



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**THAYNARA ZANONI D'ALMEIDA**

**IMPACTO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE  
O ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Presidente Prudente - SP  
2020



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**THAYNARA ZANONI D'ALMEIDA**

**IMPACTO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE  
O ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:  
Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli

Presidente Prudente - SP  
2020

615.82  
D148i

D'Almeida, Thaynara Zanoni.

Impacto do treinamento intervalado de alta intensidade sobre o estresse oxidativo do músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos / Thaynara Zanoni D'Almeida. – Presidente Prudente, 2020. 412f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Francis Lopes Pacagnelli

1. Exercício. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Insuficiência cardíaca. 4. Comportamento sedentário. I. Título.

Catálogo na Fonte: Michele Mogni – CRB 8/6204

**THAYNARA ZANONI D'ALMEIDA**

**IMPACTO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE  
O ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 26 de junho de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste  
Presidente Prudente – SP

---

Prof. Dr. Guilherme Akio Tamura Ozaki  
Universidade Paulista – UNIP  
Araçatuba – SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico à minha família, que se dedicaram ao máximo para que eu conquistasse todos os meus sonhos até agora e sempre foram pilar em minha jornada me mantendo em pé.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela força e coragem durante esta caminhada.

Agradeço ao mundo por mudar as coisas, não deixando serem da mesma forma, pois assim não existiria o que pesquisar e descobrir.

À minha família e namorado que, com muito carinho e apoio, acreditaram em mim.

Aos docentes Dr. Katashi Okoshi, Dr. Antônio Carlos Cicogna, Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos e Dra. Camila Correa, que colaboraram para a realização deste trabalho e aos colegas Francilene Lima Agostinho de Souza, Thaoan Bruno Mariano e Nathalia Zamberlan Ferreira pela ajuda na parte experimental, vocês foram fundamentais para a concretização do trabalho.

Aos docentes do Mestrado em Ciência Animal, que compartilharam seu conhecimento, contribuindo com minha formação profissional; e à Unoeste, pela oportunidade de estudo no Mestrado e por todo o apoio dos profissionais que nos atendem com dedicação, especialmente Keid Ribeiro Kruger e Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo.

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

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Francis Lopes Pacagnelli, uma segunda mãe, que me aceitou como sua orientanda e dividiu comigo seus projetos e sonhos. Não tenho como agradecer tudo o que fez por mim. Você é uma pessoa iluminada, daquelas diferentes que apareçam e marcam nossas vidas. Obrigada por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, sempre me incentivando e compartilhando comigo dos meus choros e sorrisos. E no fim de cada conversando me motivando com a seguinte frase “Tenho certeza que você consegue e dá conta Thaynara”. Obrigada por tudo.

A Profa. Dra. Inês Cristina Giometti e o Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho pela ajuda nas análises do projeto e disponibilização de seus laboratórios e tempo para parte do experimento.

A Banca examinadora por ter aceito o convite e por toda colaboração para melhora do trabalho.

À CAPES pelo incentivo financeiro concedido: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.!”

Obrigada a todos!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda  
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”  
(Arthur Schopenhauer)*



## RESUMO

### **Impacto do treinamento intervalado de alta intensidade sobre o estresse oxidativo do músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos**

O sedentarismo é fator de risco para o desenvolvimento e a progressão de diversas doenças, destacando-se as cardiovasculares, como a hipertensão arterial (HA), que afetam a qualidade de vida e a capacidade funcional. A elevação contínua da pressão arterial, pode evoluir para insuficiência cardíaca (IC), gerando manifestações musculares, como o aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética. O complexo NADPH oxidase é uma das principais fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) e dentre suas vias de sinalização estão o Nf-Kb e o I $\kappa$ -B. O exercício físico é o melhor método de combate e dentre eles os exercícios do tipo intervalado de alta intensidade (HIIT) vêm sendo muito utilizados em indivíduos com HA. Essa modalidade tem como característica otimizar o tempo e assim promover maior adesão, além disso também são superiores aos exercícios aeróbios contínuos por oferecer maiores ganhos de aptidão cardiorrespiratória (VO<sub>2</sub> máximo). Ainda não estão elucidados a influência do HIIT nos mecanismos bioquímicos e moleculares no músculo esquelético. Sendo o sedentarismo gerador de complicações, investigar essas estratégias de controle é essencial. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do HIIT sobre o estresse oxidativo no músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentos Animais (Protocolo CEUA 1167-2016). Foram utilizados 25 ratos com 12 meses, divididos em: sedentários (SHR, n=9), treinamento HIIT (HIIT, n=10) e Wistar Kyoto controle (WKY, n=6). Os ratos foram familiarizados com o HIIT por uma semana por 10 minutos na esteira. Foi realizado teste de esforço incremental até a exaustão para graduar a intensidade do exercício na quarta semana de treinamento. O HIIT foi executado cinco vezes por semana, durante oito semanas. Foi aferida a pressão arterial sistólica (PAS) e realizado o teste de capacidade máxima ao exercício antes e após o treinamento. Após o término do delineamento experimental o músculo tibial anterior foi destinado às seguintes análises: capacidade antioxidante hidrofílica (CAH), peroxidação lipídica (MDA), carbonilação proteica, quantificação de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa. Adicionalmente, realizamos a avaliação dos níveis de expressão dos genes codificadores de membros do complexo NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22phox e p47phox) e das vias do Nf-Kb e I $\kappa$ -B por RT-qPCR. Para comparação entre grupos e tratamentos foi utilizado ANOVA One-Way seguido de Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn's ou Tukey-Kramer e teste de contraste ortogonal (p<0,05). Encontramos o aumento da interleucina-6 e do fator de necrose tumoral alfa no grupo HIIT vs. WKY (p<0,05) e alteração nos níveis de expressão dos genes envolvidos com as fontes geradoras de EROs, evidenciado pela diminuição do NOX2 e I $\kappa$ -B no grupo HIIT vs. WKY (p<0,05). Conclui-se que o HIIT produz efeitos benéficos superiores, através da regulação do estresse oxidativo e de membros da cascata inflamatória no músculo esquelético, em ratos espontaneamente hipertensos quando comparados aos ratos saudáveis sedentários.

**Palavras chaves:** Exercício. Espécies reativas de oxigênio. Insuficiência cardíaca. Sedentarismo.

## ABSTRACT

### **Impact of high-intensity interval training on skeletal muscle oxidative stress in spontaneously hypertensive rats**

Sedentary lifestyle is a risk factor for the development and progression of several diseases, especially cardiovascular diseases, such as arterial hypertension (AH), which affect quality of life and functional capacity. Continuous elevation of blood pressure can progress to heart failure (HF), generating muscle manifestations, such as increased oxidative stress in skeletal muscles. The NADPH oxidase complex is one of the main sources of reactive oxygen species (ROS) and among its signaling pathways are Nf-Kb and I $\kappa$ -B. Physical exercise is the best method of combat and among them the high intensity interval type (HIIT) exercises have been widely used in individuals with AH. This modality has the characteristic of optimizing time and thus promoting greater adherence, in addition, they are also superior to continuous aerobic exercises because they offer greater gains in cardiorespiratory fitness (maximum VO<sub>2</sub>). The influence of HIIT on the biochemical and molecular mechanisms in skeletal muscle has not yet been elucidated. As sedentary lifestyle generates complications, investigating these control strategies is essential. Therefore, the aim of the study was to evaluate the effect of HIIT on oxidative stress in the skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments (Protocol CEUA 1167-2016). Twenty-five 12-month-old rats were used, divided into: sedentary (SHR, n = 9), HIIT training (HIIT, n = 10) and Wistar Kyoto control (WKY, n = 6). The rats were familiarized with HIIT for a week for 10 minutes on the treadmill. An incremental effort test was carried out until exhaustion to graduate the exercise intensity in the fourth week of training. HIIT was performed five times a week for eight weeks. Systolic blood pressure (SBP) was measured and the maximum exercise test was performed before and after training. After the end of the experimental design, the anterior tibial muscle was used for the following analyzes: hydrophilic antioxidant capacity (CAH), lipid peroxidation (MDA), protein carbonylation, interleukin-6 quantification and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Additionally, we carried out the evaluation of the expression levels of the genes encoding members of the NADPH oxidase complex (NOX2, NOX4, p22phox and p47phox) and of the Nf-Kb and I $\kappa$ -B pathways by RT-qPCR. For comparison between groups and treatments, ANOVA One-Way was used followed by Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn's or Tukey-Kramer and orthogonal contrast test (p <0.05). We found an increase in interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in the HIIT vs. WKY (p <0.05) and alteration in the expression levels of the genes involved with the sources that generate ROS, evidenced by the decrease in NOX2 and I $\kappa$ -B in the HIIT vs. WKY (p <0.05). It is concluded that HIIT produces superior beneficial effects, through the regulation of oxidative stress and members of the inflammatory cascade in the skeletal muscle, in spontaneously hypertensive rats when compared to healthy sedentary rats.

**Keywords:** Exercise. Reactive Oxygen Species. Heart Failure. Sedentary Behavior.

## LISTA DE SIGLAS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

ANOVA – Análise de variância

EROs – Espécies reativas de oxigênio

g – Grama

HA – Hipertensão Arterial

HIIT – Treinamento Intervalado de Alta Intensidade

h - Hora

IC – Insuficiência Cardíaca

mg/kg – Miligrama por quilo

min – Minuto

mL – Mililitro

mmHg – Milimetro de mercúrio

nm – Nanômetro

PAS – Pressão arterial sistólica

PVE – Peso do Ventrículo Esquerdo

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

VE – Ventrículo Esquerdo

uL – Microlitro

WKY – Wistar Kyoto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Delineamento Experimental e Protocolo HIIT.....	18
Figura 2-	Efeito do HIIT sobre a dosagem das Citocinas Pró-Inflamatórias: Interleucina-6 (a) e Fator de necrose tumoral-alfa (b).....	23
Figura 3-	Influência do HIIT na expressão gênica da via NADPH oxidase (subunidades: a) NOX2, b) NOX4, c) p22phox, d) p47phox) e nas vias de sinalização: e) Nf-Kb e f) Iκ-B.....	24
Figura 4-	Efeito do HIIT sobre os marcadores do Estresse Oxidativo: capacidade antioxidante hidrofílica (a), peroxidação lipídica (b) e Carbonilação proteica.....	25
Figura 5-	Esquema dos principais achados do estudo.....	26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>13</b>
	<b>ANEXO A- APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>33</b>
	<b>ANEXO B- NORMAS DA REVISTA: INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY.....</b>	<b>34</b>

1 **ARTIGO ORIGINAL**

2

3 **Impacto do treinamento intervalado de alta intensidade em parâmetros**  
4 **moleculares e bioquímicos do estresse oxidativo no músculo esquelético**  
5 **de ratos espontaneamente hipertensos**

6

7 **Impact of high-intensity interval training on molecular and biochemical**  
8 **parameters of oxidative stress on skeletal muscle in spontaneously**  
9 **hypertensive rats**

10 **Informação adicional:**

11 Título resumido: HIIT e estresse oxidativo muscular

12

13 Thaynara Zanoni D'Almeida<sup>1</sup>, Ines Cristina Giometti<sup>1</sup>, Anthony César de Souza  
14 Castilho<sup>1</sup>, Dijon Henrique Salomé Campos<sup>2</sup>, Camila Renata Corrêa<sup>2</sup>, Sarah  
15 Gomes Nunes<sup>3</sup>, Francis Lopes Pacagnelli<sup>1,4</sup>

16

17 <sup>1</sup>Programa Pós-Graduação em Ciência Animal, UNOESTE - Presidente  
18 Prudente - Brasil.

19 <sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
20 Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

21 <sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Departamento de  
22 Farmacologia, Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil.

23 <sup>4</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Fisioterapia, UNOESTE –  
24 Prudente - Brasil.

25

26 **Correspondência:** Francis Lopes Pacagnelli, Universidade do Oeste Paulista -  
27 Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, km572, Bairro Limoeiro, Presidente  
28 Prudente – SP - Brasil. CEP: 19.067-175. Telefone: (18) 3229-2000.

29

30 **RESUMO**

31 Introdução: O sedentarismo é fator agravante para hipertensos e o exercício físico  
32 uma forma custo-efetiva contra esta condição. A hipertensão arterial pode evoluir para  
33 insuficiência cardíaca, gerando aumento do estresse oxidativo e disfunções no  
34 músculo esquelético. O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) mostra-se  
35 melhor em ganhos funcionais e  $VO_2$  máximo quando comparados aos aeróbios  
36 contínuos. O objetivo foi investigar o impacto do HIIT sobre o estresse oxidativo no  
37 músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos. Métodos: Utilizamos 25  
38 ratos com 12 meses de idade, divididos em: sedentários (SHR,n=9), treinamento HIIT  
39 (HIIT,n=10) e Wistar Kyoto controle (WKY,n=6). Familiarizamos ao HIIT por uma  
40 semana e para graduar a intensidade realizamos teste de esforço incremental.  
41 Executamos o HIIT cinco vezes/semana, durante oito semanas. Aferimos pressão  
42 arterial sistólica e realizamos teste de capacidade máxima ao exercício antes/após o  
43 treinamento. No músculo tibial anterior realizamos às análises: capacidade  
44 antioxidante hidrofílica, peroxidação lipídica, carbonilação proteica, quantificação de  
45 interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa. Realizamos avaliação dos níveis de  
46 expressão gênica do complexo NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22phox e p47phox) e  
47 das vias Nf-Kb e I $\kappa$ -B por RT-qPCR. Resultados: Aumento da interleucina-6 e fator de  
48 necrose tumoral alfa no grupo HIIT vs. WKY ( $p<0,05$ ) e alteração nos níveis de  
49 expressão gênica das fontes geradoras de EROs, evidenciado pela diminuição do  
50 NOX2 e do I $\kappa$ -B no grupo HIIT vs. WKY ( $p<0,05$ ). Conclusão: HIIT produz efeitos  
51 benéficos superiores pela regulação do estresse oxidativo e de membros da cascata  
52 inflamatória, em ratos espontaneamente hipertensos quando comparados aos ratos  
53 saudáveis sedentários.

54 **Palavras chaves:** Exercício. Espécies reativas de oxigênio. Insuficiência cardíaca.  
55 Sedentarismo.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

## 1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida sedentário é um fator de risco para desenvolvimento e progressão de diversas doenças, incluindo as cardiovasculares, as quais causam incapacidades, diminuição da qualidade de vida e representam um sério problema para a sociedade<sup>1</sup>. A elevação contínua da pressão arterial em indivíduos hipertensos pode evoluir para insuficiência cardíaca (IC)<sup>2-6</sup> gerando manifestações musculares dentre as quais destaca-se o aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética que contribui para piora da capacidade funcional<sup>7-9</sup>. Em modelos animais de IC já foi observado aumento do estresse oxidativo sistêmico, no miocárdio e na musculatura esquelética<sup>6</sup>.

Os músculos esqueléticos são responsáveis pela postura e movimentos voluntários dos indivíduos<sup>10</sup>. O tibial anterior é o maior músculo da parte anterior da perna, essencial para dorsiflexão do tornozelo, responsável pela marcha e conseqüentemente pela execução das atividades físicas, além de importante músculo postural<sup>11</sup>. Seu comprometimento pode acarretar limitações funcionais e piora da qualidade de vida<sup>7,12</sup>.

O complexo NADPH oxidase é uma importante fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs) no músculo esquelético em condições cardiovasculares<sup>13</sup>. Ele se apresenta em três isoformas (NOX1, NOX2 e NOX4), que se diferenciam devido sua ativação<sup>7,14,15</sup>. Dentre as vias de sinalização que ativam esse complexo estão o Nf-Kb e sua proteína inibitória, o I $\kappa$ -B<sup>6,16</sup>, as quais influenciam o músculo frente ao estresse oxidativo pelo aumento da lipoperoxidação e das EROs<sup>6</sup>.

Como maneira de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos hipertensos, o exercício físico mostra-se uma forma efetiva de combater o sedentarismo, sendo os exercícios aeróbios contínuos de baixa a moderada intensidade a modalidade mais tradicional indicada<sup>17</sup>. Entretanto, o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) também vêm sendo muito utilizado para esse grupo<sup>18,19</sup>. Essa modalidade de exercícios otimiza o tempo e assim promove maior adesão - alterna curtos períodos de alta intensidade (85-95% do consumo máximo de oxigênio corporal - VO<sub>2</sub> máximo) seguidos de recuperação de moderada ou baixa intensidade (50-60% do VO<sub>2</sub> máximo)<sup>17,19</sup>.

Segundo o American College of Sports Medicine (ACSM) é



104 recomendado uma frequência de HIIT de 75 minutos/semana enquanto de  
105 exercícios de moderada intensidade 150 minutos/semana. Além disso, o HIIT  
106 também fornece estímulos para melhorar a aptidão em uma variedade de  
107 populações<sup>20</sup>, fazendo com que este tipo de treinamento seja mais eficaz  
108 quando comparado aos exercícios aeróbios contínuos para ganhos de  
109 condicionamento aeróbio (melhor VO<sub>2</sub> máximo), ganhos funcionais e redução  
110 de fatores de risco cardiovascular<sup>21-23</sup>.

111 Uma vez que a influência do HIIT nos mecanismos bioquímicos e  
112 moleculares envolvidos nas modificações musculares periféricas na  
113 hipertensão arterial (HA) ainda não foram elucidadas e que o sedentarismo  
114 pode gerar complicações graves e acentuar alterações cardiovasculares,  
115 hipotetizamos que o HIIT produz efeitos benéficos em relação ao estresse  
116 oxidativo na musculatura periférica por meio da redução das citocinas pró-  
117 inflamatórias, vias de sinalização e fontes geradores de EROs no músculo  
118 esquelético de ratos espontaneamente hipertensos.

119

## 120 **2. MÉTODOS**

121

### 122 **2.1 Modelo de animais e aprovação ética**

123 A fim de testarmos nossa hipótese, utilizamos ratos machos da  
124 linhagem espontaneamente hipertensos (SHR, n=19) e Wistar Kyoto (WKY,  
125 n=6) com 360 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade  
126 Estadual de Campinas (UNICAMP) - São Paulo e que foram mantidos na  
127 Unidade de Pesquisa Experimental da Universidade Júlio de Mesquita Filho  
128 (UNESP) - Campus Botucatu - São Paulo. Dividimos os animais em três  
129 grupos: espontaneamente hipertensos-controle sedentário (SHR, n=9),  
130 espontaneamente hipertensos-treinados (HIIT, n=10) e Wistar Kyoto-controle  
131 (WKY, n=6). Fizemos o alojamento em caixas plásticas com dimensão  
132 41x34x16 cm contendo de 3 a 4 animais em cada caixa, com temperatura de  
133 21° a 23°C e umidade relativa do ar de 50% a 60%, com ciclos invertidos de  
134 luminosidade de 12h claro-escuro. Os ratos receberam ração e água *ad libitum*.

135 Ressaltamos que o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de  
136 Ética de Experimentos Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
137 Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu-SP, Brasil (Protocolo CEUA

138 1167-2016) e os protocolos experimentais utilizados estavam em conformidade  
139 com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo  
140 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com o  
141 Guide for the Carean Use of Laboratory Animals<sup>24</sup>.

142

## 143 **2.2 Desenho Experimental**

144 A fim de verificar o impacto do HIIT sobre aspectos do estresse  
145 oxidativo no músculo esquelético, submetemos os ratos ao protocolo HIIT por 8  
146 semanas. Antes e após iniciar o treinamento avaliamos a pressão arterial  
147 sistólica (PAS) e o teste de capacidade máxima ao exercício. Realizamos novo  
148 teste de capacidade máxima ao exercício para ajuste de carga no final da  
149 quarta semana nos animais submetidos ao HIIT. Ao término de oito semanas  
150 do treinamento HIIT, realizamos a morte dos animais e posteriormente a coleta  
151 do músculo tibial anterior para as análises (Figura 1).

152

## 153 **2.3 Pressão arterial sistólica (PAS)**

154

155 Para avaliar o controle pressórico verificamos a PAS por  
156 pletismografia, com uso do método do manguito de cauda (Narco Bio-System®,  
157 modelo 709-0610, International Biomedical, Inc, EUA), antes e após o período  
158 do treinamento<sup>25-27</sup>.

159

## 160 **2.4 Capacidade Máxima ao Exercício**

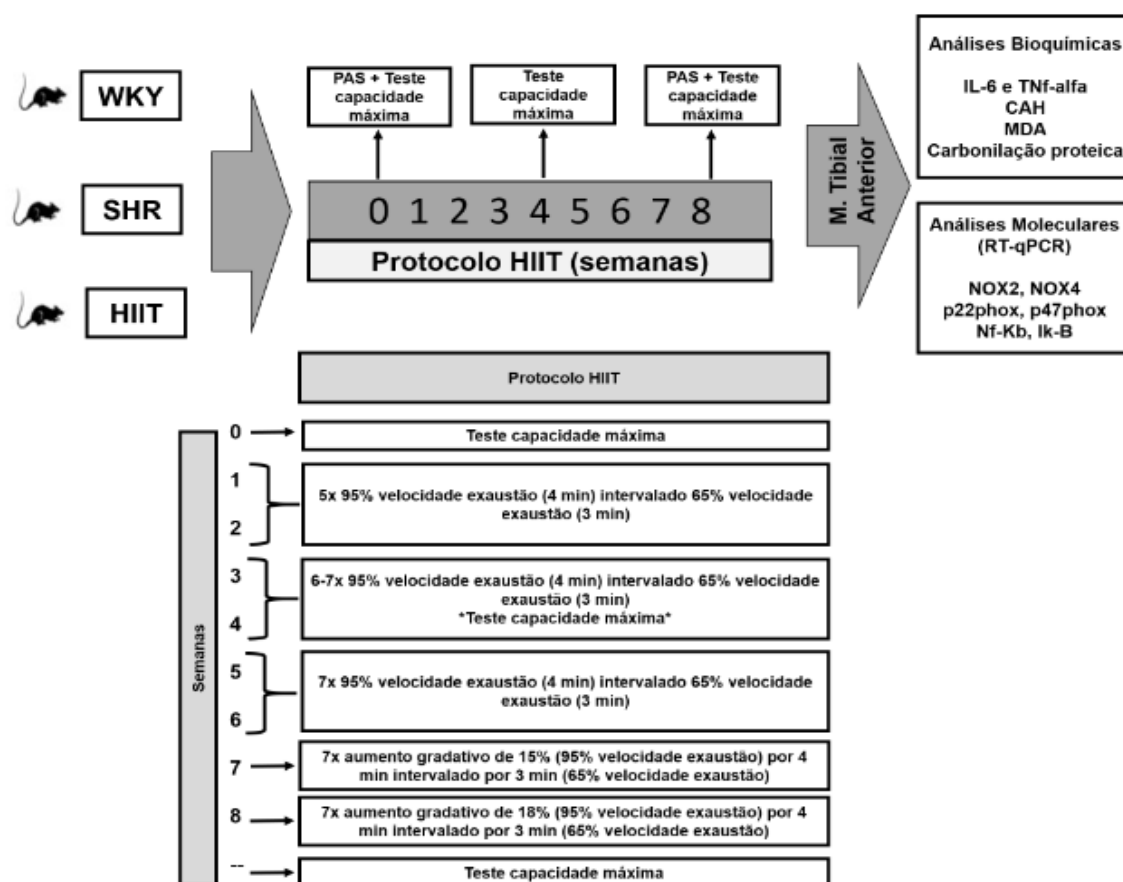
161 Antes de avaliar a capacidade máxima ao exercício, familiarizamos  
162 os ratos com a esteira rolante (modelo TK 1 – Inbramed, São Paulo, Brasil) em  
163 6m/min, 0% de inclinação, 10 min, durante uma semana. Iniciamos o protocolo  
164 que avalia a capacidade ao exercício a 6m/min, aumentando 3m/min a cada 3  
165 min até a exaustão<sup>28,29</sup>. Consideramos os ratos em exaustão quando se  
166 recusaram a correr mesmo após a estimulação ou quando ficaram incapazes  
167 de coordenar os passos. Avaliamos a capacidade funcional pela distância total  
168 percorrida, calculada levando-se em consideração a velocidade e duração  
169 máxima do teste. Realizamos este protocolo antes e após 4 semanas do início  
170 do treinamento para graduar a intensidade do esforço e 24 horas após o

171 término do treinamento<sup>28</sup>. Calculamos o percentual da variação  $\Delta(\%)$  da  
172 distância e do tempo.

173

## 174 **2.5 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT)**

175 Realizamos o treinamento por aproximadamente 50 min/dia, cinco  
176 dias por semana, durante oito semanas, em ciclo invertido e adaptado<sup>30,31</sup>.  
177 Cada sessão constituiu três fases: aquecimento, HIIT e recuperação. Iniciamos  
178 o HIIT com 95% da velocidade alcançada no teste de exaustão (21 m/min) por  
179 quatro minutos, intercalados com 65% da velocidade máxima por três minutos,  
180 repetidos por cinco vezes na primeira e na segunda semanas. Nas terceira e  
181 quarta semanas de HIIT, realizamos as mesmas velocidades da primeira, no  
182 entanto, repetidas por seis e sete vezes, consecutivamente. Antes do início da  
183 quinta semana, realizamos um segundo teste para reavaliar a velocidade  
184 máxima de exaustão; e reajustamos a carga do treino. Na quinta e sexta  
185 semanas, realizamos o HIIT com protocolo adaptado<sup>30,31</sup> com velocidade de 23  
186 m/min, por quatro minutos intercalados a 12 m/min por três minutos, repetidos  
187 por sete vezes. Na sétima semana aumentamos a velocidade em 15% e na  
188 oitava em 18%, intercalados a 65% da velocidade máxima por três minutos,  
189 repetido sete vezes<sup>32</sup>. Detalhes do HIIT descritos a seguir (Figura 1).



190

191 **Figura 1:** Delineamento Experimental e Protocolo HIIT. WKY (Wistar Kyoto controle); SHR  
 192 (Ratos espontaneamente hipertensos sem treinamento); HIIT (Ratos espontaneamente  
 193 hipertensos treinados); Protocolo HIIT (Protocolo Treinamento intervalado de alta intensidade);  
 194 PAS (Pressão arterial sistólica); IL-6 (Interleucina-6); TNF-alfa (Fator de necrose tumoral alfa);  
 195 CAH (Capacidade antioxidante hidrofílica); MDA (Peroxidação Lípidica); RT-qPCR (Reação em  
 196 cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa); M. (Músculo). HIIT  
 197 (Treinamento intervalado de alta intensidade); x (Vezeas repetidas); % (Porcentagem); Min  
 198 (Minutos).

199

## 200 2.6 Morte e coleta de materiais

201 Os ratos foram mortos usando métodos aprovados para suas  
 202 espécies específicas, estágio de desenvolvimento e tamanho. Dois dias (48  
 203 horas) após o programa HIIT, anestesiámos os ratos com uma injeção  
 204 intramuscular de uma mistura de cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e  
 205 cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip). Avaliamos o nível de anestesia por meio de  
 206 relaxamento do tônus muscular, relaxamento do tônus mandibular e  
 207 observação da ausência de reflexo de retirada do pé. Então, foram mortos por  
 208 decapitação. Esse procedimento foi realizado por um indivíduo experiente.

209 Retiramos amostras de tecido muscular esquelético tibial anterior, congelamos  
210 em nitrogênio líquido e armazenamos a  $-80^{\circ}\text{C}$  e submetemos os ratos à  
211 toracotomia mediana<sup>28,29,33</sup>. Removemos o coração e separamos e pesamos os  
212 átrios e ventrículos. Normalizamos o peso ventricular esquerdo + septo (VE) e  
213 pesos atriais pelo comprimento da tibia (PVE/comprimento da tibia,  
214 átrios/comprimento da tibia, respectivamente)<sup>28</sup> para identificar hipertrofia  
215 cardíaca.

216

## 217 **2.7 Preparação do músculo tibial anterior para as análises**

218 Pesamos 100 mg da amostra muscular e em seguida  
219 homogeneizamos em 1,0 mL de solução de PBS pH=7,4 resfriada em ULTRA-  
220 TURRAX® T25 basicIKA®WerkeStaufen/Germany e centrifugamos a 800g a  
221  $4^{\circ}\text{C}$  por 10min. Utilizamos o sobrenadante para realizar as análises que  
222 seguem nos itens abaixo<sup>34,35</sup>.

223

## 224 **2.8 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias**

225 Sendo as citocinas pro-inflamatórias produtos da cascata de  
226 sinalização do Nf-Kb, quantificamos nas amostras musculares as  
227 concentrações do Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6),  
228 por meio da técnica de ELISA, utilizando kits comerciais (Linco Research Inc.;  
229 R&D Systems®; Millipore e B-Brigde International Inc.). Realizamos as leituras  
230 em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA,  
231 USA)<sup>34,35</sup>.

232

## 233 **2.9 Avaliação da expressão gênica de subunidades da NADPH oxidase e 234 das vias Nf-Kb e I $\kappa$ -B por RT-qPCR em tempo real**

235 Realizamos a quantificação da abundância relativa de mRNAs das  
236 subunidades da NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22phox e p47phox) e das  
237 vias NF-kB e I $\kappa$ -B por reação em cadeia da polimerase em tempo real após  
238 transcrição reversa (RT-qPCR). Realizamos a extração de RNA total do  
239 músculo tibial anterior utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies,  
240 Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito<sup>36,37</sup>.

241 Resumidamente, homogeneizamos o fragmento no músculo  
242 congelado mecanicamente em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de

243 tecido) e incubamos por 5 min à temperatura ambiente. A seguir,  
244 acrescentamos 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado,  
245 homogeneizamos vigorosamente e incubamos por 3 min à temperatura  
246 ambiente. Posteriormente, centrifugamos o material a 12.000 g por 15 min a  
247 4°C. Separamos a fase aquosa formada após a centrifugação, acrescida de 0,5  
248 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubamos por 10  
249 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA. Após esse período,  
250 centrifugamos o material novamente a 12.000 g por 10 min a 4°C. Lavamos o  
251 sedimento formado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado  
252 inicialmente) e centrifugamos a 7.500 g por 5 min a 4°C. Submetemos o  
253 sedimento de RNA a secagem por 10 min à temperatura ambiente e  
254 ressuspendemos em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e  
255 incubamos a 60 °C, por 10 min.

256 Para remover qualquer contaminação de DNA, incubamos as  
257 amostras com DNase I (Invitrogen Life Technologies, CA, USA).  
258 Posteriormente, realizamos a quantificação de RNA por espectrofotometria a  
259 260 nm, utilizando o fator de correção próprio para o RNA. Consideramos a  
260 pureza do RNA satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260  
261 e 280 nm foi de aproximadamente 2,0. Submetemos um micrograma de RNA a  
262 RT utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (AppliedBiosystems, Foster  
263 City, CA, EUA) para volume total de reação de 20 µL, de acordo com método  
264 recomendado pelo fabricante.

265 Em seguida, submetemos alíquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do  
266 produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), à PCR em tempo real  
267 utilizando 10 µL TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (AppliedBiosystems) e 1  
268 µL de ensaio (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e  
269 antisenso e sonda Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)  
270 específicos para cada gene: *NOX2* (*Rn00576710\_m1*), *NOX4*  
271 (*Rn00585380\_m1*), *p22phox* (*Rn00577357\_m1*), *p47phox* (*Rn00586945\_m1*),  
272 *NF-kB* (*Rn01399572\_m1*) e *Iκ-B* (*Rn00584379\_m1*). Realizamos a amplificação  
273 e a análise utilizando o Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied  
274 Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do  
275 fabricante. Fizemos as amostras e o negativo em duplicata. Calculamos a  
276 expressão gênica pelo método do CT (critical threshold cycle) comparativo (2-

277  $\Delta\Delta CT$ )<sup>38</sup>. Normalizamos a expressão gênica pelo gene de referência *PPIA*  
278 (*Rn00690933\_m1*)<sup>7</sup>.

279

## 280 **2.10 Medida da capacidade antioxidante hidrofílica (CAH)**

281 Determinamos a medida da capacidade antioxidante hidrofílica  
282 fluorometricamente<sup>34</sup>, utilizando leitor VICTOR X2 (PerkinElmer – Boston, MA).  
283 Quantificamos a capacidade antioxidante por meio de comparação da área  
284 sobre a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão fosfatidilcolina (PC),  
285 o qual usamos como referência de matriz biológica. Usamos o 2',2 Azobis (2-  
286 amino-propano)-dihidroclorado (AAPH) como iniciador de radical peroxil. Os  
287 resultados representam a porcentagem de inibição do (4,4-difluoro-5-(4-fenil 1-  
288 3 butadienil)-4-bora-3<sup>a</sup>,4<sup>a</sup>-diazas-indaceno-3-ácidoundecanóico (BODIPY)  
289 581/591 no plasma com relação ao que ocorrerá na amostra controle do  
290 BODIPY 581/591 em lipossoma PC. Realizamos todas as análises em  
291 triplicata. Apresentamos os resultados em porcentagem de proteção<sup>34</sup>.

292

## 293 **2.11 Peroxidação Lipídica**

294 O malonaldeído (MDA) é resultante da degradação de lipídios poli-  
295 insaturado e marcador da peroxidação lipídica. Sua produção é usada como  
296 biomarcador dos níveis de peroxidação lipídica. O MDA (250 uL de  
297 sobrenadante de tecido muscular) reage com o TBA, pois é uma substância  
298 reativa ao TBA (TBARS), na forma 1:2 MDA-TBA, que é absorvida a 532 nm.  
299 Dessa forma, a quantidade de TBARS é proporcional a quantidade de MDA.  
300 Calculamos a concentração de TBARS usando a curva padrão de MDA e  
301 expressamos em nmol/mg de proteína<sup>35</sup>.

302

## 303 **2.12 Carbonilação de Proteínas**

304 Para carbonilação utilizamos 100 uL do sobrenadante dos tecidos  
305 para 100 µL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). Incubamos  
306 as amostras por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente,  
307 adicionamos 50 µL de NaOH (6 M) e incubamos novamente por 10 minutos em  
308 temperatura ambiente. Realizamos a leitura a 450 nm em leitor de microplaca  
309 Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado

310 obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar (22000  
311 M-1 cm-1). O resultado final expressamos em nmol/mg de proteínas<sup>35</sup>.

312

### 313 **2.13 Análise estatística**

314 Apresentamos os dados como média  $\pm$  desvio padrão, mediana,  
315 mínimo e máximo. Avaliamos a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro  
316 Wilk e Levene e Bartlett, respectivamente. As análises de capacidade  
317 antioxidante hidrofílica, citocinas pró-inflamatórias e expressão gênica  
318 comparamos por ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey. As análises de  
319 carbonilação proteica e peroxidação lipídica comparamos por Kruskal-Wallis  
320 seguido de pós-teste de Dunn's. Realizamos as análises estatísticas nos  
321 softwares JMP (SAS, Institute Cary, NC) e GraphPad Prism® (GraphPad  
322 software, La Jolla, CA, EUA). Estabelecemos o nível de significância em  $p <$   
323 0,05.

324

## 325 **3. RESULTADOS**

326

327 A fim de validarmos a hipertensão dos animais, de fato verificamos  
328 que a PAS foi maior nos grupos SHR e HIIT comparado ao WKY, antes e após  
329 o treinamento. O peso do VE/comprimento da tibia foi maior nos grupos SHR e  
330 HIIT em comparação com o grupo WKY, demonstrando que havia uma  
331 hipertrofia cardíaca no coração, porém os ratos não apresentavam sinais de  
332 insuficiência cardíaca (derrame pleural, ascite, taquipnéia e trombo atrial);  
333 tabela 1.

334

335 **Tabela 1.** Dados anatômicos e pressão arterial. Dados média  $\pm$  desvio padrão.

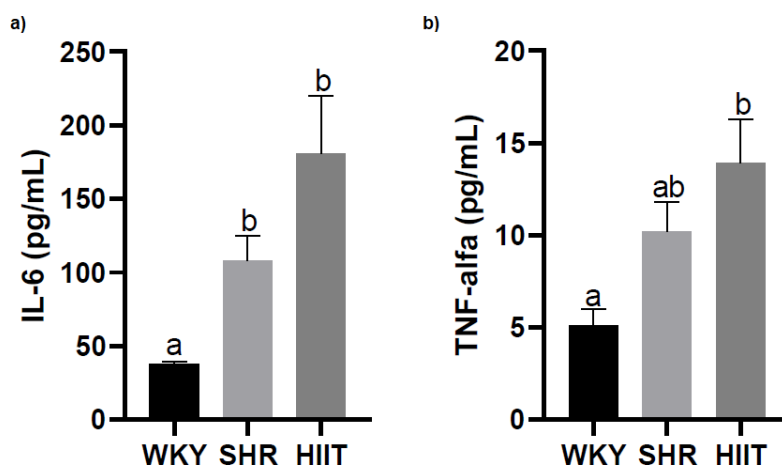
VARIÁVEIS	WKY (n=6)	SHR (n=9)	HIIT (n=10)
PAS inicial (mmHg)	122.14 $\pm$ 14.94	202.12 $\pm$ 42.21*	210.80 $\pm$ 7.19*
PAS final (mmHg)	127.42 $\pm$ 16.88	223.8 $\pm$ 31.46 *	200.4 $\pm$ 19.02*
VE/comp. tibia (g/cm)	0.18 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.02 *	0.22 $\pm$ 0.05*
Átrios/comp. tibia (g/cm)	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 0.01



336 WKY: Wistar Kyoto controle; SHR: Hipertensos sem treinamento; HIIT: Hipertensos treinados;  
 337 PAS: Pressão arterial sistólica; VE: Ventrículo esquerdo; Comp.: Comprimento; VE/comp. tibia:  
 338 Relação ventrículo esquerdo com comprimento da tibia; átrios/comp. tibia: Relação dos átrios  
 339 com o comprimento da tibia. Shapiro Wilk e Tukey. \* $p < 0.05$  vs. WKY.

### 340 3.1 Avaliação das Citocinas Pró-Inflamatórias

341 O HIIT aumentou as citocinas pró-inflamatórias, especificamente, a  
 342 IL-6 (Fig. 2a) comparado o grupo WKY vs. demais grupos e o TNF-  $\alpha$  (Fig. 2b)  
 343 quando comparado os grupos WKY vs. HIIT ( $p < 0,05$ ).

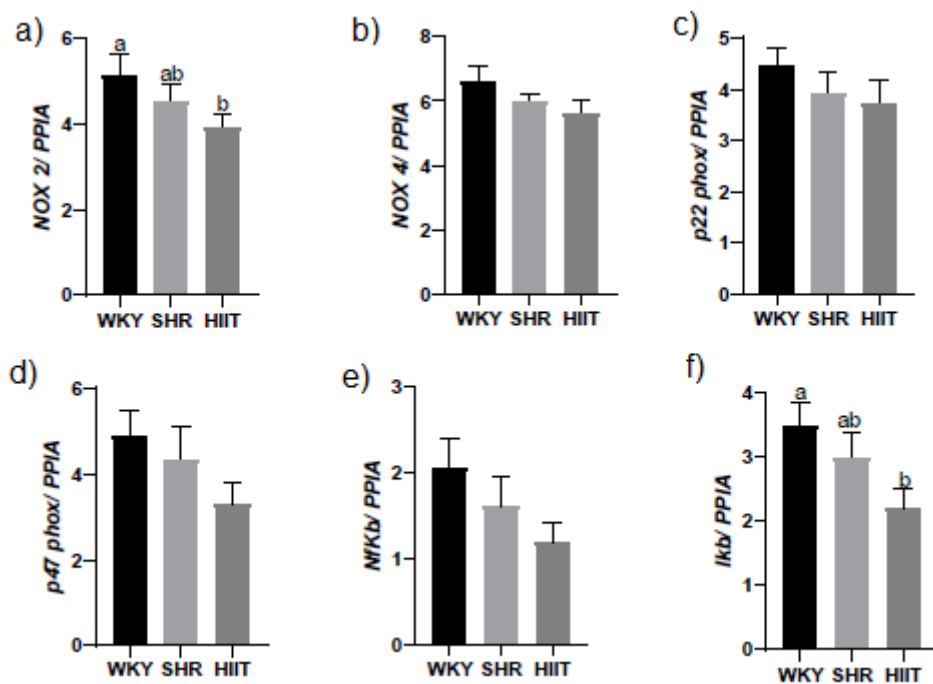


344

345 **Figura 2:** Efeito do HIIT sobre a dosagem das Citocinas Pró-Inflamatórias: Interleucina-6 (a) e  
 346 Fator de necrose tumoral-alfa (b). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Grupos: WKY  
 347 (controle, n=6); SHR (hipertensos sem treinamento, n=9); e HIIT (hipertensos treinados, n=10).  
 348  $p < 0.05$ . ANOVA com *post hoc* de Tukey. As letras (a e b) indicam a diferença estatística ( $p <$   
 349 0,05) entre os grupos experimentais.

### 350 3.2 Avaliação da expressão gênica: PCR-RT em tempo real

351 A influência do HIIT no complexo NADPH oxidase, ocorreu através  
 352 de uma diminuição significativa no NOX2 entre os grupos WKY vs. HIIT (Fig.  
 353 3a). O NOX4 (Fig. 3b) e as subunidades p22phox (Fig. 3c) e p47phox (Fig. 3d),  
 354 mantiveram seus níveis nos mesmos padrões. Nas vias de sinalização o HIIT  
 355 não interferiu na Nf-Kb (Fig. 3e) e na I $\kappa$ -B apresentou uma diminuição  
 356 significativa entre os grupos WKY vs. HIIT (Fig. 3f).

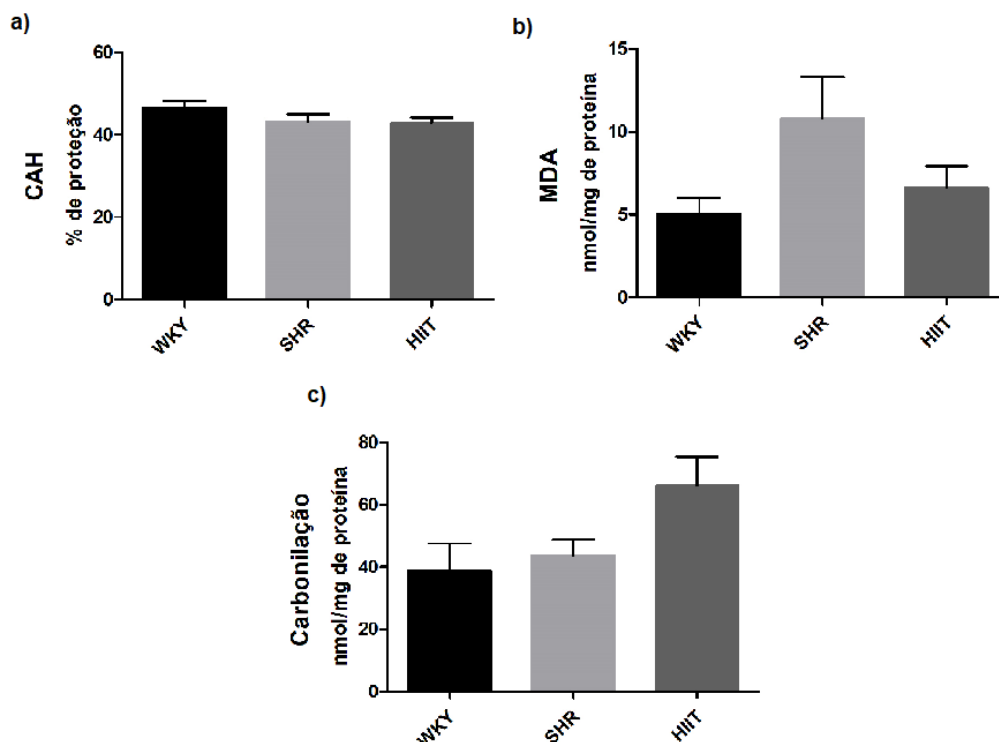


357

358 **Figura 3:** Influência do HIIT na expressão gênica de membros da via NADPH oxidase  
 359 (subunidades: a) NOX2, b) NOX4, c) p22phox e d) p47phox) e nas vias de sinalização: e) Nf-  
 360 Kb e f) Iκ-B. Dados expressos em média ± SEM. Grupos: WKY (controle, n=6); SHR  
 361 (hipertensos sem treinamento, n=9); e HIIT (hipertensos treinados, n=10). p < 0.05. ANOVA de  
 362 duas vias com Tukey-Kramer e teste de contraste ortogonal. As letras (a e b) indicam a  
 363 diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos experimentais.

### 364 3.3 Análise de marcadores do Estresse Oxidativo

365 O HIIT não interferiu nos marcadores do estresse oxidativo: medida  
 366 da CAH (Fig. 4a), MDA (Fig. 4b) e carbonilação proteica (Fig. 4c).



367

368 **Figura 4:** Efeito do HIIT sobre os marcadores do Estresse Oxidativo: capacidade antioxidante  
 369 hidrofílica (a), peroxidação lípidica (b) e carbonilação proteica (c). Dados expressos em média  $\pm$   
 370 desvio padrão. Grupos: WKY (controle, n=6); SHR (hipertensos sem treinamento, n=9); e HIIT  
 371 (hipertensos treinados, n=10).  $p < 0.05$ . ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey (CAH) ou  
 372 Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn's (MDA e Carbonilação proteica). As letras (a e b)  
 373 indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

374

### 3. DISCUSSÃO

375

376

377

378

379

380

381

382

383

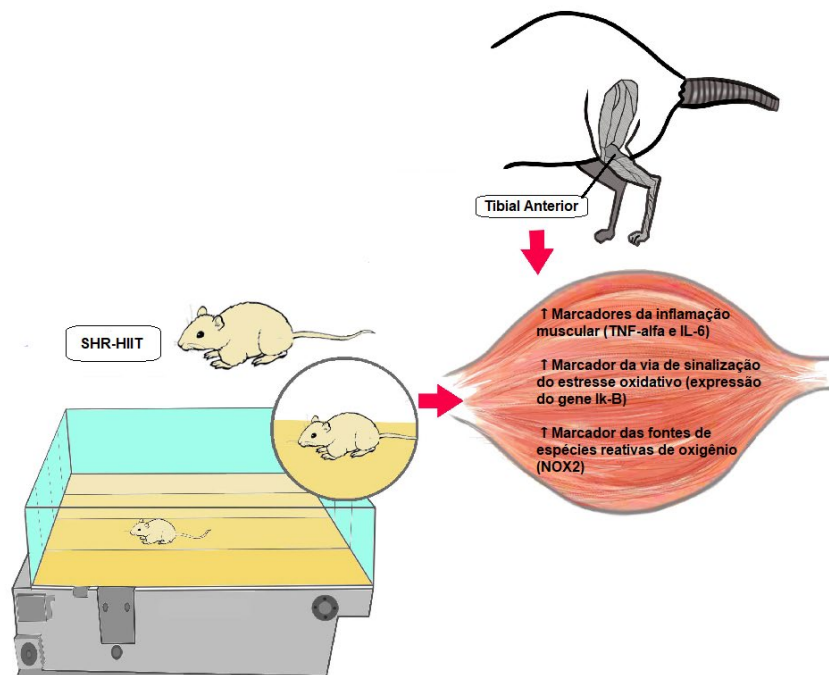
384

385

Elucidar a relação entre o HIIT e parâmetros bioquímicos e moleculares no músculo esquelético na patogênese da HA é fundamental para compreensão de como esse tipo de exercício pode modular esse sistema muscular esquelético. Entender os mecanismos envolvidos na aplicação de terapêuticas não farmacológicas e que contribuem para redução ou suspensão de medicamentos e importantes melhoras funcionais na HA são essenciais para o incentivo a prática de modalidades como o HIIT.

Sendo assim, aqui demonstramos pela primeira vez a importância do HIIT em contribuir para alteração da expressão gênica no músculo esquelético de ratos hipertensos em relação as fontes geradoras de EROs. Esses achados são muito importantes, pois demonstram que o músculo de ratos hipertensos

386 exercitados apresenta melhor condição até mesmo quando comparado a ratos  
387 saudáveis e sedentários (Figura 5).



388

389 **Figura 5:** Modelo biológico do músculo tibial anterior de indivíduos hipertensos submetidos ao  
390 treinamento HIIT. HIIT (Treinamento Intervalado de Alta Intensidade); IL-6 (Interleucina-6);  
391 TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral Alfa).

392 Sabe-se que o comportamento sedentário está relacionado ao  
393 desenvolvimento da inflamação com elevação de citocinas séricas e que a  
394 prática regular de exercício físico, principalmente o aeróbio, com efeitos anti-  
395 inflamatórios<sup>39</sup>. Um estudo em humanos avaliou as citocinas séricas pró-  
396 inflamatórias após 1 sessão e 2 semanas de HIIT e não observaram diferença  
397 na resposta inflamatória<sup>40</sup>. Entretanto, outro estudo investigou os níveis das  
398 citocinas IL-1, IL-6 e TNF-alfa nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos  
399 (EDL) de ratos submetidos a dois tipos de exercícios - 8 semanas de corrida na  
400 esteira (65–70%  $VO_2max$ ) e 1 sessão de corrida em declive (exercício  
401 excêntrico) e constataram aumento dos níveis de IL-6 em ambos<sup>41</sup>,  
402 corroborando com nosso estudo.

403

404 A liberação da IL-6 dos músculos esqueléticos está relacionada ao  
405 processo de regeneração após a injúria que regula a proliferação e  
406 diferenciação dos mioblastos e também à intensidade e característica do  
exercício<sup>42,43</sup>. Devido a característica do HIIT, em intercalar altas e moderadas

407 intensidades, justifica-se a elevação da IL-6 em nosso estudo. Ademais, como  
408 a IL-6 é uma citocina multifuncional, com papel pró e anti-inflamatório e  
409 também está relacionada ao metabolismo<sup>40,41</sup> e como nossos resultados não  
410 condizem com a elevação do estresse oxidativo, podemos inferir que esta  
411 modulação não foi maléfica e sugerimos que o aumento da IL-6 possa ser  
412 consequência de respostas metabólicas do HIIT.

413 Por outro lado, em relação ao TNF-alfa nossos resultados são  
414 discrepantes aos encontrados por Lira et al.<sup>44</sup> e Isanejad et al.<sup>41</sup>, que  
415 realizaram estudos em ratos saudáveis praticantes de corrida e encontraram,  
416 respectivamente, diminuição e estabilização dessa citocina, demonstrando que  
417 a intensidade e a característica do treino possam ser fatores influenciadores.

418 A musculatura esquelética consome grande quantidade de oxigênio,  
419 aumentando as fontes geradores das EROs, caracterizando a presença do  
420 estresse oxidativo. Um dos estímulos que geram as EROs é a ativação do  
421 complexo NADPH oxidase, que pode ser estimulado pela ativação das  
422 citocinas nas vias de sinalização Nf-Kb e I $\kappa$ -B<sup>7</sup>. A fosforilação de I $\kappa$ -B, induzida  
423 pelo complexo I $\kappa$ -B quinase (IKK), influencia o estresse oxidativo<sup>45,46</sup>. Essa  
424 afirmação já foi comprovada em estudo no músculo sóleo de ratos com IC,  
425 onde ocorreu aumento dos níveis do I $\kappa$ -B fosforilado e do Nf-Kb<sup>6</sup>, através da via  
426 ubiquitinação que ocorre a fosforilação do I $\kappa$ -B e esse se desliga do Nf-Kb, que  
427 migra para o núcleo e se liga com genes alvo<sup>47</sup>.

428 Adicionalmente, no músculo esquelético a subunidade NOX2 é a  
429 mais encontrada e sua ativação depende da fosforilação do p47phox. Quando  
430 há uma diminuição previne-se a disfunção contrátil e o aumento das EROs. Em  
431 nosso estudo, o HIIT mostrou-se uma atividade benéfica para a musculatura  
432 esquelética na HA pois atenuou a ativação das EROs. Ademais, encontramos  
433 diminuição dos níveis de NOX2 no grupo HIIT em comparação com o grupo  
434 WKY, mantendo a subunidade p47phox nos mesmos padrões, mostrando que  
435 o HIIT diminuiu os níveis desta subunidade e neutralizou esta fonte geradora  
436 de EROs<sup>48</sup>. Uma pesquisa experimental em ratos na fase de IC, observou no  
437 músculo sóleo aumento da peroxidação lipídica, que caracteriza o estresse  
438 oxidativo que foi combatido com o exercício<sup>7</sup>.

439 A discordância entre os resultados dos estudos citados e nossos  
440 resultados possivelmente se relaciona com o tipo de exercício realizado. De

441 fato, um estudo em ratos com IC, devido estenose aórtica, realizou exercício  
442 aeróbio por 8 semanas e não observou melhora da via NADPH na musculatura  
443 periférica (músculo sóleo) com o exercício<sup>7</sup>. Por isso acreditamos que os  
444 resultados podem estar relacionados com as características dos músculos  
445 esqueléticos e com o tipo e intensidade do exercício.

446 Os resultados encontramos em nosso estudo, podem estar  
447 relacionados ao fato do HIIT influenciar mecanismos compensatórios no  
448 músculo esquelético que não estão ativados em indivíduos sedentários, mesmo  
449 que sejam saudáveis. Ou seja, o estresse oxidativo na musculatura periférica  
450 independe da presença de doenças ou não. Possivelmente, a condição de  
451 sedentarismo seja um fator preponderante para piores condições musculares e  
452 o HIIT (exercício físico) influenciou a melhora do músculo esquelético, tornando  
453 esse músculo de um animal hipertenso com melhores condições bioquímicas e  
454 gênicas quando comparados a animais saudáveis, mas sedentários. Em suma,  
455 pesquisas avaliando o potencial de vascularização da musculatura periférica  
456 são extremamente importantes pois provavelmente esses mecanismos sejam  
457 potencializados pelo HIIT e também ajudem na proteção do estresse oxidativo  
458 na musculatura esquelética.

459

#### 460 **4. CONCLUSÃO**

461 O HIIT produz efeitos benéficos pela modulação de componentes da  
462 cascata inflamatória e minimiza o estresse oxidativo na musculatura  
463 esquelética de ratos espontaneamente hipertensos.

#### 464 **5. REFERÊNCIAS**

465

- 466 1. Duran AT, Garber CE, Comelius T, Schwartz JE, Diaz KM. Patterns of  
467 Sedentary Behavior in the First Month After Acute Coronary Syndrome. *Journal*  
468 *of the American Heart Association*. 2019;8(15):1-22.
- 469 2. Gomadam P, et al. Blood Pressure Indices and Cardiovascular Disease  
470 Mortality in Persons With or Without Diabetes Mellitus. *Journal of Hypertension*.  
471 2018;36(1):85–92.
- 472 3. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac*  
473 *Failure Review*. 2017;3(1):7–11.
- 474 4. Nogueira PR, Rassi S, Correa KDS. Epidemiological, Clinical and Therapeutic  
475 Profile of Heart Failure in a Tertiary Hospital. *Arquivos brasileiros de*  
476 *cardiologia*. 2010;95(3):392-398.

- 477 5. Mangner N, et al. Skeletal Muscle Alterations in Chronic Heart Failure:  
478 Differential Effects on Quadriceps and Diaphragm. *Journal of Cachexia,*  
479 *Sarcopenia and Muscle*. 2015;6(4):381-390.
- 480 6. Martinez PF, et al. Influence of N-Acetylcysteine on Oxidative Stress in Slow-  
481 Twitch Soleus Muscle of Heart Failure Rats. *Cellular Physiology and*  
482 *Biochemistry*. 2015;35(1):148-159.
- 483 7. Gomes MJ, et al. Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity  
484 and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats With Aortic Stenosis-Induces  
485 Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1-12.
- 486 8. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and  
487 Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxidants &*  
488 *Redox Signaling*. 2014;20(1):164-182.
- 489 9. Kelley RC, Ferreira LF. Diaphragm Abnormalities in Heart Failure and Aging:  
490 Mechanisms and Integration of Cardiovascular and Respiratory  
491 Pathophysiology. *Heart Failure Reviews*. 2017;22(2):191–207.
- 492 10. Liu J, Saul D, Boker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF. Current Methods for  
493 Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *Biomed Res Int*.  
494 2018;2018:1-11.
- 495 11. Tickner A, Thorng S, Martin M, Marmolejo V. Management of Isolated Anterior  
496 Tibial Tendon Rupture: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of*  
497 *Foot & Ankle Surgery*. 2019;58(2):213-220.
- 498 12. Buchheit M, Laursen PB. High-Intensity Interval Training, Solutions to the  
499 Programming Puzzle. *Sports Medicine*. 2013;43(5):313-338.
- 500 13. Ferreira LF, Laitano O. Regulation of NADPH Oxidases in Skeletal Muscle.  
501 *Free Radical Biology & Medicine*. 2016;98:18–28.
- 502 14. Cavalcante AGM, Bruin PFC. The Role of Oxidative Stress in COPD: Current  
503 Concepts and Perspectives. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*.  
504 2009;35(12):1227-1237.
- 505 15. Costa S, Reina-Couto M, Albino-Teixeira A, Sousa T. Estatinas e Stresse  
506 Oxidativo na Insuficiência Cardíaca Crónica. *Portuguese Journal of Cardiology*.  
507 2016;35(1):41-57.
- 508 16. Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-κB Signaling in Skeletal  
509 Muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(1):388-395.
- 510 17. Pescatello LS, MacDonald HV, Lamberti L, Johnson BT. Exercise for  
511 Hypertension: A Prescription Update Integrating Existing Recommendations  
512 with Emerging Research. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(11):87.
- 513 18. Tjonna AE, et al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate  
514 Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome: A Pilot Study. *Circulation*.  
515 2008;118(4):346-54.
- 516 19. Ciolac EG. High-intensity interval training and hypertension: maximizing the  
517 benefits of exercise? *Am J Cardiovasc Disease*. 2012;2(2):102-110.
- 518 20. American College of Sports M. Thompson WR, Gordon NF, Pescatello LS.  
519 ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. Philadelphia:  
520 Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
- 521 21. Hannan AL, et al. High-intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity  
522 Continuous Training Within Cardiac Rehabilitation: A Systematic Review and  
523 Meta-Analysis. *Journal of Sports Medicine*. 2018;9(1):1-17.
- 524 22. Guimarães GV, Ciolac EG, Carvalho VO, D'Avila VM, Bortolotto LA, Bocchi EA.  
525 Effects of Continuous vs Interval Exercise Training on Blood Pressure and  
526 Arterial Stiffness in Treated Hypertension. *Hypertension Research*.  
527 2010;33(6):627-632.

- 528 23. Su L, Fu J, Sun S, Zhao G, Cheng W, Dou C, Quan M. Effects of HIIT and  
529 MICT on cardiovascular risk factors in adults with overweight and/or obesity: A  
530 meta-analysis. *PLOS ONE*. 2019;14(1):1-21.
- 531 24. Institute for laboratory Animals Research (2011). Guide for the Care and Use of  
532 Laboratory Animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- 533 25. Okoshi K, et al. Neuregulins Regulate Cardiac Parasympathetic Activity  
534 Muscarinic Modulation of B-Adrenergic Activity in Myocytes From Mice With  
535 Neuregulin-1 Gene Deletion. *Circulation*. 2004;110:713-717.
- 536 26. Okoshi MP, et al. Aldosterone Directly Stimulates Cardiac Myocyte  
537 Hypertrophy. *Journal of Cardiac Failure*. 2004;10(6):511-518.
- 538 27. Okoshi K, et al. Improved Systolic Ventricular Function With Normal Myocardial  
539 Mechanics in Compensated Cardiac Hypertrophy. *Japanese Heart Journal*.  
540 2004;45(4):647-656.
- 541 28. Pagan LU, et al. Long-Term Low Intensity Physical Exercise Attenuates Heart  
542 Failure Development in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. *Cellular*  
543 *Physiology and Biochemistry*. 2015;36(1):61-74.
- 544 29. Rossoni LV, et al. Cardiac Benefits of Exercise Training in Aging Spontaneously  
545 Hypertensive Rats. *Journal of Hypertension*. 2011;29(12):2349-2358.
- 546 30. Haram PM, et al. Aerobic Interval Training vs Continuous Moderate Exercise in  
547 The Metabolic Syndrome of Rats Artificially Selected for Low Aerobic Capacity.  
548 *Cardiovascular Research*. 2009;81(4):723-732.
- 549 31. Moreira JBN. High-versus Moderate-Intensity Aerobic Training Effects on  
550 Skeletal Muscle of Infarcted Rats. *Journal of Applied Physiology*.  
551 2013;114(8):1029-1041.
- 552 32. Wisloff U, et al. Superior Cardiovascular Effect of Aerobic Interval Training  
553 versus Moderate Continuous Training in Heart Failure Patients: a Randomized  
554 Study. *Circulation*. 2007;115(24):3086-3094.
- 555 33. Pacagnelli F, et al. Physical Training Attenuates Cardiac Remodeling in Rats  
556 With Supra-Aortic Stenosis. *Experimental & Clinical Cardiology*.  
557 2014;20(8):3889-3905.
- 558 34. Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total  
559 Antioxidant Performance: A Validated Fluorescence Assay for the  
560 Measurement of Plasma Oxidizability. *Analytical Biochemistry*.  
561 2006;354(2):290-298.
- 562 35. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. Protective Effects of  
563 Carvacrol Against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain,  
564 Liver, and Kidney. *Biochemistry Research International*. 2016;2016:1-7.
- 565 36. Lima ARR, et al. Heart Failure-Induced Diaphragm Myopathy. *Cellular*  
566 *Physiology and Biochemistry*. 2014;34(2):333-345.
- 567 37. Martinez PF, et al. Chronic Heart Failure-Induced Skeletal Muscle Atrophy,  
568 Necrosis, and Changes in Myogenic Regulatory Factors. *Medical Science*  
569 *Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*.  
570 2010;16(12):374-383.
- 571 38. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for Diagnosis of Aerobic  
572 Training in Rats Based on Lactate Threshold. *Comparative Biochemistry and*  
573 *Physiology*. 2005;140(4):409-413.
- 574 39. Antunes BM, Rossi FE, Inoue DS, Neto JCR, Lira FS. Imunometabolismo e  
575 Exercício Físico: Uma nova fronteira do conhecimento. *Motricidade*.  
576 2017;13(1):85-98.



- 577 40. Zwetsloot KA, John CS, Lawrence MM, Battista RA, Shanely RA. High-intensity  
578 interval training induces a modest systemic inflammatory response in active,  
579 young men. *Journal of Inflammatory Research*. 2014;7:9-17.
- 580 41. Isanejad A, Saraf ZH, Mahdavi M, Gharakhanlou R, Shamsi MM, Paulsen G.  
581 The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1,  
582 IL-6, TNF- $\alpha$  and HSP72 in rat skeletal muscle. *Cytokine*. 2015;73:302-308.
- 583 42. Gleeson M. Interleukins and exercise. *J Physiol*. 2000;529(1):1.
- 584 43. Willoughby DS, VanEnk C, Taylor L. Effects of concentric and eccentric  
585 contractions on exercise induced muscle injury, inflammation, and serum il-6. *J*  
586 *Exe Physiol online*. 2003;6(4):8–15.
- 587 44. Lira FS et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat  
588 skeletal muscle. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(7):458–461.
- 589 45. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear Factor-Kappa B Signaling in Skeletal  
590 Muscle Atrophy. *Journal of Molecular Medicine*. 2008;86(10):1113–1126.
- 591 46. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB Kinase  
592 Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKKalpha and IKKbeta,  
593 Necessary for IkappaB Phosphorylation and NF-kappaB Activation. *Cell*.  
594 1997;91(2):243–252.
- 595 47. Ghosh S, Karin M. Missing Pieces in the NF-kappaB Puzzle. *Cell*. 2002;109:81-  
596 96.
- 597 48. Bowen TS, et al. High-intensity interval training prevents oxidant-mediated  
598 diaphragm muscle weakness in hypertensive mice. *The FASEB Journal*.  
599 2017;31:60-71.

600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626

627  
628  
629  
630  
631

## ANEXO A- APROVAÇÃO ÉTICA

13/02/2020

Certificado

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

### Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO GÊNICA DO NF-KB, IK-B DOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5231 e tendo como participante(s) THAYNARA ZANONI D ALMEIDA (discente), BRUNA APARECIDA SANTOS MEDINA (discente), GEOVANA LOURENCO (discente), LUIZ HENRIQUE DE OLIVEIRA FERNANDES (discente), CAMILA CORREA (participante externo), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (docente), FRANCIS LOPES PACAGNELLI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.


Este Projeto de Pesquisa, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 13/03/2019.

#### MATERIAL ARMAZENADO DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
1167-2016	25/02/2015	Instituição Externa	NÃO	Unesp, Botucatu

Presidente Prudente, 13 de Fevereiro de 2020.

  
Prof. Doutor Rodrigo Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

  
Prof. Ms. Adriana Fátima de Brito  
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3229-2070 - cpdi@unoeste.br  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2070 - cep@unoeste.br  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2070 - ceua@unoeste.br

valide este documento em [www.unoeste.br/sgp/informando](http://www.unoeste.br/sgp/informando) o código de segurança 082d427f976f0285ca803b55439fe27a

<https://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=082dd27f976f0285ca803b55439fe27a>

1/1

632  
633  
634  
635

636

637 **ANEXO B– NORMAS PARA AUTORES DA REVISTA: INTERNATIONAL**  
 638 **JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY**  
 639

640 **Diretrizes para autores**

641 **Diretrizes para autores**

642 **O *International Journal of Experimental Pathology* (anteriormente *British Journal of***  
 643 ***Experimental Pathology*) é publicado continuamente desde 1920. Ele é publicado apenas em**  
 644 **formato online desde janeiro de 2014.**

645 **1. Objetivos e escopo**

646 **A Patologia Experimental abrange o uso de técnicas científicas multidisciplinares para investigar a**  
 647 **patogênese e a progressão dos processos patológicos.**

648 *O International Journal of Experimental Pathology - IJEP* - tem como objetivo publicar artigos de  
 649 alta qualidade que ofereçam insights novos e imaginativos sobre a Patologia Experimental,  
 650 ajudando assim a elucidar ainda mais os mecanismos subjacentes à doença. Fundado em 1920 pelo  
 651 falecido Paul Fildes (como o *British Journal of Experimental Pathology*), o *IJEP* contribuiu com vários  
 652 avanços importantes na literatura científica biomédica, desde a observação original da penicilina:  
 653 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles / PMC2566493/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566493/) ao primeiro relatório do modelo  
 654 animal do vírus Ebola: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547435>  
 655 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc / artigos / PMC1997188/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1997188/)

656 Para continuar a atingir esse objetivo, o *IJEP* considera para publicação de artigos em um amplo  
 657 espectro de abordagens investigativas. Isso pode ocorrer na forma de estudos *in vitro*, modelos  
 658 animais e pesquisa clínica. Os principais objetivos são: (i) relatar trabalhos que abordem o tema  
 659 comum de mecanismo em nível celular e molecular; e (ii) interpretar este trabalho como um  
 660 relatório científico acadêmico *per se*, e em um contexto de tradução.

661 Assim, o *IJEP* fornece um fórum para publicação sobre patologia e etiologia de doenças humanas e  
 662 veterinárias, processos inflamatórios agudos e crônicos (infecciosos e não infecciosos), lesões  
 663 toxicológicas e traumáticas, doenças degenerativas e iatrogênicas, fibrose e câncer.

664 Existem três formas de publicação do *IJEP* : (i) trabalhos de pesquisa originais que relatam  
 665 diretamente investigações experimentais; (ii) artigos de revisão (contribuídos e encomendados) e  
 666 (iii) cartas ao Editor sobre os tópicos abordados na Revista, aos quais os autores são convidados a  
 667 responder.

668 No que diz respeito aos documentos originais, com base nos objetivos e metas descritos acima, o  
 669 *IJEP* reconhece que pode ser necessário incorporar uma grande variedade de métodos no texto. A  
 670 ênfase está nas investigações orientadas por hipóteses, em vez de relatos de casos e estudos  
 671 descritivos.

672 Há uma longa tradição do *IJEP* de publicar artigos de revisão. Às vezes, eles se concentram em  
 673 temas individuais. Por exemplo, o artigo de revisão mais duradouro do *IJEP* explorou modelos  
 674 animais de esteato-hepatite: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0959-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x/abstract)  
 675 [9673.2006.00465.x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x/abstract) e outra revisão recente analisou os modelos moleculares que são  
 676 importantes no estudo da distrofia muscular.

677 Outros são publicados como uma série: os temas incluem angiogênese, modelos experimentais de  
 678 doença renal e biologia e patologia de tendões.

679 *O IJEP* tradicionalmente se interessa pelo microambiente do tecido conjuntivo - sua estrutura e sua  
 680 relação com os processos dinâmicos, geralmente crônicos, que ocorrem nele, bem como a  
 681 patologia dos próprios tecidos. A relação entre o local do tecido, célula e matriz, inflamação e  
 682 cicatrização, tem sido explorada em muitos locais diferentes, particularmente no pulmão e na  
 683 articulação sinovial. Além disso, o *IJEP* patrocina e publica a série de palestras do Prêmio Fell Muir  
 684 neste campo, organizado pela Sociedade Britânica de Biologia de Matrizes.

685 *O IJEP* presta especial atenção ao fato de que a pesquisa relatada está em conformidade com os  
 686 padrões éticos atualmente aceitos; que conflitos de interesse são declarados; e que fontes de

687 financiamento e outras formas de assistência sejam reconhecidas. Mais detalhes sobre como esses  
688 aspectos devem ser abordados são discutidos abaixo.

## 689 **2. Requisitos do idioma inglês**

690 *O IJEP* é incapaz de realizar correções de linguagem, que é de responsabilidade do autor. Os artigos  
691 não serão enviados da Revista imediatamente se não atenderem a esses critérios. Os artigos devem  
692 ser redigidos em inglês claro e conciso. A ortografia deve seguir o Concise Oxford Dictionary of  
693 Current English. Evite jargões e neologismos. Onde o inglês não é o primeiro idioma dos autores, o  
694 trabalho deve ser verificado por um falante nativo de inglês.

### 695 **Suporte para preparação de artigos**

696 **Wiley Editing Services** oferece ajuda especializada na edição em inglês, bem como tradução,  
697 formatação de manuscrito, ilustração de figuras, formatação de figuras e design gráfico abstrato -  
698 para que você possa enviar seu manuscrito com confiança. Além disso, consulte nossos recursos  
699 para **Preparar seu artigo** para obter orientações gerais sobre como escrever e preparar seu  
700 manuscrito.

## 701 **3. Ética e Política de Publicação**

### 702 **3.1 Política ética**

703 *O IJEP* presta especial atenção ao fato de que as pesquisas relatadas estão em conformidade com  
704 os padrões éticos.

705 As informações sobre várias questões relacionadas à ética da publicação são tratadas nas seções  
706 relevantes abaixo, mas são descritas na íntegra em um documento separado **Ethical Policies do**  
707 **International Journal of Experimental Pathology**.

708 Essas políticas éticas são baseadas nas **Diretrizes de Boas Práticas sobre Ética das Publicações:**  
709 **uma Perspectiva do Editor**, ed. De Wiley e Código de Conduta COPE e Diretrizes de Boas Práticas  
710 para Editores de Revistas.

711 *O IJEP* é membro do **Comitê de Ética em Publicações (COPE)**. Os princípios do COPE são que a  
712 submissão é considerada com a condição de que os trabalhos não sejam publicados anteriormente  
713 e não sejam oferecidos simultaneamente em outros lugares; que todos os autores (definidos  
714 abaixo) tenham lido e aprovado o conteúdo; que todos os autores divulguem conflitos de  
715 interesses financeiros e outros; e que o trabalho está em conformidade com as políticas éticas da  
716 Revista, tendo sido conduzido sob padrões éticos internacionalmente aceitos após revisão ética  
717 relevante por uma autoridade ética designada.

### 718 **3.2 Estudos em Animais**

719 Os manuscritos que descrevem estudos envolvendo animais devem obedecer às diretrizes locais /  
720 nacionais que regem o uso de animais experimentais e devem conter uma declaração indicando  
721 que os procedimentos foram aprovados pelo órgão regulador apropriado.

### 722 **3.3 Estudos em humanos**

723 Os manuscritos relacionados a estudos em humanos devem conter declarações indicando que foi  
724 obtido um consentimento informado e por escrito, que os estudos foram realizados de acordo com  
725 a **Declaração de Helsinque I** e que os procedimentos foram aprovados por um comitê de ética  
726 local. Se os indivíduos puderem ser identificados em uma publicação (por exemplo, a partir de  
727 imagens), os autores deverão obter consentimento explícito dos indivíduos.

### 728 **3.4 Declarações de conflitos de interesse (s)**

729 Conflitos de interesse (s) - incluindo uma declaração nula - são uma seção obrigatória em artigos  
730 publicados na Revista.

731 Todos os autores devem incluir detalhes completos de quaisquer conflitos de interesse na seção  
732 Conflitos de interesse. Os autores são obrigados a divulgar **interesses financeiros** (por exemplo,  
733 emprego, participação acionária significativa, direitos de patente, consultoria, financiamento de  
734 pesquisas etc.) em qualquer empresa ou instituição que possa se beneficiar com sua publicação.  
735 Todos os autores devem fornecer detalhes de **quaisquer outros interesses concorrentes potenciais**  
736 **de natureza pessoal que os leitores ou editores possam considerar relevantes para sua**  
737 **publicação**.

738 Além desta seção no próprio manuscrito, após a aceitação para publicação, todos os autores  
739 devem fornecer todos os detalhes de tais conflitos de interesse enviando-os por e-mail para a  
740 assistente editorial da Revista Biljana Nikolic [b.nikolic@ucl.ac.uk](mailto:b.nikolic@ucl.ac.uk).

741 Observe que os revisores também são obrigados a fornecer informações sobre quaisquer conflitos  
742 de interesse.

743 Detalhes mais completos sobre a natureza dessas declarações estão nas **Políticas Éticas do**  
744 ***International Journal of Experimental Pathology***.

### 745 **3.5 Declaração de financiamento**

746 Todos os documentos devem incluir uma seção Declaração de financiamento, na qual a divulgação  
747 de fontes de financiamento é incluída em uma seção separada no documento. Todas as **fontes de**  
748 **financiamento devem ser divulgadas**. Isso inclui fontes governamentais, industriais, beneficentes,  
749 filantrópicas e / ou pessoais. A questão principal é a transparência sobre como os estudos descritos  
750 no manuscrito foram mantidos. Onde apropriado, o financiamento deve ser atribuído ao (s) autor  
751 (es) relevante (s).

### 752 **3.6 Agradecimentos**

753 Todos os trabalhos devem incluir uma seção de Agradecimentos, onde todos os agradecimentos  
754 estão agrupados. A seção Agradecimentos pode incluir comentários que reconheçam a entrada no  
755 manuscrito que não faz parte da autoria, mas é útil. Por exemplo, bem-estar animal, idioma,  
756 orientação científica, assistência estatística e técnica podem ser registrados nesta seção. Os  
757 autores devem agradecer àqueles que fizeram contribuições substanciais ao estudo ou preparação  
758 do manuscrito, mas cujas contribuições não atendem aos requisitos de autoria - veja abaixo.

### 759 **3.7 Autoria**

760 Todos os autores devem cumprir os três critérios a seguir:

761 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da Austrália (DN-P, FM) e pelo Conselho Nacional  
762 de Saúde e Pesquisa Médica da Austrália Senior Research Fellowship (DN-P).

763 Este trabalho foi financiado por uma bolsa da agência brasileira CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, Procs. N  
764 ° 301596/ 2011-5; 475148 / 2012-6) e FAPEG (Fundação de Pesquisa de Goiás, Procs N ° 05/2012).

765 Este trabalho foi financiado pela Fundação Memorial Uehara, Tóquio, Japão e por Grants-in-Aid for Research Research (23390480  
766 e 23792512) do Ministério da Educação, Cultura, Esportes, Ciência e Tecnologia, Tóquio, Japão.

767 Este trabalho foi financiado por doações da Fundação Nacional de Ciências Naturais da China (nº 81272252), Fundação de Ciências  
768 Naturais da província de Jiangsu (nº BK2011656).

769 · Contribuições substanciais ao projeto de pesquisa ou à aquisição, análise ou interpretação dos  
770 dados,

771 · Elaboração do manuscrito ou revisão crítica, e

772 · Aprovação das versões submetida.

## 773 **4. Processo de Submissão e Revisão do Manuscrito**

### 774 **4.1 O processo de revisão**

775 Todos os manuscritos submetidos estão sujeitos a revisão por revisores experientes, e as opiniões  
776 dos revisores e do Conselho Editorial são consideradas pelo Editor. Os autores podem sugerir os  
777 nomes dos revisores adequados em uma carta de apresentação ou através do site, se assim o  
778 desejarem. O Editor seleciona e aceita manuscritos adequados para publicação - a decisão do  
779 Editor. Os manuscritos aceitos para publicação são copiados e tipificados. As provas são enviadas ao  
780 Autor Correspondente para uma verificação final, mas alterações extensivas nas provas podem ser  
781 cobradas dos colaboradores.

### 782 **4.2 Condições de aceitação**

783 Os manuscritos são aceitos com o entendimento de que nenhuma parte substancial foi ou será  
784 publicada em outro lugar. Todos os manuscritos submetidos serão examinados para possível  
785 sobreposição e duplicação de trabalhos já publicados. Os manuscritos podem estar sujeitos a  
786 revisão editorial sem aviso prévio e permanecem os direitos autorais da Revista. Se um manuscrito  
787 que foi devolvido aos autores para revisão não for recebido de volta no escritório editorial após 90  
788 dias, será tratado como uma nova submissão. O Editor se reserva o direito de tomar a decisão final  
789 de aceitar ou não um manuscrito. O autor que envia um manuscrito para publicação é responsável  
790 por garantir que todos os outros autores concordem com a sua submissão. Todos os manuscritos  
791 devem ser acompanhados de uma carta de apresentação aprovada e assinada pelo autor  
792 correspondente em nome de todos os autores. As pessoas nomeadas nos agradecimentos e os  
793 responsáveis por qualquer comunicação pessoal devem ter concordado formalmente com os  
794 nomes que aparecem.

### 795 **4.3 Submissão on-line**

796 Os manuscritos devem ser enviados on-line em <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

797 Para enviar os autores, será necessário um ID de usuário e senha, que podem ser obtidos no  
798 primeiro uso do site de envio. Instruções completas são fornecidas ao acessar o site. Todos os tipos  
799 de arquivo são suportados, mas para ajudar o Editor e os revisores a visualizar o envio, os seguintes  
800 tipos são recomendados:

801 Texto: Microsoft Word (.doc ou .docx) ou formato rich text genérico (RTF).

802 Para detalhes sobre os formatos de envio de Tabelas e Figuras, consulte a seção Tabelas e Figuras:  
803 7.

804 Formato do Manuscrito.

805 É altamente recomendável que, sempre que possível, os autores combinem todas as partes de sua  
806 submissão em um único documento. Como alternativa, os autores podem enviar o texto do  
807 manuscrito (incluindo página inicial, resumo, corpo do texto, referências e legendas para tabelas e  
808 \_guras) como um documento, com tabelas e \_guras como um arquivo separado. A ajuda e o  
809 suporte completos para envios on-line são fornecidos por e-mail ([ts.mcsupport@thomson.com](mailto:ts.mcsupport@thomson.com))  
810 ou telefone (+1 434 964 4100 / + 1 888 503 1050)

### 811 5. OnlineOpen

812 O OnlineOpen está disponível para autores de trabalhos de pesquisa primários que desejam  
813 disponibilizar seus trabalhos para não assinantes na publicação ou cuja agência de financiamento  
814 exige que os beneficiários arquivem a versão final de seu trabalho. Com o OnlineOpen, o autor, a  
815 agência de financiamento do autor ou a instituição do autor paga uma taxa para garantir que o  
816 documento seja disponibilizado para não assinantes mediante publicação na Wiley Online Library,  
817 bem como depositado no arquivo preferido da agência de financiamento.

818 Para visualizar os termos e condições desses contratos de acesso aberto, visite as Perguntas  
819 frequentes sobre direitos autorais hospedadas no Wiley Author Services  
820 [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) e visite

821 [http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright - License.html](http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-License.html).

822 Todos os papéis do OnlineOpen são tratados da mesma maneira que qualquer outro papel. Eles  
823 passam pelo processo padrão de revisão por pares da Revista e serão aceitos ou rejeitados com  
824 base em seu próprio mérito.

### 825 6. Direitos autorais

826 Quando os manuscritos são aceitos, os autores identificados como Autor Correspondente formal  
827 para o manuscrito receberão um e-mail solicitando que eles acessem os Serviços do Autor; onde,  
828 através do Wiley Author Licensing Service (WALS), eles poderão concluir o contrato de licença em  
829 nome de todos os autores do manuscrito.

830 *Para autores que assinam o contrato de transferência de direitos autorais*

831 Se a opção OnlineOpen não estiver selecionada, o autor correspondente receberá o contrato de  
832 transferência de direitos autorais (CTA) para assinar. Os termos e condições do CTA podem ser  
833 visualizados nas amostras associadas às Perguntas frequentes sobre direitos autorais abaixo:

834 Termos e condições do CTA [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

835 *Para autores que escolherem OnlineOpen*

836 Se a opção OnlineOpen estiver selecionada, o Autor Correspondente poderá escolher os seguintes  
837 Contratos de Acesso Aberto de Licença Creative Commons (OAA):

838 · Licença de atribuição Creative Commons OAA

839 · Licença não comercial de atribuição Creative Commons OAA · Licença não comercial de atribuição  
840 Creative Commons - licença comercial não derivada OAA

841 Para visualizar os termos e condições desses contratos de acesso aberto, visite as Perguntas  
842 frequentes sobre direitos autorais hospedadas no Wiley Author Services

843 [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) e visite

844 [http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright - License.html](http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-License.html).

845 Consulte a seção Abrir online abaixo para obter mais informações.

846 Se a opção OnlineOpen for selecionada e a pesquisa for \_nanciada pelo The Wellcome Trust e por  
847 membros do Research Councils UK (RCUK), o Autor Correspondente terá a oportunidade de  
848 publicar o artigo sob uma licença CC-BY para cumprir com o The Wellcome Requisitos do Trust and  
849 Research Councils UK. Para obter mais informações sobre esta política e a política de auto-  
850 arquivamento compatível com o Journal, visite: <http://www.wiley.com/go/funderstatement> .

**851 7. Formato do manuscrito**

852 Os manuscritos devem ser salvos para envio em formato de espaço duplo.

853 A data de envio utilizada será a data de envio da versão em texto eletrônico. Os autores são  
854 aconselhados a manter uma cópia de todos os manuscritos, pois nenhuma responsabilidade pode  
855 ser aceita por perdas.

856 O texto deve seguir o seguinte formato:

**857 Primeira página:**

858 Uma única 'primeira página' deve conter: (1) o título do manuscrito; (2) um título de curta duração  
859 (não superior a 40 caracteres); (3) o nome do (s) autor (es), incluindo nome e sobrenome; (4) o (s)  
860 departamento (s) em que o trabalho foi realizado; e (5) o nome, endereço postal completo,  
861 número de fax e endereço de e-mail do autor a quem devem ser enviadas as provas e solicitações  
862 de impressão, com o título 'Correspondência'. O Autor Correspondente deve assumir a  
863 responsabilidade de se comunicar com todos os outros autores e obter sua aprovação para a  
864 versão final a ser publicada. Durante a submissão on-line, os Autores Correspondentes podem  
865 nomear um indivíduo, que pode ou não ser um autor, para auxiliá-lo na administração do processo  
866 de publicação. O autor correspondente deve confirmar que todos os autores listados atendem aos  
867 critérios de autoria do **ICMJE** e que ninguém que se qualifica para autoria foi excluído. Consulte a  
868 Seção 3.5.

**869 Segunda página:**

870 A segunda página deve conter um parágrafo resumido, que deve fornecer um relato factual do  
871 contexto em que o estudo foi realizado, o (s) objetivo (s), métodos e resultados e uma breve  
872 conclusão, em não mais que 250 palavras. Para fins de revisão e indexação, até seis 'palavras-  
873 chave' relacionadas aos assuntos discutidos no artigo devem ser identificadas e incluídas no rodapé  
874 do resumo.

**875 Trabalhos Originais de Pesquisa**

876 Os relatórios do trabalho original devem geralmente ser organizados na ordem convencional de  
877 introdução, métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências, com cabeçalhos  
878 adequados para cada parte. Outras subdivisões, com títulos apropriadamente menos significativos,  
879 podem ser usadas. Os resultados podem ser apresentados no texto, em tabelas e figuras, mas o  
880 texto deve, em geral, comentar e não repetir as informações nas tabelas.

**881 Artigos de Revisão**

882 Os documentos de revisão geralmente serão encomendados, mas a Revista também aceita envios  
883 que não foram solicitados. Para revisões não solicitadas, os autores são aconselhados a consultar o  
884 Editor com antecedência. Depois que o Editor concorda em considerar um artigo de revisão, as  
885 diretrizes para envio on-line são as mesmas de um artigo de pesquisa original.

**886 Cartas para o editor**

887 Correspondências relacionadas a artigos que apareceram recentemente na Revista podem ser  
888 publicadas. O Editor se reserva o direito de convidar uma resposta dos autores originais para  
889 publicação ao lado. As cartas devem ter o menor tamanho possível (mas não mais que 1000  
890 palavras de texto, duas figuras ou tabelas ou uma de cada uma e até 10 referências). A  
891 correspondência com a Revista é aceita com o entendimento de que o autor contribuinte licencia o  
892 editor para publicar a carta como parte da Revista ou separadamente dela, no exercício de  
893 quaisquer direitos subsidiários relacionados à Revista e seu conteúdo.

**894 Tabelas e Figuras**

895 Cada legenda da tabela/figura deve ser apresentada juntamente com sua tabela/figura. As  
896 figuras/tabelas devem ser inseridas no texto nas posições apropriadas ou agrupadas ao final. Para  
897 envio on-line, as ilustrações devem ser incorporadas no documento do Word ou carregadas como  
898 arquivos separados. A qualidade deve ser suficiente para a exibição na impressão na tela e na  
899 mesa. Sempre que possível, forneça arquivos de arte digital de alta qualidade. Figuras: JPEG, GIF,  
900 EPS, PNG, Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel e Microsoft Word são aceitáveis. Imagens digitais:  
901 As versões digitais das figuras devem ser fornecidas no formato TIFF. As tabelas e figuras devem ser  
902 numeradas consecutivamente com algarismos arábicos. Cada um deve ter uma legenda descritiva  
903 separada. As chaves devem ser fornecidas nas legendas, não na própria figura. Todas as ilustrações,  
904 desenhos e fotografias, devem ser de boa qualidade, pois haverá atraso se os revisores precisarem

905 ver versões aprimoradas. Como guia, a resolução / especificação ideal para vários tipos de figuras  
906 originais, em seu tamanho final, é a seguinte:

907 Arte e diagramas de linha - Mínimo de 600 dpi em meiotom  
908 (fotografias em preto e branco e em cores) - Mínimo de 300 dpi em  
909 linha e tom (arte de linha e meio-tom combinados) - Mínimo de 600 dpi

910 É melhor usar o software Illustrator ou Photoshop e salvar o material no formato '.eps' ou '.tif'. Se o  
911 autor não puder fornecer esses formatos, salve as figuras no maior número possível de formatos de  
912 arquivo.

913 Para mais informações sobre formatos de arquivo, consulte as instruções na  
914 <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

915 *Ilustrações coloridas*

916 O *IJEP* é publicado apenas online e não há cobrança pela inclusão de figuras coloridas.

917 *Informações de Apoio*

918 Os autores podem fornecer texto ou dados adicionais como 'Arquivos de informações de suporte,  
919 mas o manuscrito principal deve conter informações suficientes para tornar o trabalho inteligível  
920 sem esses arquivos. As informações de suporte são uma parte formal do manuscrito publicado e  
921 normalmente não devem ser republicadas em nenhum outro local.

922 Nossos tipos de arquivos recomendados para Informações de suporte são: .doc / .xls / .ppt / .txt /  
923 .jpg / .jpeg / .gif / .tif / .tiff / .png / .bmp / .eps / .ps / .html / .pdf / .mov / .mpg / .wav / .mp3 /  
924 .wma

925 Observe que as Informações de Suporte não são subeditadas ou lidas como prova, portanto os  
926 autores devem garantir que os arquivos sejam fornecidos prontos para publicação online. Os  
927 tamanhos dos arquivos devem ser tão pequenos quanto possível, para que possam ser baixados  
928 rapidamente e não devem exceder 50 MB.

929 *Medidas*

930 As medições devem ser expressas em unidades SI. Se as observações originais foram registradas  
931 em outras unidades, isso deve ser declarado, juntamente com os fatores de conversão apropriados.

932 *Abreviações padrão*

933 Abreviações padrão devem ser usadas e devem seguir as estabelecidas em Units, Symbols and  
934 Abbreviations (1994) publicadas pela Royal Society of Medicine. As abreviaturas devem ser usadas  
935 com moderação e somente se um nome ou expressão extenso for repetido com frequência ao  
936 longo do manuscrito. As palavras devem aparecer na íntegra na primeira aparição, tanto no resumo  
937 quanto no texto, seguidas da abreviação entre parênteses. Os medicamentos devem ser descritos  
938 por seus nomes oficiais, mas os nomes comerciais devem ser indicados entre parênteses na  
939 primeira vez que o medicamento for citado no texto.

940 *Reconhecimentos*

941 Os autores devem incluir detalhes de aprovação ética, divulgação de conflitos de interesses  
942 financeiros e outros e fontes de financiamento.

943 *Referências*

944 Todas as referências devem ser numeradas consecutivamente em ordem de aparência e devem ser  
945 o mais completas possível. No texto, as citações devem citar as referências em ordem consecutiva,  
946 usando algarismos sobrescritos em árabe. Seguem exemplos de referências:

947 Artigo de revista:

948 1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Aspectos numéricos de projeções pontinas, reticulares  
949 laterais e olivares inferiores em duas zonas corticais paravermiais do cerebelo felino. *J Comp Neurol*  
950 1998; 390: 537-551.

951 Livro:

952 2. Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. Nova York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

953 Observe que as abreviações do título do periódico devem estar de acordo com as práticas do  
954 Chemical Abstracts. Para obter mais informações sobre o estilo de referência da **AMA - Manual de  
955 estilo da AMA**. Qualquer artigo que esteja na imprensa, mas não possua um DOI, não será  
956 considerado uma citação de referência válida e não poderá ser citado.

957 *Otimização para mecanismos de pesquisa*



958 Muitos estudantes e pesquisadores que procuram informações on-line usarão mecanismos de  
959 pesquisa como Google, Yahoo ou similares. Ao **otimizar seus trabalhos para os mecanismos de**  
960 **pesquisa**, os autores aumentarão a chance de alguém encontrar seu trabalho publicado. Isso, por  
961 sua vez, aumentará a probabilidade de seus trabalhos serem vistos e / ou citados em outro  
962 trabalho. Consulte a **Folha de dicas** para otimizar a descoberta de documentos e promovê-los após  
963 a publicação, e a **postagem no blog Wiley Exchanges** para obter conselhos sobre como escolher  
964 palavras-chave para documentos.

#### 965 *Permissões*

966 Os materiais copiados de outras fontes devem ser acompanhados de uma declaração escrita do  
967 autor e da editora, dando permissão ao *International Journal of Experimental Pathology* para  
968 reprodução. Os autores são responsáveis por obter permissão por escrito de pelo menos um autor  
969 dos artigos citados enquanto ainda estão na imprensa, bem como de dados não publicados e de  
970 comunicações pessoais. É de responsabilidade do autor garantir que as permissões sejam obtidas.  
971 Nosso **guia** útil tornará seu trabalho mais detectável com a **Otimização de mecanismos de**  
972 **pesquisa**.

#### 973 **8. Provas de Página**

974 As provas serão enviadas eletronicamente por e-mail como um arquivo PDF Acrobat. O servidor de  
975 email deve poder aceitar anexos com tamanho de até 4 MB. O Acrobat Reader será necessário para  
976 ler este arquivo. É possível fazer o download gratuito deste software no seguinte site:  
977 [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) Isso permitirá que o arquivo seja aberto, lido  
978 e corrigido na tela. Mais instruções serão enviadas ao mesmo tempo que a prova. As provas serão  
979 publicadas se nenhum endereço de e-mail estiver disponível. Na ausência do autor  
980 correspondente, solicite a um colega que acesse este email para recuperar as provas.

#### 981 **9. Pré-impressões**

982 Esta revista considerará artigos de revisão anteriormente disponíveis como pré-impressões em  
983 servidores não comerciais, como ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv etc. Os autores  
984 também podem publicar a versão submetida de seu manuscrito em servidores não comerciais a  
985 qualquer momento. Solicita-se aos autores que atualizem todas as versões pré-publicação com um  
986 link para o artigo final publicado.

#### 987 **10. Visão Antecipada**

988 O *International Journal of Experimental Pathology* é coberto pelo serviço Early View da Wiley-  
989 Blackwell. Os artigos do Early View são artigos completos em texto completo publicados on-line  
990 antes da publicação em uma edição impressa. Portanto, os artigos estão disponíveis assim que  
991 estiverem prontos, em vez de esperar pela próxima edição agendada. Os artigos do Early View  
992 estão completos e finais. Eles foram totalmente revisados, revisados e editados para publicação, e  
993 as correções finais dos autores foram incorporadas. Por estarem na forma final, nenhuma alteração  
994 pode ser feita após a publicação online. A natureza dos artigos do Early View significa que eles  
995 ainda não têm números de volume, edição ou página, portanto, os artigos do Early View não  
996 podem ser citados da maneira tradicional. Portanto, eles recebem um Identificador de Objeto  
997 Digital (DOI), que permite que o artigo seja citado e rastreado antes de ser alocado para um  
998 problema.

#### 999 **11. Dados e citação de dados**

1000 O *International Journal of Experimental Pathology* incentiva os autores a compartilhar os dados e  
1001 outros artefatos que apóiam os resultados no trabalho arquivando-os em um repositório público  
1002 apropriado. Os autores devem incluir uma declaração de acessibilidade de dados, incluindo um link  
1003 para o repositório que eles usaram, para que essa declaração possa ser publicada juntamente com  
1004 o artigo.

#### 1005 **12. Suporte à promoção de artigos**

1006 O **Wiley Editing Services** oferece **serviços** profissionais de vídeo, design e gravação para criar  
1007 resumos de vídeos compartilháveis, infográficos, pôsteres de conferências, resumos leigos e  
1008 notícias de pesquisa para sua pesquisa - para que você possa ajudar sua pesquisa a receber a  
1009 atenção que merece.

#### 1010 **13. Serviços de autor**

1011 O rastreamento da produção on-line agora está disponível nos Serviços de autor da Wiley-  
1012 Blackwell. Os Serviços de autor permitem que os autores rastreiem seus artigos - uma vez aceitos -  
1013 pelo processo de produção até a publicação on-line. Os autores podem verificar on-line o status de  
1014 seus trabalhos e optar por receber e-mails automatizados nos principais estágios de produção, para  
1015 que não precisem entrar em contato com o editor de produção para verificar o progresso. Visite  
1016 [autoreservices.wiley.com/bauthor](http://autoreservices.wiley.com/bauthor) para obter mais detalhes sobre o rastreamento da produção  
1017 on-line e para uma variedade de recursos, incluindo perguntas frequentes e dicas sobre  
1018 preparação, envio de documentos e muito mais.  
1019