

NATÁLIA ZAMBERLAN FERREIRA

**TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE É ASSOCIADO A DIVERGENTES ADAPTAÇÕES DA EXPRESSÃO GENICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM MODELO DE RATO DE HIPERTENSÃO**

NATÁLIA ZAMBERLAN FERREIRA

**TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE É ASSOCIADO A DIVERGENTES ADAPTAÇÕES DA EXPRESSÃO GENICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM MODELO DE RATO DE HIPERTENSÃO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:  
Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli

Presidente Prudente - SP  
2019

616.132  
F383t

Ferreira, Natália Zamberlan.

Treinamento intervalado de alta intensidade é associado a divergentes adaptações da expressão genética no músculo esquelético em modelo de rato de hipertensão / Natália Zamberlan Ferreira. -- Presidente Prudente, 2019.

46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientadora: Francis Lopes Pacagnelli.

1. Hipertensão. 2. Envelhecimento. 3. Treinamento Intervalado de Alta Intensidade. 4. Músculo Esquelético 5. Expressão Gênica. I. Título.

Catalogação: Bibliotecária - Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

**NATÁLIA ZAMBERLAN FERREIRA**

**TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE É ASSOCIADO A DIVERGENTES ADAPTAÇÕES DA EXPRESSÃO GENICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM MODELO DE RATO DE HIPERTENSÃO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 15 de fevereiro 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francis Lopes Pacagnelli  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Wilson Romero Nakagaki  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giovana Rampazzo Teixeira  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP  
Presidente Prudente - SP

## **DEDICATÓRIA**

À Deus por ter guiado o meu caminho até aqui, não me deixando vacilar frente as tribulações e me permitindo alcançar essa vitória e a Virgem Maria por ter levado minhas preces a seu Filho Jesus.

À minha família por terem sido minha inspiração todos os dias durante esses dois anos, principalmente meu esposo Victor que sempre me incentiva e me ajudava para então colhermos os frutos dessa vitória, meu filho Raul por sua compreensão durante as viagens para coleta dos dados e construção desta dissertação e finalmente a minha pequena Maitê que foi gerada junto a construção deste trabalho me dando ainda mais forças para continuar, saibam que meu amor por vocês três aumenta a cada dia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francis Lopes Pacagnelli, por ter dividido esse trabalho comigo abrindo um novo caminho de conhecimento e companheirismo, saiba que está sempre em minhas orações.

À todos que se dedicam a pesquisa em função de novas descobertas para melhorar e salvar tantas vidas. Deus os abençoe.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me proporcionou chegar até aqui, que me atendeu todas as vezes que pedia seus dons de fortaleza, sabedoria e discernimento, nunca me deixando fraquejar e me levando sempre além dos meus sonhos, me mostrando que Seus planos são completos.

À minha família, meus filhos e esposo que sempre me incentivaram a continuar estudando, mesmo com a ausência e nervosismo em alguns momentos, isso tudo só é possível porque tenho vocês ao meu lado.

Aos meus pais e irmão, que sempre torceram para que eu chegasse até aqui e fosse uma profissional cada vez melhor.

Aos docentes Dr. Katashi Okoshi, Dr. Antônio Carlos Cicogna e Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos, que colaboraram para a realização deste trabalho e aos colegas Thaoan Mariano e Francilene Lima Agostinho De Souza por toda ajuda na parte experimental, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos docentes do Mestrado em Ciências da Saúde, que de forma exemplar compartilharam seus conhecimentos, contribuindo com a minha formação profissional; e à Unoeste, pela oportunidade de estudo no Mestrado e por todo o apoio dos profissionais que nos atendem com dedicação.

À Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, que deu todo o apoio científico e tecnológico para a realização desta dissertação.

À minha amada orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francis Lopes Pacagnelli, que tem o dom divino de ensinar, por me auxiliar em todo processo da construção do conhecimento, serei eternamente grata por compartilhar comigo todo seu conhecimento científico, profissionalismo e sabedoria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Muito obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*(Madre Teresa de Calcuta)*

## **RESUMO**

### **Treinamento intervalado de alta intensidade é associado a divergentes adaptações da expressão genética no músculo esquelético em modelo de rato de hipertensão**

A hipertensão arterial e o envelhecimento ocasionam alterações musculares endoteliais que comprometem a capacidade ao exercício. Há evidências que os exercícios do tipo intervalado de alta intensidade (HIIT) também podem ser indicados para hipertensos, contudo, não há estudos que avaliem de modo comparativo esse tipo de exercício na expressão gênica de marcadores endoteliais nos músculos esqueléticos com funções distintas em ratos idosos. Foram utilizados 26 ratos machos, 12 meses de idade divididos em três grupos: espontaneamente hipertensos controle sedentário, espontaneamente hipertensos treinados e Wistar Kyoto controle sedentários. O protocolo de treinamento foi realizado em esteira adaptada para roedores, 50 minutos/dia, 5 dias/semana totalizando 8 semanas. A expressão gênica foi determinada por pela técnica de PCR em Tempo Real. Nos ratos idosos hipertensos submetidos ao HIIT houve uma resposta adaptativa divergente, mostrando influência positiva no padrão angiogênico com piora na atividade vasodilatadora no músculo sóleo e sem alteração no músculo diafragma.

**Palavras-chave:** Hipertensão, Envelhecimento, Treinamento Intervalado de Alta Intensidade, Músculo Esquelético, Expressão Gênica.

## **ABSTRACT**

### **High-intensity interval training is associated with divergent adaptations of the gene expression skeletal muscle in a rat model of hypertension**

Hypertension and aging cause endothelial muscular alterations that can compromise the exercise capacity. There is evidence that the high-intensity interval training (HIIT) can also be prescribed for hypertensives. However, there are no studies that assess in a comparative way this type of exercise in the gene expression of endothelial markers in the skeletal muscles with distinct functions in aging rats. 26 specimens of 12-month-old male rats were used, divided in three different groups: spontaneously hypertensive sedentary control, spontaneously hypertensive trained and Wistar Kyoto sedentary control. The training protocol was carried out on a treadmill adapted to rodents, 50 minutes/day, 5 days/week totalizing 8 weeks. The gene expression was determined by the real-time PCR technique. There was a divergent adaptive response in the aging hypertensive rats subjected to HIIT, showing a positive influence in the angiogenic pattern with worsening of vasodilator activity in the soleus muscle and without alteration in the diaphragm muscle.

**Key words:** Hypertension. Aging. High-Intensity Interval Training (HIIT). Skeletal Muscle. Gene Expression.

## LISTA DE SIGLAS

Δ%	- Percentual de Variação
°C	- Graus Celsius
Akt	- Proteína quinase B
ANCOVA	- Análise de Covariância
ANOVA	- Análise de Variância
cDNA	- Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEUA	- Comitê de Ética de Uso de Animais
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
ET-1	- Endotelina
G	- Gramas
GADPH	- Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HAS	- Hipertensão Arterial Sistêmica
HIIT	- Treinamento Intervalado de Alta Intensidade
m/min	- Metros por Minuto
min	- Minuto
Min/dia	- Minutos por Dia
mIR	- Ácido Ribonucleico
mmHg	- Milímetros de Mercúrio
mRNA	- Ácido Ribonucleico Mensageiro
NO	- Óxido Nítrico
NOS3	- Óxido Nítrico Sintase
PAM	- Pressão Arterial Média
PI3Kr2	- Subunidade Reguladora 2 do Fosfatidilinositol 3,4,5 Trifosfato
qPCR	- Quantitativo da Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real
RC	- Reabilitação Cardíaca
RNA	- Ácido Ribonucleico
RT-PCR	- Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real
RVP	- Resistência Vascular Periférica
SHR Ratos	- Espontaneamente hipertensos
SHR-HIIT	- Ratos Espontaneamente Hipertensos Submetidos ao Treinamento Intervalado de alta Intensidade
SHR-SED	- Ratos Espontaneamente Hipertensos Sedentários

- SP - São Paulo
- UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- UNICAMP - Universidade Estadual De Campinas
- UNIFESP - Universidade Federal do Estado de São Paulo
- VEGF - Fator Crescimento vascular endotelial
- VO2 - Consumo Máximo De Oxigênio
- WKY - Ratos Wistar-Kyoto
- $\mu\text{L}$  - Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento Experimental. HIIT: Treinamento Intervalado de Alta Intensidade; Sem.: semanas; Veloc.: velocidade; Min.: minutos.....	18
Figura 2 -	Percentual da variação ( $\Delta$ ) entre pressão arterial sistólica inicial e final. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com treinamento intervalado de alta intensidade. Testes ANOVA e Tukey. # p< 0.05 vs. SHR-SED.....	20
Figura 3 -	Evolução da variação $\Delta(\%)$ da distância (A) e tempo (B) percorridos no teste de capacidade máxima ao exercício. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com HIIT. ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. *p<0.05 vs. WKY; # p<0,05 vs. SHR-SED.....	21
Figura 4 -	Níveis de RNA dos genes A)ET-1, B)NOS3, C)PI3Kr2 e D)VEGF no músculo diafragma. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos. ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn.....	23
Figura 5 -	Níveis de RNA dos genes ET-1, NOS3, PI3Kr2 e VEGF no músculo sóleo. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com HIIT. ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. # e * p<0,05 vs WKY .....	24

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Desenho experimental.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Pressão Arterial Média .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Capacidade máxima ao exercício.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6</b>	<b>Eutanásia .....</b>	<b>18</b>
<b>2.7</b>	<b>Expressão gênica para análise do óxido nítrico, endotelina, VEGF e Pi3Kr2 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.8</b>	<b>Analise estatística.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>33</b>
	<b>ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>34</b>
	<b>ANEXO B - NORMAS DA REVISTA: JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY...</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial (HA) é uma doença crônica associada a alterações metabólicas, funcionais e estruturais de órgãos alvo (Booth, Roberts, & Laye, 2012) é o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares, ocasionando aproximadamente 17,5 milhões de mortes por ano, ou seja, 31% das mortes relatadas em todo o mundo (Mozaffarian et al., 2016). A incidência de HA aumenta em consequência do envelhecimento, sendo que um indivíduo com pressão arterial normal com mais de 50 anos de idade tem grande probabilidade de se tornar um paciente hipertenso, durante as próximas duas décadas, decorrentes do aumento da rigidez arterial relacionados a degeneração dos elementos elásticos (Franklin, 2006). O aumento da resistência vascular periférica (RVP) na HA altera as propriedades das estruturas vasculares musculares prejudicando o transporte, a permeabilidade do aporte nutricional e energético dos músculos refletindo no comprometimento da função contrátil e prejuízos na capacidade de realizar exercícios (Carlsen & Gray, 1987; Soares et al., 2016). Assim a remodelação vascular está associada ao envelhecimento e seus efeitos são reforçados pela HA (Zhang et al., 2018).

Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a partir de 6-7 meses o músculo sóleo apresenta limitações funcionais, como diminuição da resistência à fadiga e do desenvolvimento da força; alteração da sinalização da insulina e rarefação capilar (Carlsen & Gray, 1987; Soares et al., 2016). Acrescenta-se o fato de os marcadores de estresse celular e de sinalização apoptótica apresentarem elevação (McMillan et al., 2015). Embora não se conheça completamente a causa destas alterações essas estão associadas a falha no processo angiogênico (Fernandes, Magalhaes, Carmo, & Oliveira, 2012) e padrão vasomotor (Fernandes, Magalhães, Roque, Phillips, & Oliveira, 2012; Fernandes, Magalhaes, et al., 2012). Diferenças no padrão contrátil e metabólico muscular podem contribuir para essas modificações. O músculo sóleo é um importante músculo postural que se adapta de forma distinta ao músculo diafragma em condições de sobrecarga cardíaca como o que ocorre na hipertensão arterial (Bowen et al., 2017; Gomes et al., 2016).

Na HA ocorre uma desregulação na expressão gênica do óxido nítrico sintase (NOS3), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endotelina 1 (ET-1) e phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 (PI3Kr2), assim, os níveis de NOS3

e VEGF estarão diminuídos e os de endotelina-1 e PI3Kr2 aumentados (Santulli, 2016). O gene NOS3 codifica a expressão da enzima óxido sintase no endotélio, a qual é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) por meio de uma reação dependente de oxigênio. O NO desempenha importante função fisiológica no sistema vascular, atuando principalmente na vasodilatação, a inibição crônica da síntese de óxido nítrico endotelial leva a HAS por aumentar a resistência vascular periférica (Kiefer et al., 2003). A ET-1 ativa áreas específicas do sistema nervoso central, resultando em aumento do tono simpático e/ou maior liberação de hormônios vasoconstritores, além de potencializar as ações de outras substâncias vasoconstritoras (Gkaliagkousi, Gavriilaki, & Douma, 2014), assim o NO e a ET-1, agindo em sentidos opostos, regulam o tônus vascular e a pressão arterial. A perda da integridade funcional ou a disfunção endotelial está ligada a uma diminuição da expressão do NO e a um aumento da ET-1(Costa Teixeira et al., 2014).

O VEGF é a principal molécula que está envolvida a angiogênese, o NO medeia a atividade do VEGF, pois ao ligar-se a seus receptores, o VEGF inicia as cascadas de sinalização levando à produção de NO e ativação angiogênica de células endoteliais, o NO aumenta a produção de VEGF aumentando sua expressão através da ativação da Akt quinase, seguida pela indução de vários fatores de transcrição (Dulak & Józkowicz, 2003), O PI3Kr2 regula negativamente a sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), através da inibição de PI3K e da via de sinalização proteína quinase B (Akt)/NOS, impedindo assim a angiogênese (Silva, Bye, el Azzouzi, & Wisløff, 2017). ZHANG (2018) demonstra em seu estudo que os impactos da hipertensão e envelhecimento são agravados quando considerados em conjunto e resultam em uma redução na via de sinalização Akt e a interação entre hipertensão e envelhecimento podem ser responsáveis pela aceleração da remodelação vascular (Zhang et al., 2018).

Um dos tratamentos propostos para HA que tem despertado interesse da comunidade científica é o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), por ser um método de treinamento que alterna períodos de exercício aeróbico em alta intensidade, com períodos de recuperação passiva ou ativa em uma intensidade moderada-baixa, sendo usualmente praticado em cicloergômetros ou esteiras motorizadas (Smith-Ryan, Trexler, Wingfield, & Blue, 2016; Xie, Yan, Cai, & Li, 2017). Ademais o HIIT pode ser benéfico do ponto de vista de saúde pública, devido

a “falta de tempo” ser uma notável barreira de adesão a programas de treinamento físico de boa parte da população (Dalpiaz et al., 2016).

Diante da importância do exercício físico no controle da HA e as vantagens do treinamento HIIT, afigura-se imprescindível o melhor esclarecimento acerca da influência do HIIT na microcirculação muscular, e assim poder embasar a prescrição de desse exercício como forma de prevenção e tratamento da HA em idosos. Neste contexto, o HIIT pode apresentar-se como uma nova proposta não farmacológica, de baixo custo e fácil execução que pode ser implementada para o controle da HA. A hipótese deste estudo é que o HIIT promova um aumento dos fatores pró angiogênese e vasodilatadores, independente da função muscular, melhorando a microcirculação periférica em ratos hipertensos idosos. O objetivo desse estudo foi avaliar de modo comparativo a influência do HIIT na expressão gênica de marcadores vasomotores e de angiogênese no músculo diafragma e sóleo de ratos espontaneamente hipertensos idosos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), campus de Botucatu-SP, Brasil (Protocolo CEUA nº 1167-2016) e estão em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo National Research Council (NIH, publicação revisada em 2011)(Carbone, 2011).

Foram utilizados 20 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e 6 ratos Wistar Kyoto (WKY), com 3 meses de idade, provenientes dos Biotérios Centrais da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, e da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo-SP, mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Unesp de Botucatu os quais permaneceram alocados por um período de 9 meses.

Os ratos ficaram alojados em caixas plásticas, contendo de três a quatro animais em por caixa, durante todo o período anterior e durante o treinamento, com temperatura de 21º a 23ºC e umidade relativa do ar de 50% a 60%. Receberam ração (Supralab, Alisul R, Brasil) e água *ad libitum* em ciclos de luminosidade de 12 horas (claro-escuro) com início do ciclo claro às 19h (ciclo invertido). Os ratos foram randomizados por uma sequência aleatória gerada pelo excel em três grupos: espontaneamente hipertensos sedentário (SHR-SED, n=13), espontaneamente hipertensos treinados (SHR-HIIT, n=15) e Wistar Kyoto (WKY, n=10).

## **2.2 Desenho experimental**

Os ratos foram submetidos ao HIIT por 8 semanas. Antes e após iniciar o treinamento físico foram avaliados quanto a pressão arterial sistólica e o teste de capacidade máxima ao exercício. Realizou-se novo teste de capacidade máxima ao exercício para ajuste de carga no final da quarta semana nos animais submetidos ao HIIT. Ao término de oito semanas de treinamento HIIT realizou-se a eutanásia e posteriormente a avaliação expressão gênica por PCR em tempo real (Figura 1).

## **2.3 Pressão Arterial Média**

Para avaliar o controle pressórico foi verificada a pressão arterial sistólica por pleismografia, com uso do método do manguito de cauda (Narco Bio-System®, modelo 709-0610, International Biomedical, Inc, EUA) 48 horas antes e após ao período de treinamento físico. Foi calculado o percentual da variação da PAS ( $\Delta$ ):  $[(\text{valor final} - \text{valor inicial}) \div \text{valor inicial}] \times 100$  (Pagan et al., 2015).

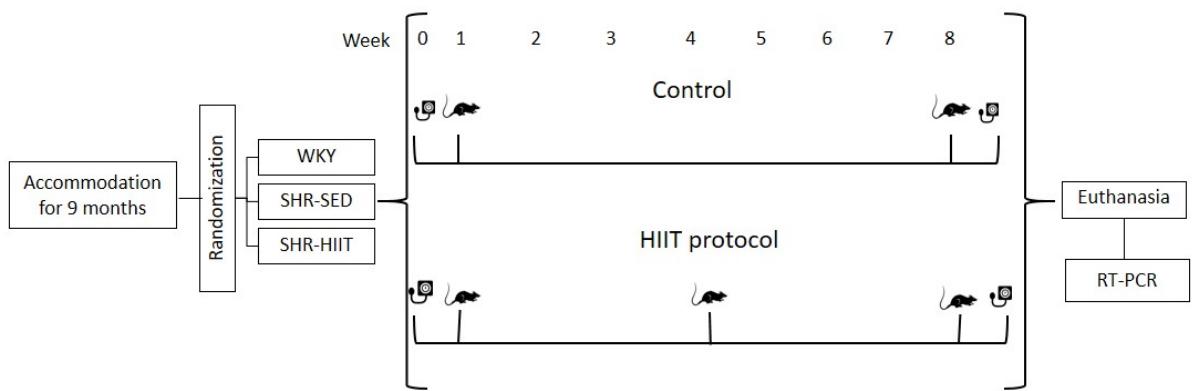
## **2.4 Capacidade máxima ao exercício**

Antes de avaliar a capacidade máxima ao exercício, os ratos foram familiarizados com a esteira rolante (modelo TK 1 – Inbramed, São Paulo, Brasil) em 6m/min, 0% de inclinação, 10 min, durante uma semana. O protocolo que avalia a capacidade ao exercício iniciou a 6m/min, aumentando 3m/min a cada 3 min até a exaustão (Pagan et al., 2015; Rossoni et al., 2011). Os ratos foram considerados em exaustão quando eles se recusavam a correr mesmo após a estimulação manual ou

quando ficaram incapazes de coordenar os passos. A capacidade funcional foi avaliada pela distância total percorrida, que foi calculada levando-se em consideração a velocidade e duração máxima do teste. Este protocolo foi realizado antes e após 4 semanas do início do treinamento para graduar a intensidade do esforço e 24 horas após o término do treinamento (Pagan et al., 2015). Foi calculado o percentual da variação  $\Delta(\%)$  da distância e do tempo.

## **2.5 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT)**

O treinamento foi realizado por aproximadamente 50 min/dia, cinco dias por semana, durante oito semanas, em ciclo invertido e adaptado de Haram et al, 2012 e de Moreira et al, 2013 (Haram et al., 2008; Moreira et al., 2013). Ocorreram nos horários entre 14h e 14h50. Cada sessão consistiu-se de três fases: aquecimento, HIIT e recuperação. O HIIT foi iniciado com 95% da velocidade alcançada no teste de exaustão por quatro minutos, intercalados com 65% da velocidade máxima por três minutos, repetidos por cinco vezes na primeira e na segunda semanas. Nas terceira e quarta semanas de HIIT, foram realizadas as mesmas velocidades da primeira, no entanto, repetidas por seis e sete vezes, respectivamente. Antes do início da quinta semana, um segundo teste foi realizado para reavaliar a velocidade máxima de exaustão; e a carga do treino foi reajustada. Na quinta e sexta semanas, o HIIT foi reajustado com 95% da velocidade máxima alcançada no segundo teste de velocidade máxima de exaustão, repetidos por sete vezes e intercalados a 65% da velocidade máxima por três minutos. Na sétima semana houve um aumento na velocidade de 15% e na oitava de 18%, intercalados a 65% da velocidade máxima por três minutos, repetido sete vezes. O desenho experimental (Figura 1) está descrito a seguir.



**Figura 1.** Delineamento Experimental. WKY: ratos Wistar-Kyoto; SHR-SED: Ratos Espontaneamente Hipertensos Sedentários; SHR-HIIT: Ratos Espontaneamente Hipertensos submetidos ao Treinamento Intervalado de alta Intensidade; HIIT:Treinamento Intervalado de Alta Intensidade; : Teste de capacidade máxima ao exercício; : Aferição pressão arterial; RT-PCR: Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real.

## 2.6 Eutanásia

Os ratos foram submetidos a eutanásia usando métodos aprovados para suas espécies específicas, estágio de desenvolvimento e tamanho. Dois dias (48 horas) após a última sessão de treinamento HIIT, os ratos foram anestesiados por uma injeção intra muscular de uma mistura de Ketamina (50 mg/kg – 1; Dopalen®) e xilazina (0,5 mg/kg – 1; Anasedan®) fornecida pelo Dr. Diego Generoso, Médico Veterinário (Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil), o nível de anestesia foi avaliado por meio de relaxamento do tônus muscular, relaxamento do tônus mandibular e a observância da ausência do reflexo de retirada do pé (Flecknell, 2015). Então, os ratos foram submetidos a eutanásia por decapitação. Isso foi realizado por um indivíduo experiente (um dos autores do presente estudo). Amostras de tecido muscular esquelético sóleo e diafragma foram retiradas, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

## 2.7 Expressão gênica para análise do óxido nítrico, endotelina, VEGF e Pi3Kr2.

A expressão de genes musculares envolvidos na angiogênese endotelial e padrão vasomotor foram analisados por PCR em tempo real. O RNA total foi

extraído do músculo sóleo e diafragma usando Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O kit de transcrição reversa cDNA e o RT-PCR (Invitrogen, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a síntese de 20 µL de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000 ng de RNA total. Os níveis de mRNA foram determinados por RT-qPCR usando os seguintes ensaios referenciados no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)): NOS3 (NM\_021838.2), ET-1 (NM\_012548.2), VEGF (NM\_001110333.2) e PI3KR2 (NM\_022185.2) (Applied Biosystems). As análises quantitativas foram feitas no sistema de detecção “Applied Biosystems StepOne Plus” usando o kit comercial TaqMan qPCR (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O mRNA dos genes alvo foi normalizado pelo gene GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1) ( NM\_017008.4) e as diferenças na expressão foram determinadas pelo método CT descrito no manual do usuário da ABI (Life Technologies).

## 2.8 Analise Estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. A normalidade e homogeneidade dos dados foram analisados usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As análises de peso corporal, distância percorrida, tempo percorrido, pressão arterial (variação da pressão arterial) e de expressão gênica foram comparados por ANOVA seguido de Tukey ou Kruskal-Wallis. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software de análise estatística GraphPad Prism® (GraphPad software, La Jolla, CA, EUA).

## 3 RESULTADOS

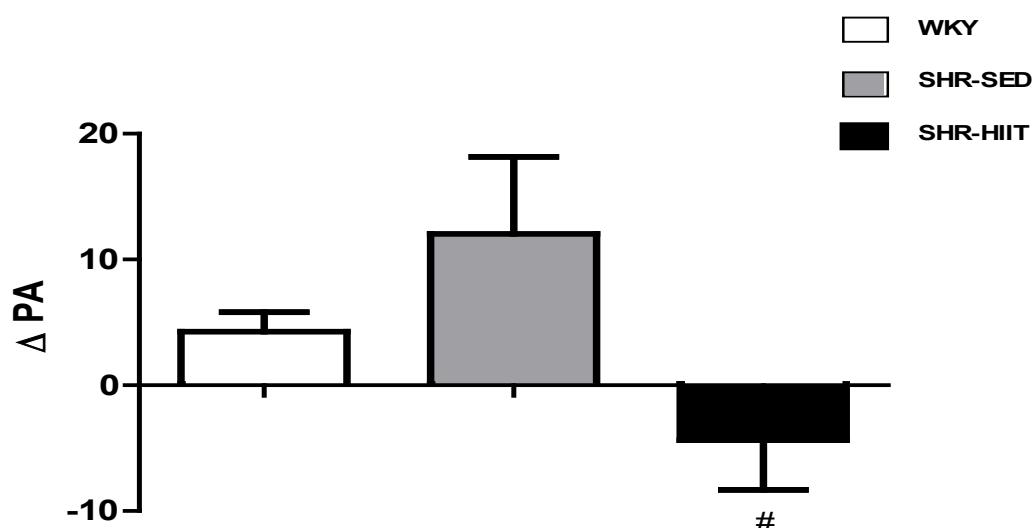
Durante o experimento morreram 12 ratos (quatro WKY, quatro SHR-SED e quatro SHR-HIIT). A Tabela 1 mostra a pressão arterial e peso corporal final. A pressão arterial média (PAM), antes e após o treinamento, foi maior nos grupos SHR-SED e SHR-HIIT comparado ao WKY. Os ratos não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (derrame pleural, ascite, taquipneia e trombo atrial).

Tabela 1. Dados anatômicos e pressão arterial. Dados média ± desvio padrão.

VARIÁVEIS	WKY (n=6)	SHR-SED (n=9)	SHR-HIIT (n=11)
PAM Inicial (mmHg)	122.14 ± 14.94	202.12 ± 42.21*	210.80 ± 7.19*
PAM Final (mmHg)	127.42 ± 16.88	223.8 ± 31.46 *	200.4 ± 19.02*
PCF (g)	601.5 ± 34.93	420.1 ± 27.72 *	352.9 ± 33.26*
Ganho de peso (g)	25.40 ± 0.91	-20.71 ± 1.13*	-26.00 ± 1.69*
Sóleo (mg)	0.24±0.03	0.29±0.05	0.29±0.04
Sóleo/PCF (mg/g)	0.40 ± 0.06	0.71 ± 0.10*	0.83 ± 0.14*
Diafragma (mg)	0.05 ± 0,01	0.039 ± 0.006*	0.03 ± 0.009*
Diafragma/PCF (mg/g)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02

WKY: ratos Wistar-Kyoto; SHR-SED: ratos sedentários espontaneamente hipertensos; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com treinamento intervalado de alta intensidade; PAM: pressão arterial média; PCF: peso corporal final. Shapiro Wilk e Tukey. \*p <0.05 vs. WKY.

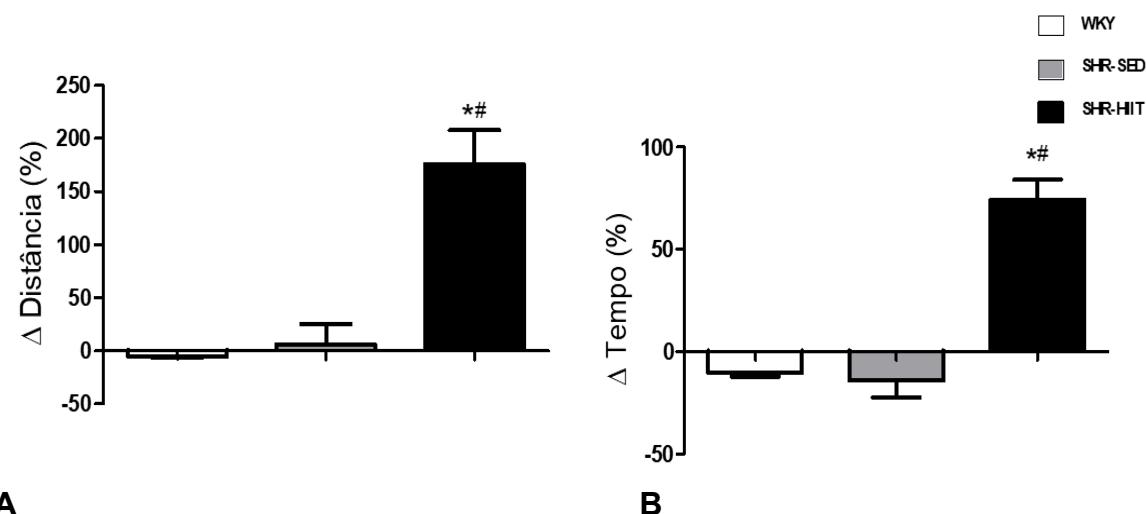
O percentual da variação da pressão arterial sistólica foi menor em 63% no grupo SHR-HIIT comparado ao grupo SHR-SED ( $p<0.001$ ). (Fig. 2).



**Figura 2.** Percentual da variação ( $\Delta$ ) entre pressão arterial sistólica inicial e final. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com treinamento intervalado de alta intensidade. Testes ANOVA e Tukey. # p< 0.05 vs. SHR-SED.

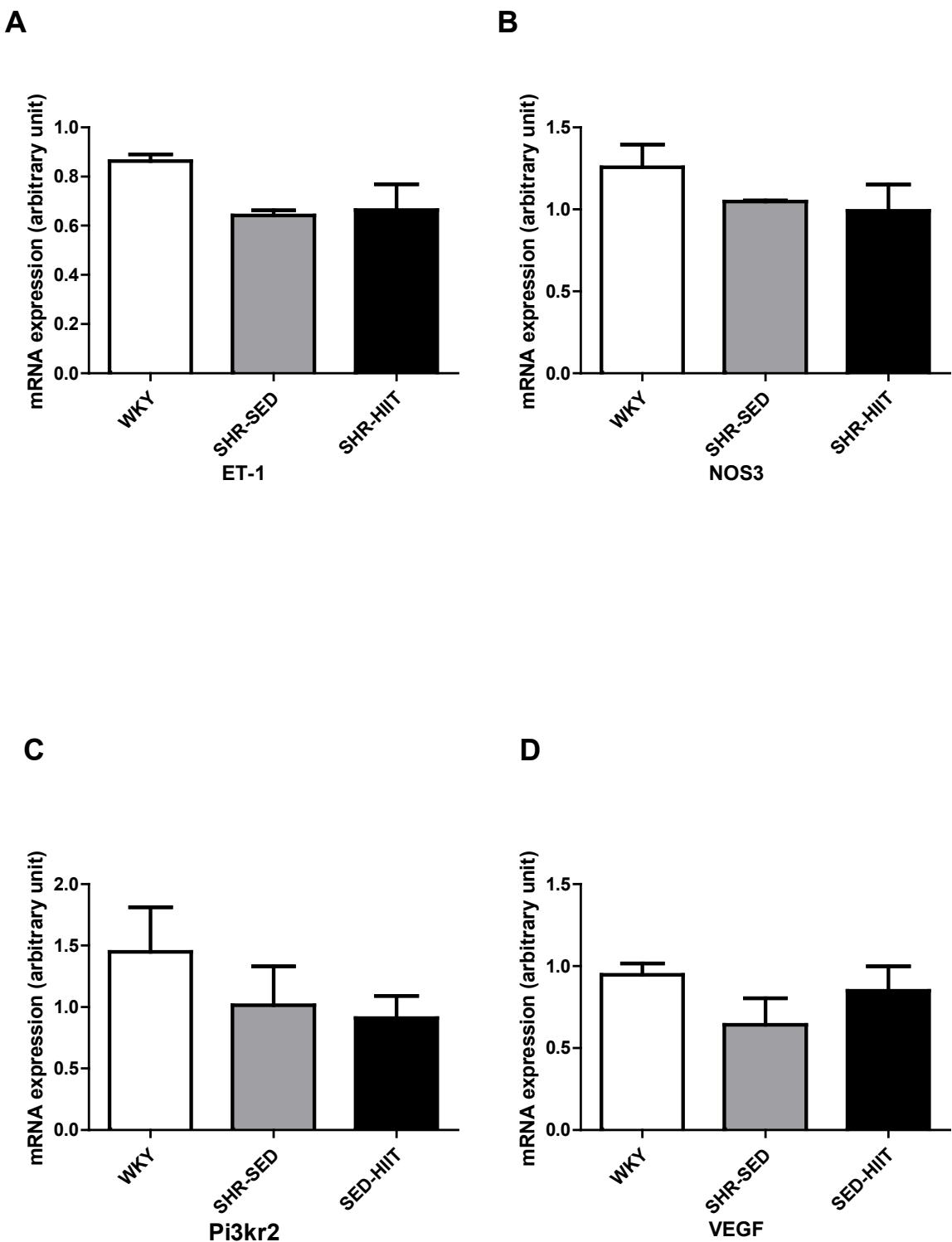
O protocolo de exercício físico aumentou a distância percorrida e o tempo no grupo SHR-HIIT comparado aos grupos sedentários. No teste de capacidade máxima ao exercício após o treinamento físico, a distância (em metros) foi 82.7% maior no grupo SHR-HIIT ( $1126.0 \pm 187.1$ ; p<0.001) em comparação ao grupo WKY ( $195.0 \pm 33.4$ , p<0.0001) e foi 74.9% maior do que o grupo SHR-SED ( $283.0 \pm 88.0$ ; p<0.0003).

A variação  $\Delta$  (%) da distância percorrida foi maior no grupo SHR-HIIT ( $176.2 \pm 104.5$ ; p<0.0002) comparado aos grupos WKY ( $-5.71 \pm 2.64$ ; p=0.0002) e SHR-SED ( $6.03 \pm 58.03$ ; p=0.0002). (Figura 3A). A variação  $\Delta$  (%) do tempo foi maior no grupo SHR-HIIT ( $74.24 \pm 32.64$ ; p=0.0001) comparado aos grupos WKY ( $-10.37 \pm 5.03$ ; p<0.0001) e SHR-SED ( $-14.22 \pm 24.13$ ; p=0.0001). (Figura 3B).



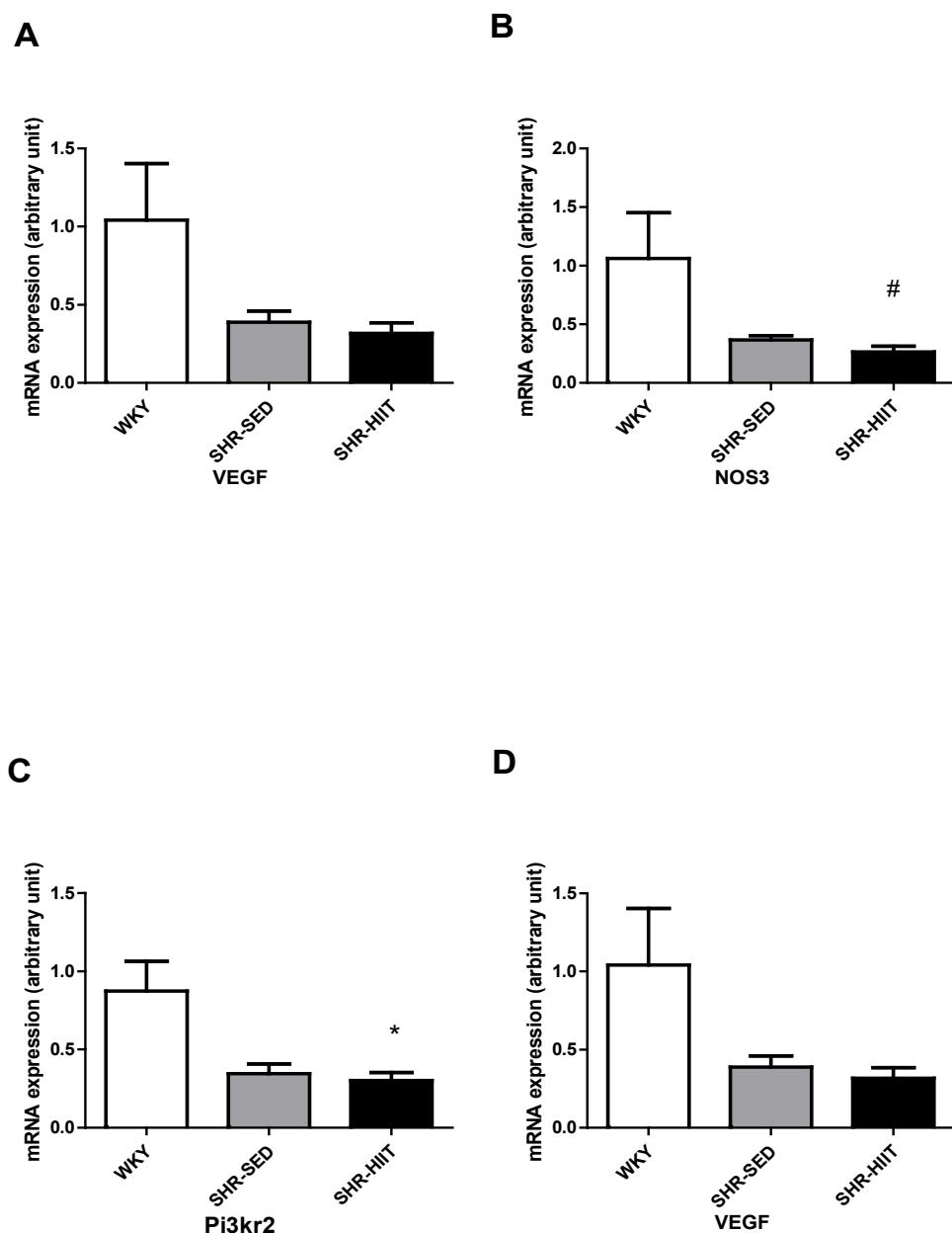
**Figura 3.** Evolução da variação  $\Delta$ (%) da distância (A) e tempo (B) percorridos no teste de capacidade máxima ao exercício. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com HIIT. ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. \*p<0.05 vs. WKY; # p<0,05 vs. SHR-SED.

No músculo diafragma não houve diferença estatística na expressão de nenhum genes avaliados: VEGF (WKY=0.94±0.15; SHR-SED=0.64 ±0.32; SHR-HIIT=0.84±0.41); PI3Kr2 (WKY=1.4±08; SHR-SED=1.01±0.63; SHR-HIIT=0.90±0.51); ET-1 (WKY= 0.86±0.05; SHR-SED= 0.64±0.4; SHR-HIIT=0.66 ±0.2) e eNOS (WHY=1.25±0.33; SHR-SED=1.04±0.01; SHR-HIIT=0.99±0.42) (Figura 4).



**Figura 4.** Níveis de RNA dos genes A)ET-1, B)NOS3, C)PI3Kr2 e D)VEGF no músculo diafragma. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos. ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn.

Em relação a expressão gênica no músculo sóleo não houve diferença estatística nos genes ET-1 (WKY=1.46±1.0; SHR-SED=0.17±0.08; SHR-HIIT=0.25±0.2) e VEGF (WKY=1.04± 0.81; SHR-SED=0.38± 0.17; SHR-HIIT=0.31± 0.18). Ocorreu a diminuição da expressão gênica do NOS3 (WKY=1.06±0.8; SHR-SED= 0.36±0,09; SHR-HIIT=0.26±0.2 com  $p= 0.090$ ) e do PI3Kr2 (WKY=0.87±0.48; SHR-SED=0.34±0.15); SHR-HIIT=0.30±0.13 com  $p=0,005$ ) nos animais hipertensos submetidos ao HIIT (Figura 5).



**Figura 5.** Níveis de RNA dos genes ET-1, NOS3, PI3Kr2 e VEGF no músculo sóleo. WKY: ratos Wistar Kyoto; SHR-SED: ratos espontaneamente hipertensos sedentários; SHR-HIIT: ratos espontaneamente hipertensos com HIIT. ANOVA e

Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. Valores expressos em média ± desvio padrão. # e \* p<0,05 vs WKY.

#### 4 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que o HIIT aplicado por 8 semanas em ratos espontaneamente hipertensos idosos promoveu a redução da variação da pressão arterial, melhorou o condicionamento físico e reduziu a expressão gênica de Pi3Kr2 e eNOS no músculo sóleo, sem alteração no músculo diafragma.

Os ratos SHR são um modelo animal de hipertensão estabelecido e amplamente utilizado em numerosos estudos, a redução da variação da pressão arterial proporcionada pelo HIIT, demonstra um efeito hipotensor em ratos SHR idosos, que deve ser enfatizado, pois o aumento da pressão arterial é um fator preditivo para o aumento da morbimortalidade cardiovascular (Haram et al., 2008). Em um estudo de Holloway et al., 2015 o HIIT aplicado por quatro semanas não reduziu a PAM em ratos hipertensos Dahl/SS jovens (Holloway, Bloemberg, da Silva, Quadrilatero, & Spriet, 2015). No nosso estudo o HIIT foi aplicado por oito semanas e promoveu um efeito hipotensor em que a senescência não foi um fator limitante, fato que pode estar relacionado ao tempo de treinamento físico para a ativação de mecanismos responsáveis pela redução da variação pressão arterial. A duração do treinamento pode ter gerado uma interferência positiva, uma vez que quanto mais idosos maior tempo de treinamento é necessário para que ocorram efeitos hipotensores (Schlüter, Schreckenberg, & da Costa Rebelo, 2010).

Apesar da existência de evidências para as adaptações positivas após o HIIT comparado com o exercício contínuo de intensidade moderada no que diz respeito à capacidade aeróbica, ainda não está claro qual o melhor tipo de treinamento físico é mais eficaz para reduzir a pressão arterial e qual é a ótima dose-resposta de exercício físico, devido ambos os tipos de treinamento podem ser eficazes na redução dos níveis pressóricos em hipertensos idosos (Izadi, Afousi, Fard, & Bigi, 2018).

Outro fato importante em nosso estudo é que o HIIT reduziu o peso corporal e teve uma tendência de redução do ganho de peso, além de gerar uma hipertrofia no músculo sóleo e sem alteração no músculo diafragma, que está fortemente relacionado com a queda da pressão arterial (Hedayati, Elsayed, & Reilly, 2011).

Alguns fatores hipotensores podem estar relacionados à redução da pressão arterial no nosso estudo como melhora do controle barorreflexo, diminuição da resistência vascular periférica e a neovascularização muscular periférica (Wisløff et al., 2007).

Conraads et al. (2015) demonstrou que 12 semanas de HIIT promoveram alterações favoráveis em alguns marcadores de saúde, como na aptidão cardiorrespiratória, na função endotelial e na qualidade de vida de pacientes em reabilitação cardíaca a partir da sexta semana de treinamento (Conraads et al., 2015). Esta melhora da aptidão cardirrespiratória também ficou evidenciada em nosso estudo pelo aumento significativo de 82,7% da distância percorrida no grupo SHR-HIIT após o período de treinamento.

O exercício físico de moderada intensidade na hipertensão gera efeitos moleculares como alterações em marcadores vasoativos principalmente o aumento da expressão NOS3 e a sinalização mediada por NO (Augeri et al., 2009; Roque et al., 2013; Spier et al., 2004), e diminuição nos níveis de endotelina-1(Gkaliagkousi et al., 2014). Em nosso estudo no músculo sóleo dos ratos hipertensos idosos submetidos ao HIIT não houve alteração da expressão gênica da ET-1, esse fato pode estar relacionado com o estágio da hipertensão (fase compensada) e com a característica muscular (oxidativo e de contração lenta)(Costa Teixeira et al., 2014). Ocorreu uma diminuição do NOS3, o que pode estar relacionado com a idade destes animais e com as características do treinamento executado, gerando um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes quanto espécies reativas de oxigênio e nitrogênio devido à produção excessiva de radicais livres(Layec et al., 2018). Jakovljevic et al.(2018) em um estudo com ratos SHR em que se comparou o HIIT com exercício de intensidade moderada sugere que o HIIT promove maior estresse oxidativo enquanto o exercício de intensidade moderada pode estar relacionado com uma perturbação mais branda da produção de pró-oxidantes e melhor resposta antioxidante (Jakovljevic et al., 2018).

No nosso estudo houve a diminuição da expressão gênica do PI3Kr2 no músculo sóleo dos ratos submetidos ao HIIT, o que demonstra uma ativação de resposta angiogênica, mesmo sem alteração significativa do VEGF, que o pode estar relacionado ao fato do VEGF encontrar-se aumentado no início do treinamento físico e na presença de uma formação capilar já aumentada, a expressão do VEGF retorna aos níveis de controle (Amaral, Sanchez, Chang, Rossoni, & Michelini,

2008). Esta resposta pode estar relacionada também com o estímulo pelo exercício do mIR 126 que é pró- angiogênese, e que age controlando a produção PI3Kr2. O mIR 126 encontra-se diminuído no músculo esquelético na HA e aumenta com o exercício físico (Silva et al., 2017).

Entretanto, Holloway et al., 2015 demonstrou em seu estudo que o HIIT aumentou a porcentagem de proteinas oxidativas, com uma redução no conteúdo de eNOS e uma redução na capilarização no músculo gastrocnemio de animais hipertensos jovens, fato este que pode estar relacionado com um desequilibrio redox local, em que ocorre níveis desproporcionais de espécies reativas de oxigenio diminuindo a jusante de VEGF e impactando na angiogênese mediada por VEGF (Holloway et al., 2015), ainda assim nos falta estudos da influencia do HIIT em ratos idosos na presença da HA.

O músculo diafragma não demonstrou modificações promovidas pela hipertensão e nem pelo HIIT nos resultados da expressão gênica do VEGF, ET-1, PI3Kr2 e NOS3. Esse fato pode estar relacionado a não alteração dessa musculatura pela hipertensão, uma vez que esses animais não estavam em insuficiênciam cardíaca, em que há maiores exigências metabólicas, contráteis e de estresse oxidativo desse músculo (Mancini, Henson, Lamanca, & Levine, 1994; Yamada et al., 2016). Entretanto, o estudo de Bowen et al, 2017, mostrou uma redução da força diafragmática e aumento do estresse oxidativo em camundongos hipertensos, com o HIIT por 2 semanas sendo capaz de prevenir essas alterações, este fato pode estar relacionado aos animais serem jovens e não idosos como em nosso estudo (Bowen et al., 2017). Para nosso conhecimento não há estudos que avaliaram a expressão gênica do diafragma de ratos idosos submetidos ao HIIT em relação a função vasomotora.

Em relação a utilização do HIIT é comprovada a sua segurança em indivíduos cardiopatas através de revisões sistemática com meta-análise (Hannan et al., 2018; Wewege, Ahn, Yu, Liou, & Keech, 2018), proporcionando melhores resultados, com uma demanda de tempo menor e aumentando a adesão aos programas de RC (Buchheit & Laursen, 2013).

Considerando os dados apresentados mais estudos são necessários para avaliar outros marcadores de padrão vasomotor e angiogênico na fase compensada

da hipertensão em animais idosos, assim como, a influência do HIIT nesses aspectos relacionados a musculatura periférica e respiratória.

## 5 CONCLUSÃO

O HIIT promoveu redução da variação da pressão arterial, melhorou a capacidade funcional e alterou a resposta vasomotora e angiogênica no músculo sóleo, sem alteração no músculo diafragma. Mostrando assim que ocorreu uma resposta adaptativa divergente músculo-dependente nos ratos hipertensos submetidos ao HIIT, em que a diminuição expressão gênica do NO evidencia uma piora da atividade vasodilatadora, a redução do PIK3r2 demonstra uma influência benéfica no padrão angiogênico no músculo sóleo, porém sem influencia no músculo diafragma durante a fase compensada da hipertensão em ratos idosos.

## REFERÊNCIAS

- Amaral, S. L., Sanchez, L. S., Chang, A. J. B. A., Rossoni, L. V., & Michelini, L. C. (2008). Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 424-431.
- Augeri, A. L., Tsongalis, G. J., Van Heest, J. L., Maresh, C. M., Thompson, P. D., & Pescatello, L. S. (2009). The endothelial nitric oxide synthase- 786 T> C polymorphism and the exercise-induced blood pressure and nitric oxide responses among men with elevated blood pressure. *Atherosclerosis*, 204(2), e28-e34.
- Booth, F. W., Roberts, C. K., & Laye, M. J. (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1143.
- Bowen, T. S., Eisenkolb, S., Drobner, J., Fischer, T., Werner, S., Linke, A., . . . Adams, V. (2017). High-intensity interval training prevents oxidant-mediated diaphragm muscle weakness in hypertensive mice. *The FASEB Journal*, 31(1), 60-71.
- Buchheit, M., & Laursen, P. B. (2013). High-Intensity Interval Training, Solutions to the Programming Puzzle. *Sports Medicine*, 43(5), 313-338. doi: 10.1007/s40279-013-0029-x
- Carbone, L. (2011). Pain in laboratory animals: the ethical and regulatory imperatives. *PloS one*, 6(9), e21578.
- Carlsen, R. C., & Gray, S. D. (1987). Decline of isometric force and fatigue resistance in skeletal muscles from spontaneously hypertensive rats. *Experimental neurology*, 95(2), 249-264.
- Conraads, V. M., Pattyn, N., De Maeyer, C., Beckers, P. J., Coeckelberghs, E., Cornelissen, V. A., . . . Hoymans, V. Y. (2015). Aerobic interval training and continuous training equally improve aerobic exercise capacity in patients with coronary artery disease: the SAINTEX-CAD study. *International journal of cardiology*, 179, 203-210.
- Costa Teixeira, B., Lopes, A. L., Oliveira Macedo, R. C., Silva Correa, C., Rozales Ramis, T., Ribeiro, J. L., & Reischak-Oliveira, A. (2014). Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. *Jornal vascular brasileiro*, 13(2).
- Dalpiaz, M. R., Dorneles, G. P., Souza, M. P., Peres, A., Monteiro, M. B., & Souza, M. P. (2016). Treinamento Intervalado de Alta Intensidade: quebrando paradigmas na reabilitação cardiovascular. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFEX)*, 10(57), 16-28.
- Dulak, J., & Józkowicz, A. (2003). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis by Nitric Oxide: Facts and Controversies. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(1), 123-132. doi: 10.1089/152308603321223612
- Fernandes, T., Magalhães, F. C., Roque, F. R., Phillips, M. I., & Oliveira, E. M. (2012). Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors. *Hypertension*, 59(2), 513-520.
- Fernandes, T., Magalhaes, F. d. C., Carmo, E. C. d., & Oliveira, E. M. d. (2012). Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertensive rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 18(6), 412-418.
- Flecknell, P. (2015). *Laboratory animal anaesthesia*: Academic press.

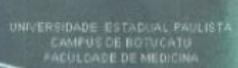
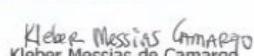
- Franklin, S. S. (2006). Hypertension in Older People: Part 1. *The Journal of Clinical Hypertension*, 8(6), 444-449. doi: doi:10.1111/j.1524-6175.2006.05113.x
- Gkaliagkousi, E., Gavrilaki, E., & Douma, S. (2014). Effects of acute and chronic exercise in patients with essential hypertension: benefits and risks. *American journal of hypertension*, 28(4), 429-439.
- Gomes, M. J., Martinez, P. F., Campos, D. H. S., #xe9, Pagan, L. U., Bonomo, C., . . . Okoshi, M. P. (2016). Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 12. doi: 10.1155/2016/8695716
- Hannan, A. L., Hing, W., Simas, V., Climstein, M., Coombes, J. S., Jayasinghe, R., . . . Furness, J. (2018). High-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training within cardiac rehabilitation: a systematic review and meta-analysis. *Open access journal of sports medicine*, 9, 1.
- Haram, P. M., Kemi, O. J., Lee, S. J., Bendheim, M. Ø., Al-Share, Q. Y., Waldum, H. L., . . . Najjar, S. M. (2008). Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular research*.
- Hedayati, S. S., Elsayed, E. F., & Reilly, R. F. (2011). Non-pharmacological aspects of blood pressure management: what are the data? *Kidney international*, 79(10), 1061-1070.
- Holloway, T. M., Bloomberg, D., da Silva, M. L., Quadrilatero, J., & Spriet, L. L. (2015). High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(11), R927-R934.
- Izadi, M. R., Afousi, A. G., Fard, M. A., & Bigi, M. A. B. (2018). High-intensity interval training lowers blood pressure and improves apelin and NOx plasma levels in older treated hypertensive individuals. *Journal of physiology and biochemistry*, 74(1), 47-55.
- Jakovljevic, B., Turnic, T. N., Jeremic, N., Jeremic, J., Bradic, J., Ravic, M., . . . Pechanova, O. (2018). The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Molecular and cellular biochemistry*, 1-11.
- Kiefer, F., Neysari, S., Humar, R., Li, W., Munk, V., & Battegay, E. (2003). Hypertension and angiogenesis. *Current pharmaceutical design*, 9(21), 1733-1744.
- Layec, G., Blain, G. M., Rossman, M. J., Park, S. Y., Hart, C. R., Trinity, J. D., . . . Hureau, T. J. (2018). Acute High-Intensity Exercise Impairs Skeletal Muscle Respiratory Capacity. *Medicine and science in sports and exercise*, 50(12), 2409-2417.
- Mancini, D. M., Henson, D., Lamanca, J., & Levine, S. (1994). Evidence of reduced respiratory muscle endurance in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 24(4), 972-981.
- McMillan, E. M., Paré, M.-F., Baechler, B. L., Graham, D. A., Rush, J. W., & Quadrilatero, J. (2015). Autophagic signaling and proteolytic enzyme activity in cardiac and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats following chronic aerobic exercise. *PloS one*, 10(3), e0119382.
- Moreira, J. B., Bechara, L. R., Bozi, L. H., Jannig, P. R., Monteiro, A. W., Dourado, P. M., . . . Brum, P. C. (2013). High-versus moderate-intensity aerobic exercise

- training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *Journal of Applied Physiology*, 114(8), 1029-1041.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., & Cushman, M. (2016). Heart disease and stroke Statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 133. doi: 10.1161/cir.0000000000000350
- Pagan, L. U., Damatto, R. L., Cezar, M. D., Lima, A. R., Bonomo, C., Campos, D. H., . . . Gimenes, R. (2015). Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(1), 61-74.
- Roque, F. R., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Galán, M., Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., . . . Oliveira, E. M. (2013). Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *British journal of pharmacology*, 168(3), 686-703.
- Rossoni, L. V., Oliveira, R. A., Caffaro, R. R., Miana, M., Sanz-Rosa, D., Koike, M. K., . . . Cachofeiro, V. (2011). Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 29(12), 2349-2358.
- Santulli, G. (2016). MicroRNAs and Endothelial (Dys) Function. *Journal of Cellular Physiology*, 231(8), 1638-1644. doi: doi:10.1002/jcp.25276
- Schlüter, K.-D., Schreckenberg, R., & da Costa Rebelo, R. M. (2010). Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. *Hypertension Research*, 33, 1155. doi: 10.1038/hr.2010.155
- Silva, G. J., Bye, A., el Azzouzi, H., & Wisløff, U. (2017). MicroRNAs as important regulators of exercise adaptation. *Progress in cardiovascular diseases*, 60(1), 130-151.
- Smith-Ryan, A. E., Trexler, E. T., Wingfield, H. L., & Blue, M. N. (2016). Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic risk factors in overweight/obese women. *Journal of sports sciences*, 34(21), 2038-2046.
- Soares, V. P., Dias, A. F., de Jesus, D. M., Nascimento, T. S., Lago, V. C., & Góes, A. L. B. (2016). CORRELAÇÃO ENTRE FORÇA MUSCULAR E CAPACIDADE FUNCIONAL EM HIPERTENSOS. *Revista Pesquisa em Fisioterapia*, 6(1).
- Spier, S. A., Delp, M. D., Meininger, C. J., Donato, A. J., Ramsey, M. W., & Muller-Delp, J. M. (2004). Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *The Journal of physiology*, 556(3), 947-958.
- Wewege, M. A., Ahn, D., Yu, J., Liou, K., & Keech, A. (2018). High&#x2010;Intensity Interval Training for Patients With Cardiovascular Disease&#x2014;Is It Safe? A Systematic Review. *Journal of the American Heart Association*, 7(21), e009305. doi: doi:10.1161/JAHA.118.009305
- Wisløff, U., Støylen, A., Loennechen, J. P., Bruvold, M., Rognmo, Ø., Haram, P. M., . . . Lee, S. J. (2007). Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. *Circulation*, 115(24), 3086-3094.
- Xie, B., Yan, X., Cai, X., & Li, J. (2017). Effects of high-intensity interval training on aerobic capacity in cardiac patients: a systematic review with meta-analysis. *BioMed research international*, 2017.

- Yamada, K., Kinugasa, Y., Sota, T., Miyagi, M., Sugihara, S., Kato, M., & Yamamoto, K. (2016). Inspiratory muscle weakness is associated with exercise intolerance in patients with heart failure with preserved ejection fraction: a preliminary study. *Journal of cardiac failure*, 22(1), 38-47.
- Zhang, L., Zhaoxia, X., Ying, W., Jingwen, L., Fanxing, Z., & Lijun, S. (2018). Akt/eNOS and MAPK signaling pathways mediated the phenotypic switching of thoracic aorta vascular smooth muscle cells in aging/hypertensive rats. *Physiological research*, 67(4).

**ANEXOS**

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO ÉTICA

	<div style="text-align: center;">            UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA          CAMPUS DE BOTUCATU          FACULDADE DE MEDICINA       </div>	 FACULDADE DE MEDICINA <b>FMB</b> 1963 BOTUCATU	 Comissão de Ética no Uso de Animais <small>Criada através da Portaria DFM nº 811 de 13/12/2012</small>												
<b>CERTIFICADO Nº 1167/2016-CEUA</b>															
<p>Projeto de Pesquisa (<b>Protocolo CEUA 1167-2016</b>) Análise da influência do treinamento intervalado de alta intensidade na remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos, a ser conduzido por Francilene Lima Agostinho de Souza, orientada pelo Prof. Dr. Francis Lopes Pacagnelli, com a colaboração de Antônio Carlos Cicogna, Dijon Henrique Salomé de Campos e Katashi Okoshi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.</p>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Vigência do projeto</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">26/09/2016</td> </tr> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Espécie/Linhagem</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">Rato/Wistar - SHR</td> </tr> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Nº de animais</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">10 + 20 (SHR) = <b>30</b></td> </tr> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Peso/Idade</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">250 gramas/4 meses</td> </tr> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Sexo</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">Macho</td> </tr> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><b>Origem</b></td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">Biotério UNICAMP - CEMIB</td> </tr> </table>				<b>Vigência do projeto</b>	26/09/2016	<b>Espécie/Linhagem</b>	Rato/Wistar - SHR	<b>Nº de animais</b>	10 + 20 (SHR) = <b>30</b>	<b>Peso/Idade</b>	250 gramas/4 meses	<b>Sexo</b>	Macho	<b>Origem</b>	Biotério UNICAMP - CEMIB
<b>Vigência do projeto</b>	26/09/2016														
<b>Espécie/Linhagem</b>	Rato/Wistar - SHR														
<b>Nº de animais</b>	10 + 20 (SHR) = <b>30</b>														
<b>Peso/Idade</b>	250 gramas/4 meses														
<b>Sexo</b>	Macho														
<b>Origem</b>	Biotério UNICAMP - CEMIB														
<p><b>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/02/2016</b></p> <p style="text-align: center; color: red;">Recomendação: A anestesia deverá ser aplicada por via peritoneal e não venosa.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;">            Prof. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha          Vice-Presidente da CEUA       </div> <div style="text-align: center;">            Kleber Messias de Camargo          Secretário da CEUA       </div> </div> <p style="text-align: center; font-size: small;">         Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-870 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail: secretaria_kleber@fmb.unesp.br       </p>															

## ANEXO B – NORMAS DA REVISTA: *Journal of Cellular Physiology*

# Author Guidelines

## TABLE OF CONTENTS

1. [Submission](#)
2. [Aims and Scope](#)
3. [Manuscript Categories and Requirements](#)
4. [Preparing the Submission](#)
5. [Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
6. [Author Licensing](#)
7. [Publication Process After Acceptance](#)
8. [Post-Publication](#)
9. [Contact Details](#)

### 1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission of a paper will be held to imply that it is unpublished work which is not being considered for publication elsewhere. If accepted, it is expected that the paper will not be published in another journal or book in either the same or another format or language.

Once the submission has been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online via ScholarOne at [mc.manuscriptcentral.com/jcp-wiley](http://mc.manuscriptcentral.com/jcp-wiley). Click [here](#) for more details on how to use ScholarOne.

The submission system will prompt the author to use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish their work from that of other researchers. [Click here](#) to find out more.

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

For help with submissions, authors should contact the Editorial Office: [jrnlcphys@wiley.com](mailto:jrnlcphys@wiley.com).

### **Preprints**

The *Journal of Cellular Physiology* will consider submissions that have previously been made available online, either on a preprint server like arXiv, bioRxiv, or PeerJ PrePrints, or on the authors' own website. However, any such submissions must not have been published in a scientific journal, book or other venue that could be considered formal publication. Authors must inform the editorial office at submission if their paper has been made available as a preprint.

- Authors of accepted papers that were made available as preprints must be able to assign copyright to The *Journal of Cellular Physiology*, or agree to the terms of the Wiley Open Access agreement and pay the associated fee.
- Given that the measurable impact of the article is diminished when citations are split between the preprint and the published article, authors are required to:
  - Update the entry on the preprint server so that it links to and cites the DOI for the published version
  - Cite only the published article themselves

## 2. AIMS AND SCOPE

The *Journal of Cellular Physiology* publishes reports of high biological significance in areas of eukaryotic cell biology and physiology, focusing on those articles that adopt a molecular mechanistic approach to investigate cell structure and function. There is appreciation for the application of cellular, biochemical, molecular and *in vivo* genetic approaches, as well as the power of genomics and proteomics. In particular, the Journal actively encourages submission of high-interest papers investigating the genetic and epigenetic regulation of growth and differentiation by growth factors, cytokines and their cognate receptors as well as signal transduction pathways and conditions that influence the expression, integration and activities of these physiological mediators. Similarly, the Journal actively encourages submission of manuscripts exploring the regulation of growth and differentiation by cell adhesion molecules as well as the interplay between these processes and those induced by growth factors and cytokines. Studies on the genes and processes that regulate cell cycle progression and phase transition in eukaryotic cells, and the mechanisms that determine whether cells enter quiescence, proliferate or undergo apoptosis are also welcomed. Submission of papers that address contributions of the extracellular matrix to cellular phenotypes and physiological control as well as regulatory mechanisms governing fertilization, embryogenesis, gametogenesis, differentiation, development, stem cell biology and dynamic parameters of cell motility are encouraged. Finally, the investigation of basic changes that differentiate cancer cells from normal cells including studies on the properties and functions of oncogenes and tumor suppressor genes will remain as one of the major interests of the Journal.

[Return to the Table of Contents](#)

## 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

The *Journal of Cellular Physiology* publishes the following contribution types:

- Research Articles
- Review Articles
- Mini-Review Articles
- Rapid Communications
- Perspectives
- From the Bench

### Reviews and Mini-Reviews

Publication of Reviews and Mini-Reviews is accelerated. We welcome the opportunity to assist you to facilitate the preparation of your manuscript.

The word limit for Reviews is 10,000-12,000 and the word limit for Mini-Reviews is 5,000-7,000. The word limit does not include references, of which the limit is 100. The Abstract word limit is 250. There is no limit on figures and tables.

### Perspectives

The Perspectives section of the *Journal of Cellular Physiology* provides a forum for editorial commentary on timely issues that are within the scope of the Journal. Perspectives are restricted to 600 words with a maximum of 15 references and there are no figures or tables. The Abstract is confined to 100 words.

### From the Bench

From the Bench section of the *Journal of Cellular Physiology* presents novel techniques and strategies. Each article concisely evaluates opportunities, strengths and limitations of experimental approaches that can expand insight into biology and pathology. Specific protocols are encouraged for inclusion as supplementary material. "From the Bench" articles will be available on PubMed.

The objective is to provide access to novel experimental strategies. "From the Bench" articles should be developed to enhance awareness of capabilities to resolve complexities of cell structure and function. Submission of articles that focus on development of technologies and

instrumentation to enable exploration of regulatory mechanisms previously unapproachable are encouraged. Coverage of topics can include (but not limited) to:

- Cell-based and animal models for in vitro and in vivo validation of molecular components to regulatory networks that mediate cell cycle control, proliferation, phenotype, cell fate and responsiveness to physiological cues.
- Breakthroughs in imaging and experimental approaches to discriminate subtleties in common or total control contributing to resolve and complexities in biological processes that include development, lineage commitment, tissue remodeling, apoptosis, pluripotency transformation and tumorigenesis.
- Capabilities to acquire, configure and integrate data from rapidly evolving, high throughput genomic and proteomic screens.
- Bioinformatic strategies that support dimensions for biological control that link to the prevention, early detection and treatment of human disease.

**Presentation:** Begin each “From the Bench” with an introduction that provides the background for the method. Focus on the unique capabilities of the approach to address compelling biological/biomedical questions. Highlight opportunities to increase resolution and/or scope of structural as well as regulatory parameters that can be evaluated.

The method should then be presented with schematic illustrations and described with emphasis on instrumentation, resolution, experimental applications and complexities with alternative strategies. Validation should be presented and examples of data that can be anticipated are encouraged. Considerations of options to accommodate specialized requirements is informative.

“From the Bench” should not exceed 2500–3500 words. To maximize the utility of “From the Bench” it is important for descriptions of technology to be accessible to a broad audience.

Experimental protocols and specifications for instrumentation and reagents are valuable; but, in general, will be presented as supplemental material that is available online. “From the Bench” articles will be invited by the Journal of Cellular Physiology editors to cover emerging methods and strategies. However, authors are encouraged to submit unsolicited manuscripts or letters of inquiry to the editorial office.

[Return to the Table of Contents](#)

## 4. PREPARING THE SUBMISSION

### Cover Letters

Rapid Communications, Perspectives, and Review Articles should include a cover letter that highlights the submission category.

### Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

### Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#)). The tile should be 16 words or less;
- A short running title of less than 40 characters;
- The full names of the authors;
- The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Abstract and keywords;
- Main text;
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figure legends;
- Appendices (if relevant)

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

### **Authorship**

Please refer to The *Journal of Cellular Physiology*'s Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

### **Acknowledgements**

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

### **Conflict of Interest Statement**

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

### **Abstract**

In 150 words describe capability of the method to provide novel insights into biological/biomedical control. Indicate applications for resolving fundamental regulatory mechanisms and/or clinically relevant questions. Present validations for the approach and summarize strengths as well as potential limitations. Please provide main keywords.

### **Graphical Abstract**

During the submission process, authors will be asked for a graphical abstract to appear in the online Table of Contents listing for each published issue. This graphical abstract will consist of one of the article's figures and an abbreviated abstract. These images are meant to attract reader interest and may encapsulate a key result or conclusion of the article. The abbreviated abstract text should be a brief non-technical summary of 2-3 sentences highlighting the key findings of the paper. It should complement, not repeat, the title of the article.

### **Keywords**

Please provide up to 5-7 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh).

### **Main Text**

- The *Journal of Cellular Physiology* uses British/US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

### **References**

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. References should be limited to 50. (A maximum of 25 table and figure footnotes is allowed if necessary).

Examples of APA references are listed below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

#### *Journal*

#### *article*

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*,

159, 483–486.

<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483>

#### Book

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

#### Internet

#### Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from [www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs](http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs)

#### **Endnotes**

Endnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep endnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper.

#### **Footnotes**

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

#### **Figure Legends**

Legends should be concise but comprehensive—the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

#### **Tables**

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

#### **Figures**

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. Click [here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

No more than 8 figures may be presented, approximately equivalent of 3 pages-worth total.

#### **Color Figures**

Figures submitted in color may be reproduced in color online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If an author would prefer to have figures printed in color in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

#### **Supporting Information**

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Click [here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

#### **General Style Points**

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the [Bureau International des Poids et Mesures \(BIPM\)](#) website for more information about SI units.
- **Numbers:** Numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

### **Resource Identification Initiative**

The *Journal of Cellular Physiology* supports the [Resource Identification Initiative](#), which aims to promote research resource identification, discovery, and reuse. This initiative, led by the [Neuroscience Information Framework](#) and the [Oregon Health & Science University Library](#), provides unique identifiers for antibodies, model organisms, cell lines, and tools including software and databases. These IDs, called Research Resource Identifiers (RRIDs), are machine-readable and can be used to search for all papers where a particular resource was used and to increase access to critical data to help researchers identify suitable reagents and tools.

Authors are asked to use RRIDs to cite the resources used in their research where applicable in the text, similar to a regular citation or Genbank Accession number. For antibodies, authors should include in the citation the vendor, catalogue number, and RRID both in the text upon first mention in the Methods section. For software tools and databases, please provide the name of the resource followed by the resource website, if available, and the RRID. For model organisms, the RRID alone is sufficient.

Additionally, authors must include the RRIDs in the list of keywords associated with the manuscript.

#### **To Obtain Research Resource Identifiers (RRIDs):**

1. Use the [Resource Identification Portal](#), created by the Resource Identification Initiative Working Group.
2. Search for the research resource (please see the section titled “Search Features and Tips” for more information).
3. Click on the “Cite This” button to obtain the citation and insert the citation into the manuscript text.

If there is a resource that is not found within the Portal, authors are asked to register the resource with the appropriate resource authority. Information on how to do this is provided in the “Resource Citation Guidelines” section of the Portal.

If any difficulties in obtaining identifiers arise, please contact [rii-help@scicrunch.org](mailto:rii-help@scicrunch.org) for assistance.

#### **Example Citations:**

Antibodies: "Wnt3 was localized using a rabbit polyclonal antibody C64F2 against Wnt3 (Cell Signaling Technology, Cat# 2721S, RRID: AB\_2215411)"

Model Organisms: "Experiments were conducted in *c. elegans* strain SP304 (RRID:CGC\_SP304)"

Cell lines: "Experiments were conducted in PC12 CLS cells (CLS Cat# 500311/p701\_PC-12, RRID:CVCL\_0481)"

Tools, Software, and Databases: "Image analysis was conducted with CellProfiler Image Analysis Software, V2.0 (<http://www.cellprofiler.org>, RRID:nif-0000-00280)"

## **Wiley Author Resources**

**Manuscript Preparation Tips:** Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, we encourage authors to consult Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

**Editing, Translation, and Formatting Support:** [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

### **Video Abstracts**

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in *The Journal of Cellular Physiology*. You can learn more about it by clicking [here](#). If you have any questions, please direct them to [videoabstracts@wiley.com](mailto:videoabstracts@wiley.com).

## **5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS**

### **Peer Review and Acceptance**

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

### **Human Studies and Subjects**

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form](#) available for use.

### **Animal Studies**

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the [US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).
- UK authors should conform to UK legislation under the [Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986 Amendment Regulations \(SI 2012/3039\)](#).
- European authors outside the UK should conform to [Directive 2010/63/EU](#).

### **Clinical Trial Registration**

The *Journal of Cellular Physiology* requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

### **Research Reporting Guidelines**

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognized research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- Randomised trials: [CONSORT](#)
- Observational studies: [STROBE](#)
- Systematic reviews: [PRISMA](#)
- Case reports: [CARE](#)
- Qualitative research: [SRQR](#)
- Diagnostic / prognostic studies: [STARD](#)
- Quality improvement studies: [SQUIRE](#)
- Economic evaluations: [CHEERS](#)
- Animal pre-clinical studies: [ARRIVE](#)
- Study protocols: [SPIRIT](#)
- Clinical practice guidelines: [AGREE](#)

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- [Future of Research Communications and e-Scholarship \(FORCE11\)](#)
- [National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines](#)
- [The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues](#)
- [Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities \(MIBBI\) website](#)
- [FAIRsharing website](#)

### **Species Names**

Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

### **Genetic Nomenclature**

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; examples of acceptable nomenclature are provided here: [varnomen.hgvs.org](#).

### **Sequence Data**

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: '*These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number #####*'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): [www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)
- EMBL Nucleotide Archive: [www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena)
- GenBank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

**Proteins sequence data** should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): [pir.georgetown.edu](http://pir.georgetown.edu)
- SWISS-PROT: [www.expasy.ch/sprot/sprot-top](http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top)

### ***Image Manipulation***

Changes to images can create misleading results when research data are collected as images. Thus inappropriate image manipulation is one form of fabrication or falsification that journals can identify.

It may, however, be legitimate and even necessary to edit images. For example, the selective enlargement of part of an artwork may be needed to reveal features that would not otherwise be visible, and editing of video data may be needed to protect the privacy of participants.

**The six CLIP (Clinical and Laboratory Images in Publications) principles** present guidance for documenting and publishing clinical and laboratory images. The Office of Research Integrity provides **forensic tools** for quick examination of **scientific images and samples**.

- Specific features within an image should not be enhanced, obscured, removed, moved, or introduced.
- Original unprocessed images must be provided by authors should any indication of enhancement be identified. We suggest that original unprocessed images should be submitted alongside any images that have been processed.
- Adjustments to brightness or contrast are only acceptable if they apply equally across the entire image and are applied equally to controls, and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the information originally captured.
- Excessive manipulations, such as processing to emphasize one region in the image at the expense of others, are inappropriate, as is emphasizing experimental data relative to the control.
- Nonlinear adjustments or deleting portions of a recording must be disclosed in a figure legend.
- Constructing figures from different gels, fields, exposures, and experimental series is discouraged. When this is necessary the component parts of composite images should be indicated by dividing lines clearly demarcated in the figure, and described in the legend.

These recommendations are based on guidance developed at the **Journal of Cell Biology** and **Rossner and Yamada's discussion**. Cromeys discusses image manipulation in "**Avoiding twisted pixels: ethical guidelines for the appropriate use and manipulation of scientific digital images.**"

### ***Conflict of Interest***

The *Journal of Cellular Physiology* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

### ***Funding***

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

### ***Authorship***

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

**Joint first or senior authorship:** In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

### **Data Sharing and Data Accessibility**

Please review Wiley's policy [here](#). The *Journal of Cellular Physiology* expects but does not require data sharing.

All accepted manuscripts are required to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. The *Journal of Cellular Physiology* recognizes the many benefits of archiving research data. The *Journal of Cellular Physiology* expects you to archive all the data from which your published results are derived in a public repository. The repository that you choose should offer you guaranteed preservation (see the registry of research data repositories at <https://www.re3data.org/>) and should help you make it findable, accessible, interoperable, and re-useable, according to [FAIR Data Principles](#).

The *Journal of Cellular Physiology* notes that FAIR data sharing allows for access to shared data under restrictions (e.g., to protect confidential or proprietary information) but notes that the FAIR principles encourage you to share data in ways that are as open as possible (but that can be as closed as necessary). If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. If you cannot share the data described in your manuscript, for example for legal or ethical reasons, or do not intend to share the data then you must provide the appropriate data availability statement. Sample statements are available [here](#). If published, all statements will be placed in the heading of your manuscript.

### **Publication Ethics**

The *Journal of Cellular Physiology* is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note The *Journal of Cellular Physiology* uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Manuscripts with a high level of textual overlap with previous literature may be returned or withdrawn prior to peer review.

Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

### **ORCID**

As part of The *Journal of Cellular Physiology*'s commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information [here](#).

## 6. AUTHOR LICENSING

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please click [here](#). (Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used; to check this please click [here](#).)

**Self-Archiving Definitions and Policies:** Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

**Open Access fees:** Authors who choose to publish using OnlineOpen will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

**Funder Open Access:** Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

## 7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

### Accepted Article Received in Production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). They will be asked to sign a publication license at this point.

### Accepted Articles

The *Journal of Cellular Physiology* offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts accepted for publication. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the Version of Record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Accepted Articles are indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

### Proofs

Once the paper has been typeset, the author will receive an email notification of the URL from where to download the typeset page proofs of the article in PDF format; associated forms and full instructions on how to correct and return the file are also provided.

Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process and thus the proofs must be checked carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt.

### Publication Charges

There are no mandatory charges to authors publishing in the *Journal of Cellular Physiology*.

Authors may choose to publish in an open access format through OnlineOpen, which carries a fee (see the section on Author Licensing).

**Color figures** may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in color in print. If the author supplies color figures at Early View publication, they will be invited to complete a color charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request

an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

### **Cover Image Submissions**

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow [these general guidelines](#).

Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process and thus the proofs must be checked carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt.

### **Early View**

The *Journal of Cellular Physiology* offers rapid publication via Wiley's Early View service. [\*\*Early View\*\*](#)articles (first online Version of Record) are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue of *Journal of Cellular Physiology*. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as the proofs are carefully reviewed. Once the article is published in Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable using the Digital Object Identifier (DOI) and carries an online publication date.

[Return to the Table of Contents](#)

## **8. POST PUBLICATION**

### **Access and Sharing**

When an article is published online:

- The author will receive an email alert (if requested).
- Authors can share a link to their published article through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

### **Promoting an Article**

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in the *Journal of Cellular Physiology*. You can learn more about it [here](#). If you have any questions, please direct them to [videoabstracts@wiley.com](mailto:videoabstracts@wiley.com).

For ideas and guidance on how to self-promote a research article, authors should visit [www.wileyauthors.com/maximize](http://www.wileyauthors.com/maximize).

### **Measuring the Impact of an Article**

Wiley helps authors to measure the impact of their research through specialist partnerships with [\*\*Kudos\*\*](#) and [\*\*Altmetric\*\*](#).

[Return to the Table of Contents](#)

## **9. CONTACT DETAILS**

A complete list of contacts for the *Journal of Cellular Physiology* is available on the journal's [\*\*Contacts page\*\*](#).