectivamente. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $P < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ $P < 0,05$ vs. WKY-T e SHR; § $P < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ¶ $P < 0,01$ vs. WKY-T, € $P < 0,01$ vs. WKY, WKY-T, SHR.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito do TF aeróbio sobre as alterações estruturais e metabólicas da musculatura esquelética associadas à HA primária. Os principais resultados do estudo mostram que o TF aeróbio sobre a HA: 1) reduziu a PAS acompanhado de bradicardia de repouso; 2) aumentou a tolerância à realização do esforço; 3) aumentou o VO_2 de pico; 4) aumentou a atividade da enzima citrato sintase; e 5) corrigiu a rarefação capilar recuperando a proporção na distribuição dos tipos de fibra no músculo esquelético.

Para determinar se o protocolo de TF utilizado foi efetivo em produzir adaptações aeróbias, nos grupos de animais treinados foram mensurados os principais marcadores fisiológicos de treinamento. A melhora na capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço físico e maior VO_2 , concomitante com o aumento da atividade oxidativa muscular esquelética e a presença de bradicardia de repouso são as mais legítimas adaptações musculares esqueléticas e cardíacas do condicionamento aeróbio^{19,24}.

Na década de 60 foram realizados os primeiros estudos que constataram o potencial efeito preventivo do TF aeróbio no controle e no tratamento da PA, surgindo as primeiras evidências de redução na PA em indivíduos hipertensos que faziam exercício físico regular²⁵.

Como esperado, observamos que os grupos hipertensos apresentavam níveis elevados de PA comparados aos grupos normotensos no início do protocolo experimental. Entretanto, ao término de 10 semanas de TF, comprovamos a eficácia do treinamento de baixa intensidade e longa duração em reduzir a PAS do grupo SHR-T comparado ao grupo SHR. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, confirmando a eficácia do TF aeróbio em reduzir a PA tanto de animais geneticamente hipertensos quanto de humanos hipertensos^{16-18,26}.

O aumento da resistência vascular periférica, a responsável pela manutenção dos níveis pressóricos elevados na HA primária, é consequência de alterações estruturais e funcionais na microcirculação, que regulam o fluxo sanguíneo e a pressão³⁻⁶. Estudos mostram que a redução da PA induzida pelo TF em SHR foi correlacionada com a normalização de ambos, razão parede/luz vascular e um maior aumento da razão capilar por fibra no músculo esquelético¹⁶⁻¹⁸. De acordo com os estudos prévios¹⁶⁻¹⁸, os resultados do presente estudo confirmam que o TF de natação normaliza a rarefação capilar no músculo esquelético de SHR, o qual contribui para a redução da elevada resistência periférica total, por promover o aumento da condutância paralela da microcirculação, ou seja, facilita a passagem do fluxo sanguíneo em

decorrência do aumento do número de vasos da musculatura esquelética. Além disso, o TF aumenta a razão capilar por fibra no músculo esquelético de ratos normotensos treinados como demonstrado em vários estudos¹⁶⁻¹⁸.

Sabidamente, a angiogênese representa uma resposta adaptativa primária do músculo esquelético ao TF aeróbio, contribuindo para a melhora da capacidade aeróbia muscular (transporte, fornecimento e extração de oxigênio)²⁷. Por outro lado, músculos esqueléticos com alteração do suporte capilar e, conseqüentemente, prejuízo na oferta de oxigênio e nutrientes, sob várias condições, tais como, fatores de risco cardiovascular e DCV, estão relacionados com uma mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento de fibras do tipo II. A origem da transição de fibras do tipo I para II em músculo sóleo de SHR ainda permanece pouco conhecida, porém estudos demonstram estar relacionadas com a rarefação capilar acompanhada de mudanças nas propriedades metabólicas^{11,28}.

Estudos mostram que, quando ocorre a transição entre os tipos de fibras do músculo esquelético, as diferentes propriedades morfológicas da fibra muscular são transformadas da seguinte forma: a densidade capilar e as atividades das enzimas do metabolismo energético são alteradas precocemente durante a transição e precedem a mudança na atividade da ATPase miofibrilar e as características contráteis do músculo^{8,29}.

Em mamíferos, as fibras do músculo esquelético são geralmente classificadas em fibras do tipo I e tipo II de acordo com as diferentes atividades da ATPase miosínica após a pré-incubação em diferentes pHs, podendo as fibras do tipo II ser subclassificadas em IIA, IIX/D e IIB. As fibras do tipo II são caracterizadas por serem fibras de contração rápida com predominância do metabolismo glicolítico, ao passo que as fibras do tipo I são caracterizadas por serem fibras de contração lenta com predominância do metabolismo oxidativo^{11,30}.

Várias evidências na literatura mostram que o músculo esquelético de indivíduos hipertensos, assim como de SHR, contém maior porcentagem de fibras de contração rápida e glicolítica, ou seja, as do tipo II comparadas aos seus controles normotensos⁷⁻¹¹. Interessantemente, os resultados obtidos na composição dos tipos de fibra do músculo esquelético sóleo, músculo este utilizado neste estudo, que apresenta em média 90% de fibras do tipo I e 10% de fibras do tipo II, realizado tanto pela técnica de histoquímica pela reação da ATPase miosínica quanto pela técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE para detecção das miosinas de cadeia pesada (MHC) para cada tipo de fibra, foram positivamente correlacionadas independente da técnica empregada¹⁰.

Segundo Bortolotto *et al.*¹⁰, o principal resultado obtido em seu estudo é que em todos os estágios de hipertensão (quatro, 16 e 24 semanas), o músculo sóleo de SHR apresenta maior proporção de fibras do tipo II do que o músculo sóleo de ratos WKY, bem como de fibras híbridas, fibras estas que contêm dois tipos de MHC em uma mesma fibra muscular isolada, no caso do SHR, maior proporção de fibras híbridas IIA+IIX. A presença de maior proporção de fibras híbridas é um indicador de transição do tipo de fibra muscular no músculo em questão.

Similar aos resultados dos estudos expostos acima, no presente estudo, observamos no músculo sóleo de SHR comparado ao seu controle WKY significativa alteração na distribuição dos tipos de fibra, ou seja, uma diminuição de fibras de contração lenta e oxidativa, fibras do tipo I, e um simultâneo aumento na porcentagem de fibras do tipo IIA e IIX em paralelo com uma redução da razão capilar por fibra dessa musculatura, assim como uma pequena diminuição (12%) da atividade da citrato sintase.

Estudos recentes têm associado os efeitos do TF ao tratamento farmacológico. Minami *et al.*³¹ mostraram os efeitos do TF, associado ou não ao tratamento com perindopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina), sobre a capilaridade e os tipos de fibra no músculo sóleo de SHR. Os autores observaram que o tratamento crônico com perindopril aumenta a capacidade de exercício em animais não treinados; entretanto, esse efeito não foi sinérgico à capacidade de exercício adquirida como resultado somente de TF. Por outro lado, o tratamento com perindopril associado ao TF promove mudanças adaptativas no músculo sóleo, como aumento da densidade capilar e da porcentagem de fibras do tipo I³¹. Embora não tenha sido observada alteração na composição dos tipos de fibra nos grupos SHR treinado e SHR tra-

tado com perindopril quando comparado ao grupo SHR sedentário, os autores observaram uma maior capilarização nestes grupos, o que pode ter contribuído para melhora na capacidade de exercício. Outro estudo mais recente do mesmo grupo mostrou que o tratamento farmacológico com um bloqueador de canal de cálcio (azelnidipine), ou um antagonista do receptor de angiotensina II tipo I (olmesartan) ou mesmo o TF significativamente aumentaram a densidade capilar e a porcentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo de SHR³². Embora os resultados na literatura ainda sejam controversos no que se refere às alterações na proporção dos tipos de fibra em resposta ao TF, também não foi possível observar a comparação entre o perfil dos tipos de fibra no grupo SHR treinado comparado ao seu controle normotenso WKY, com intuito de averiguar uma normalização perante a composição nos tipos de fibra.

Notavelmente, nós mostramos pela primeira vez a evidência de que o TF aeróbio corrigiu as mudanças na composição dos tipos de fibra no músculo sóleo de SHR quando comparado ao seu controle WKY, uma vez que a capilarização e o aumento da atividade da enzima citrato sintase são umas das mais importantes adaptações ao TF aeróbio, atuando na manutenção do metabolismo oxidativo e do perfil de fibra do músculo esquelético. Portanto, esses resultados em conjunto contribuem para o aumento do consumo de oxigênio, capacidade de tolerância ao esforço e queda dos níveis pressóricos observados no grupo hipertenso treinado.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (No. 2007/56771-4; 2009/18370-3 e 2010/50048-1) e ao MCT/CNPq 14/2009 (No. 480391/2009-2) e CNPq (No. 307591/2009-3 e 159827/2011-6) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.
2. Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *J Hypertens* 2009;27:963-75.
3. Lévy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HAJ. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 2001;104:735-40.
4. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Lévy BI. Hypertension: A disease of the microcirculation? *Hypertension* 2006;48:1012-7.
5. Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol* 1989;256:126-31.
6. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Rarefaction of skin capillaries in borderline essential hypertension suggests an early structural abnormality. *Hypertension* 1999;34:655-8.
7. Juhlin-Dannfelt A, Frisk-Holmberg M, Karlsson J, Tesch P. Central and peripheral circulation in relation to muscle-fiber composition in normo- and hypertensive man. *Clin Sci* 1979;56:335-40.
8. Ben Bachir-Lamrini L, Sempore B, Mayet MH, Favier RJ. Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1990;258:352-7.
9. Lewis DM, Levi AJ, Brooksby P, Jones JV. A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fiber type composition. *Exp Physiol* 1994;79:377-86.
10. Bortolotto SK, Stephenson DG, Stephenson GMM. Fiber type populations and Ca²⁺ activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999;276:628-37.
11. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Takeda I, Tsuda K, Ishihara A. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:576-85.
12. Carlsen RC, Gray S. Decline of isometric force and fatigue resistance in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol* 1987;95:249-64.
13. Hagberg JM, Park JJ, Brown MD. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med* 2000;30:193-206.
14. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a metaanalysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 2002;136:493-503.
15. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002;346:793-801.
16. Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000;18:1563-72.
17. Amaral SL, Silveira NP, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001;19:931-40.
18. Melo RP, Jr Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 2003;42:851-7.
19. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011;58:182-9.
20. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and rate response of rats to treadmill exercise. *Am J Physiol* 1978;45:1009-14.
21. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970;23:369-79.
22. Sillau AH, Banchoo N. Visualization of capillaries in skeletal muscle by the ATPase reaction. *Pflügers Arch* 1977;369:269-71.
23. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976;154:689-700.
24. Wibom R, Hultman E, Johansson M, Mathewi K, Constantin-Teodosiu D, Schantz PG. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 1992;73:2004-10.
25. Hamer NK. Effect of walking on blood-pressure in systemic hypertension. *Lancet* 1967;2:114-8.
26. Laterza MC, De Matos LD, Trombetta IC, Braga AM, Roveda F, Alves MJ, et al. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 2007;49:1298-306.
27. Amaral SL, Papanek PE, Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1163-9.
28. Bacurau AVN, Jardim MA, Ferreira JCB, Bechara LRG, Bueno Júnior C, Alba-Loureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol* 2009;106:1631-40.
29. Brown MD, Cotter MA, Hudlicka O, Vrbova G. The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow a fast rabbit muscle. *Pflügers Arch* 1976;361:241-50.
30. Hori A, Ishihara A, Kobayashi S, Iyata Y. Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. *Acta Histochem Cytochem* 1998;31:375-84.
31. Minami N, Li Y, Guo Q, Kawamura T, Mori N, Nagasaka M, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle. *J Hypertens* 2007;25:1241-8.
32. Guo Q, Minami N, Mori N, Nagasaka M, Ito O, Kurosawa H, et al. Effects of antihypertensive drugs and exercise training on insulin sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;31:525-33.