LAÍS OLIVEIRA DELLACQUA

Benefícios cardiovasculares do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos em envelhecimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

LAÍS OLIVEIRA DELLACQUA

Benefícios cardiovasculares do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos em envelhecimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira Dellacqua, Laís
Benefícios cardiovasculares do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos em envelhecimento / Laís Oliveira Dellacqua; orientador Vagner Roberto Antunes. -- São Paulo, 2017.
76 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipertensão. 2. Envelhecimento. 3. Exercício físico. 4. Controle neural da circulação. I. Antunes, Vagner Roberto , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Laís Oliveira Dellacqua

Título da Tese: Benefícios cardiovasculares do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos em envelhecimento

Orientador(a): Dr. Vagner Roberto Antunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:.....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **115** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Vagner Roberto Antunes,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo de alterações na expressão gênica de núcleos hipotalâmicos e bulbares de SHR em envelhecimento submetidos a treinamento aeróbio e sua correlação com o controle neural da circulação*" do qual participam o(s) aluno(s) **Laís Oliveira Dellacqua, Adriana Rugerri** e a pesquisadora **Lisete Compagno Michelini,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **03.10.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 08 de outubro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esse trabalho à minha família e aos meus amigos, que de diversas formas me apoiaram e tornaram esse trabalho possível. Obrigada, eu amo vocês.

Agradecimentos

Por onde começar? Só de pensar já encho os olhos de lágrimas, lágrimas essas de puro agradecimento. Pai e mãe, não caberia nessa tese inteira o quanto foi importante ter tido vocês ao meu lado. Muitas vezes, a maioria delas eu diria, geograficamente distantes, mas dentro do meu coração, da minha alma, dos meus pensamentos, vocês sempre se mantiveram presentes. Me deram colo tantas vezes, e vibraram na arquibancada com cada sucesso. Vocês acreditaram em mim quando nem mesmo eu acreditava. Vocês sabem o quanto eu sou grata e o quanto eu amo vocês. Lê, muito obrigada por sempre me colocar para cima, por me ensinar e enxergar que sou especial, e que não, doutorado não é pra qualquer um. Eu amo muito você! À todos da minha família, minhas tias, minha dinda Auriane, meu padrinho, meus primos, minha vovó Aurea, muito obrigada por sempre se fazerem presentes.

Ju, Bá, o que dizer de vocês? Vocês são minhas primas, minhas irmãs, minhas confidentes. Sempre vibraram com o meu sucesso, e eu sou muito grata por ter vocês em minha vida. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos que SP me trouxe, Hilde, muito obrigada por ter sido meu confidente, meu amigo, meu companheiro científico. Obrigada pelo seu ombro, por me fazer sorrir e comemorar comigo minhas pequenas vitórias.

Natália, “xenti tu céu”, só tenho a agradecer, pois nossa amizade vai muito além dos muros da USP. Obrigada por tudo, pelas nossas conversas no almoço, pelas cervejas, pelos jantarzinhos, pelo vinho, pelas risadas, pelos conselhos.

À todos aqueles que estão ou não mais estão no laboratório, Renato, Izabela, Laiali, Karol, muito obrigada por terem sido sempre tão solícitos, e tão companheiros. Teca, muito obrigada, sua ajuda contribuiu muito para os resultados dessa tese.

Vagner, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de trilhar esse caminho na ciência. Obrigada pela confiança.

Aninha minha flor, nem sei como te agradecer pela paciência e carinho que teve comigo. Sou eternamente grata por tudo o que você me ensinou.

Bárbara, Leonardo, Milene, Luíz e Talita, muito obrigada por toda ajuda científica, pela boa vontade com os ensinamentos, pelos cafés com muita risada, pelos momentos de descontração, pelos desabafos coletivos, pela cerveja e pela amizade. Muito obrigada!

Professor Thiago e professora Ana, muito obrigada por terem sempre as portas do laboratório abertas, por todo conhecimento científico que pude absorver com vocês e por toda ajuda na bancada.

Amanda e professor Newton, muito obrigada pela ajuda com as imunos, por terem permitido que eu pudesse aprender com vocês.

Professora Lisete, muito obrigada pelas tantas horas que você dedicou intelectualmente a esse trabalho.

Aos meus amigos de Vitória, muito obrigada pelas festas, e belas recepções quando eu vinha para Vitória. A um em especial, meu amigo, meu irmão, meu parceiro da vida. Thithi, muito obrigada pelo seu amor comigo, pelo seu colo, pelos seus ouvidos, pelos conselhos e por me arrancar sorrisos mesmo quando eu achava que não conseguiria sorrir.

Sou eternamente grata à todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.

Agradeço à minha agência de fomento, FAPESP, processo número: 2012-22368-7, número USP: 8452573, pelo apoio e suporte financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original’”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Dellacqua LO. Benefícios cardiovasculares do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos em envelhecimento. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: O quadro hipertensivo pode ainda ser agravado quando associado ao envelhecimento, e a prática do exercício físico está relacionada a uma melhora do quadro hipertensivo, pois leva a uma série de ajustes cardiovasculares, que em conjunto reduzem a pressão arterial. ***Objetivos*****:** Avaliar os parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca), a variabilidade cardiovascular, o equilíbrio simpato-vagal, a sensibilidade barorreflexa e quantificar os neurônios positivos para ChAT (colina acetiltransferase) e TH (tirosina hidroxilase) no DMV (núcleo motor dorsal do vago), no NA (núcleo ambíguo) e na região C1 no RVLM (bulbo ventrolateral rostral), em resposta ao treinamento físico aeróbio em ratos em envelhecimento**.** ***Métodos:*** Foram utilizados ratos SHR e WKY com 12-14 meses de idade, divididos em dois grupos: treinados (T) e sedentários (S). O treinamento durou 8 semanas (1 hora/dia 5 dias/semana), com ajustes da velocidade correspondente a 50-60% da capacidade máxima dos mesmos. Um dia antes dos experimentos de análise das variáveis cardiovasculares e da sensibilidade do barorreflexo os animais tiveram a artéria e veia femoral cateterizadas. Os registros de PA (pressão arterial) e FC (frequência cardíaca) e ativação do barorreflexo foram coletados na semana zero (S0), na segunda (T2) e na oitava semana de treino (T8). Para realização da análise imunoistoquímica os animais foram perfundidos com paraformaldeído e os encéfalos removidos e mantidos à -80°C. Após, foram realizados cortes de 30µm no criostato, que foram colocados em lâmina gelatinizada para o protocolo de imunorreação. ***Resultados*****:** O desempenho na esteira dos animais WKY treinados foi maior tanto na quarta semana (T4:0,96±0,03 km/h) quanto na oitava semana (T8:1,0±0,04km/h) quando comparados com seus respectivos controles sedentários (S4:0,46±0,09 e S8:0,32±0,02km/h). O desempenho na esteira dos animais SHR treinados, foi também maior tanto na quarta semana (T4:1,3±0,04km/h) quanto na oitava semana (T8:1,4±0,1km/h) quando comparados com seus respectivos controles sedentários (S4:0,75±0,6 e S8:0,5±0,16km/h). Não houve diferença no peso corporal dos animais no mesmo grupo. A PAS dos animais SHR treinados por 2 e 8 semanas foi menor do que a encontrada nos animais sedentários de 8 semanas (T2:166±6,3mmHg e T8:168±8,2 mmHg *vs* S8:198±6,9 mmHg), bem como a PAD (T2:117±7,0 mmHg e T8:118±6,3 mmHg *vs* S8:141±5,8 mmHg) e a PAM

(T2:141±6,6 mmHg e T8:142±7,3 mmHg *vs* S8:170±6,4 mmHg). A sensibilidade barorreflexa dos animais SHR treinados por 8 semanas foi melhor do que aquela encontrada nos sedentários (S8). A análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP) dos animais SHR treinados por 8 semanas mostrou que o componente HF (alta frequência) foi maior (T8:25,1±3,4ms²) em comparação aos grupos sedentários com 0 (S0:11,5±2,2 ms²) e 8 semanas (S8:7,0±2,8 ms²). O treinamento físico aeróbio por 8 semanas não foi capaz de modificar a contagem de neurônios positivos para ChAT e TH, tanto nos animais SHR quanto nos animais WKY. ***Conclusão:*** O exercício físico foi capaz de melhorar o desempenho em esteira, diminuir a pressão arterial sistólica, diastólica e média, melhorar a sensibilidade barorreflexa e aumentar o componente HF para o coração.

Palavras-chave: Hipertensão.Envelhecimento.Exercício físico.Controle neural da circulação

ABSTRACT

Dellacqua LO.Cardiovascular benefits of aerobic exercise training in aging spontaneously hypertensive rats [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Hypertension can be aggravated when associated with aging, and the practice of exercise training leads to a series of cardiovascular adjustments in the cardiovascular system with a significant improvement of the comorbidities caused by this patology, including reduction in the blood pressure level. **Aims:** To evaluate hemodynamic parameters, cardiovascular variability, sympatho-vagal balance, baroreflex sensitivity and to quantify positive neurons for ChAT (choline acetyltransferase) and TH (tyrosine hydroxylase) on DMV NA and C1 region in RVLM in response to exercise training in aging rats. **Methods:** SHR and WKY rats were used at 12-14 months-age, that were divided into two groups: trained (T) and sedentary (S). The training lasted 8 weeks (1h da; 5 days/week), with speed adjustments corresponding to 50-60% of their maximum capacity. One day before the experiments of cardiovascular variables and baroreflex sensitivity the animals had the femoral artery and vein catheterized for BP (blood pressure) and HR (heart rate) monitoring, and baroreflex activation at week zero (S0), second (T2) and eighth week of training (T8). For immunoassay, the animals were perfused with paraformaldehyde and the brain were removed and maintained at -80 °C. Afterwards, brain section of 30µm were performed in the cryostat for future immunoreaction protocol. **Results:** Treadmill performance of trained WKY was higher in the fourth (T4: 0.96 ± 0.03 km/h) and in the eighth week (T8: 1.0 ± 0.04km/h) of training when compared to their respective sedentary controls (S4: 0.46 ± 0.09 and S8: 0.32 ± 0.02km / h), as well as in the SHR group: T4: 1.3 ± 0.04km/h, and T8: 1.4 ± 0.1km/h when compared to their sedentary controls (S4: 0.75 ± 0.6 and S8: 0.5 ± 0.16km/h). There was no difference in the body weight among animals in the same group. The systolic blood pressure (SBP) of SHR animals trained for 2 and 8 weeks was lower than that found in 8-week sedentary animals (T2: 166 ± 6.3 mmHg and T8: 168 ± 8.2 mmHg vs S8: 198 ± 6, 9 mmHg), as well as diastolic blood pressure (DBP) (T2: 117 ± 7.0 mmHg and T8: 118 ± 6.3 mmHg vs S8: 141 ± 5.8 mmHg) and mean arterial pressure (MAP) (T2: 141 ± 6.6 mmHg and T8: 142 ± 7.3 mmHg vs S8: 170 ± 6.4 mmHg). Baroreflex sensitivity of SHR was greater in trained group for 8 weeks when compared with sedentary control group. The spectral analysis of the pulse interval

(PI) variability, of SHR animals, depicted by HF (high frequency) component was higher in trained animals for 8 weeks (T8: 25.1 ± 3.4ms²) when compared to the sedentary groups with 0 (S0: 11.5 ± 2.2 ms²) and 8 weeks (S8: 7.0 ± 2.8 ms²). Physical exercise was not able to modify the number of ChAT and TH positive neurons in both, SHR and WKY animals at any brainstem nuclei evaluated. **Conclusion:** Exercise training was able to improve treadmill performance, decrease systolic, diastolic and mean blood pressure, improve the baroreflex sensitivity and increase the HF component to the heart.

Key words: Hypertension.Aging.Exercise training.Neural control of circulation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estatística de óbitos relacionados à doenças do aparelho circulatórios... 21

Figura 2- Anatomia do sistema nervoso simpático e parassimpático.....22

Figura 3- Esquema das vias do barorreflexo.....24

Figura 4- Percentual da população acima de 60 anos.....25

Figura 5- Distribuição mundial em percentual de pessoas idosas.....26

Figura 6- Sedentarismo como quarto fatos de risco de óbito mundial.....30

Figura 7- Prevenções e melhoras do exercício físico.....31

Figura 8- Foto dos animais em treinamento de corrida na esteira.....35

Figura 9- Desenho experimental para os protocolos de treinamento físico e sedentarismo.....35

Figura 10- Gráfico de peso dos animais WKY.....40

Figura 11- Gráfico de peso dos animais SHR.....41

Figura 12- Gráfico de desempenho dos animais WKY.....42

Figura 13- Gráfico de desempenho dos animais SHR.....43

Figura 14- Gráficos de parâmetros hemodinâmicos dos animais WKY.....44

Figura 15- Gráficos de parâmetros hemodinâmicos dos animais WKY.....45

Figura 16- Curvas de barorreflexo dos animais WKY.....47

Figura 17- Curvas de barorreflexo dos animais SHR.....49

Figura 18- Gráficos da análise espectral dos animais WKY.....51

Figura 19- Gráficos da análise espectral dos animais SHR.....53

Figura 20- Fotos da imunoistoquímica dos animais WKY.....55

Figura 21- Gráfico da contagem dos neurônios dos animais WKY.....56

Figura 22- Fotos da imunoistoquímica dos animais SHR.....57

Figura 23- Gráfico da contagem dos neurônios dos animais WKY.....58

Figura 24- Gráfico do número de neurônios C1 dos animais WKY x SHR.....59

Figura 25- Figura esquemática do controle neural da circulação.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio.....36

Tabela 2- Parâmetros hemodinâmicos dos animais WKY.....44

Tabela 3- Parâmetros hemodinâmicos dos animais SHR.....46

Tabela 4- Parâmetros relativos à curva de sensibilidade do barorreflexo dos animais WKY.....48

Tabela 5- Parâmetros relativos à curva de sensibilidade do barorreflexo dos animais SHR.....50

Tabela 6- Parâmetros relativos à análise espectral dos animais WKY.....52

Tabela 7- Parâmetros relativos à análise espectral dos animais SHR.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

ChAT Colina Acetiltransferase

CVLM Bulbo ventrolateral caudal

DCV Doença cardiovascular

DMV Núcleo motor dorsal do vago

ECA Enzima conversora de angiotensinogênio

FC Frequência cardíaca

HA Hipertensão arterial

HAS Hipertensão arterial sistêmica

HF componente de alta frequência

IP Intervalo de pulso

LF componente de baixa frequência

NA Núcleo ambíguo

NO óxido nítrico

NTS Núcleo do trato solitário

PAD Pressão arterial diastólica

PAM Pressão arterial média

PAS Pressão arterial sistólica

PVN Núcleo paraventricular

RVLM Bulbo ventrolateral rostral

S Sedentário

SNA Sistema nervoso autônomo

SNC Sistema nervoso central

SNP Sistema nervoso parassimpático

SNS Sistema nervoso simpático

T Treinado

TH Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 Hipertensão neurogênica- epidemiologia 20
1.2 Controle neural da circulação 21
1.3 Envelhecimento 25
1.4 Benefícios do exercício físico no controle cardiovascular 29
2 HIPÓTESE 33
3 OBJETIVOS 34
4 MATERIAIS E MÉTODOS ..... Erro! Indicador não definido.
4.1 Animais experimentais 35
4.2 Protocolos de Treinamento Físico e Sedentarismo 35
4.3 Registro dos parâmetros cardiovasculares 37
4.4 Teste da sensibilidade dos barorreflexo 37
4.5 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso . 38
4.6 Procedimentos de imunohistoquímica 39
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 41
6 RESULTADOS 42
6.1 Análise do peso corporal 42
6.2 Desempenho na esteira 43
6.3 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares 45
6.4 Análise da sensibilidade barorreflexa 48
6.5 Variabilidade da PA e FC de animais submetidos ao treinamento físico ... 52
6.6 Estudos de imunohistoquímica 56
7 DISCUSSÃO 62
7.1 Desempenho em esteira e peso corporal em animais submetidos ao treinamento aeróbio. 62
7.2 Benefícios cardiovasculares em animais hipertensos submetidos ao treinamento aeróbio 63
8 CONCLUSÃO 72

1 INTRODUÇÃO

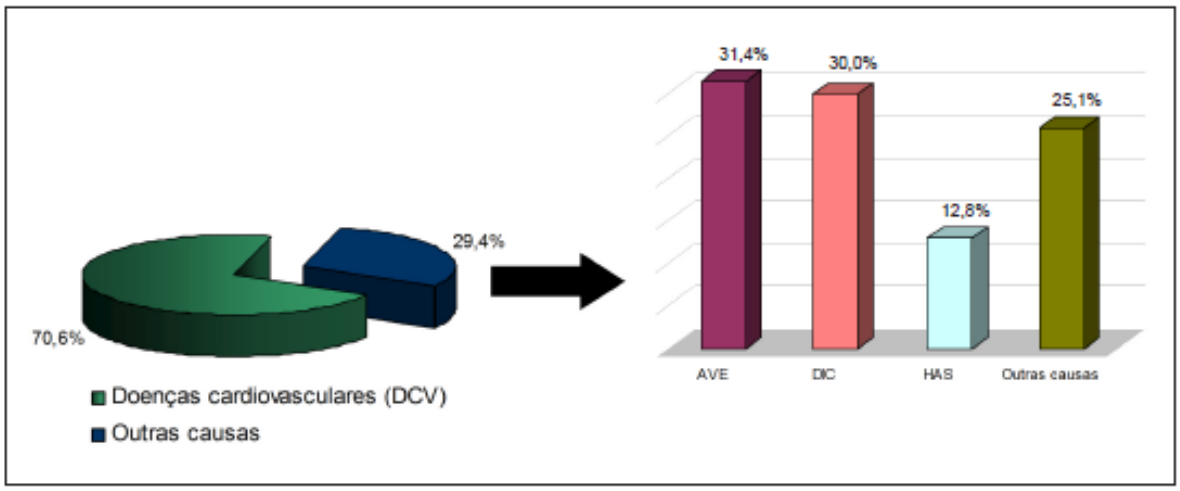
1.1 Hipertensão neurogênica- epidemiologia

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente à alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e à alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Arquivos Brasileiros de Cardiologia,2017; Malta et al., 2009; Williams, 2010).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle e é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 2017). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PA (54% por acidente vascular encefálico e 47% por doença isquêmica do coração) (Williams, 2010), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. No Brasil, as DCV têm sido a principal causa de morte.

Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório, sendo 12,8% relacionadas à hipertensão (Fig 1) (Malta et al., 2009).

Figura 1: Estatística de óbitos relacionados à doenças do aparelho circulatórios



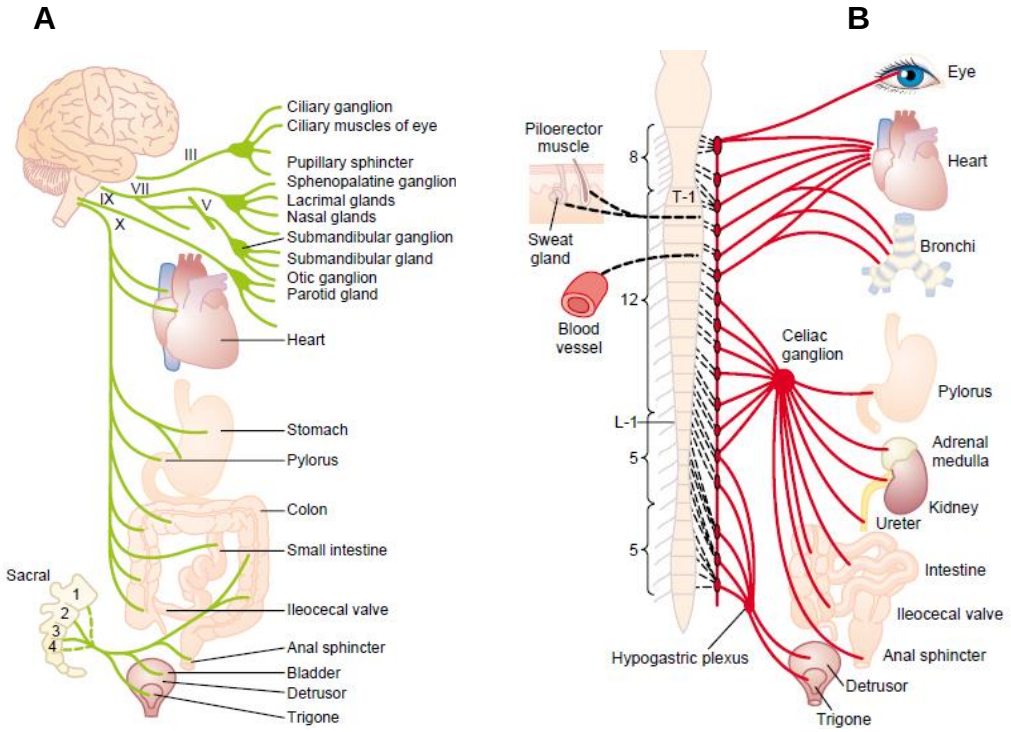
Fonte: Arquivos Brasileiros Cardiologia, 2010

Entre 1990 a 2006, observou-se uma tendência lenta e constante de redução das taxas de mortalidade cardiovascular. As DCV são ainda responsáveis por alta frequência de internações ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (Malta et al., 2009 ; Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 2017). Inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30% considerando-se valores de PA ≥ 140/90 mmHg, Vários estudos encontraram prevalências entre 22,3% e 43,9%, (média de 32,5%), com mais de 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (Cesarino et al., 2008; Rosário et al., 2009). Entre os gêneros, a prevalência foi de 35,8% nos homens e de 30% em mulheres, semelhante à de outros países (Pereira et al., 2009).

1.2 Controle neural da circulação

O sistema nervoso autônomo (SNA) é composto por grupamentos de neurônios aferentes e eferentes que informam ao sistema nervoso central (SNC) alterações fisiológicas que ocorrem nos órgãos periféricos. Este sistema apresenta dois ramos eferentes diferenciados anatômica e funcionalmente, denominados sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP).

Figura 2: Anatomia do sistema nervoso parassimpático e simpático. A: Sistema nervoso parassimpático e B: Sistema nervoso simpático



Fonte: Guyton & Hall, 2006

No que diz respeito ao controle neural da circulação, sabe-se que o SNP inerva o coração e o SNS inerva, além do coração, também os vasos sanguíneos, os rins e a medula da adrenal (Jänig, 2006).

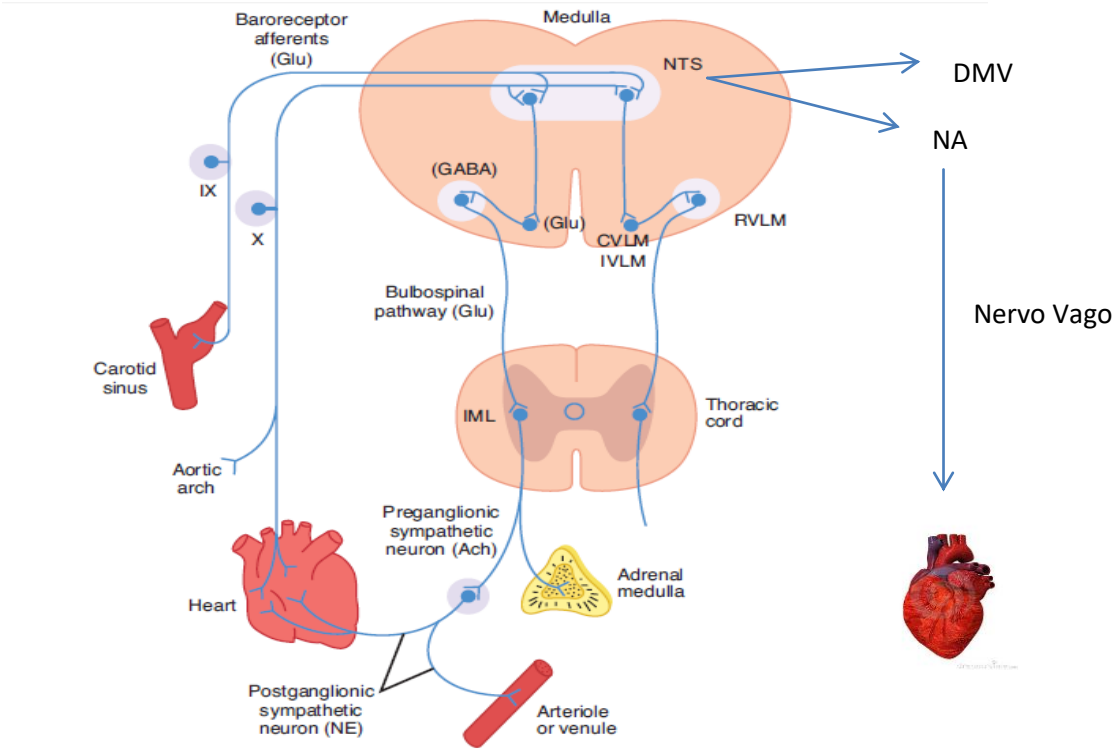
É de amplo conhecimento o papel desempenhado pelo SNA na regulação em curto e longo prazo da PA. A atividade basal do SNA é gerada por uma complexa integração neuronal entre núcleos localizados tanto no tronco-encefálico, tais como, o núcleo do trato solitário (NTS) e os bulbos ventrolateral rostral (RVLM) e ventrolateral caudal (CVLM) bem como, no hipotálamo e na medula espinhal (Dampney, 1994).

Os eferentes autonômicos do controle cardiovascular são divididos em três classes: os termossensíveis, os glicossensíveis e os barossensíveis, sendo este último o de principal relevância para este sistema.

Dentre os núcleos que compõe as via integrativas de controle neural da circulação o NTS é um núcleo que contém uma população heterogênea de neurônios e é a primeira estação sináptica de impulsos nervosos provenientes de fibras aferentes dos barorreceptores localizados, tanto no arco aórtico como na bifurcação das artérias carótidas (La Rovere , Pinna 2014).

O reflexo barorreceptor, quando ativado pelo estiramento dos mecanorreceptores devido ao aumento da pressão arterial na artérias, ativa os neurônios do NTS, que por sua vez ativará o SNP e inibirá o SNS. Isso ocorre devido as projeções do NTS para o CVLM, que ao emitir projeções GABAérgicas para o RVLM, inibe a atividade desses neurônios causando uma diminuição do tônus simpático para o coração e vasos. Além disso, há projeções do NTS para o NA e DMV, e estes contém neurônios pré-glangionares parassimpáticos que uma vez ativados aumentam o tônus vagal para o coração. Essas ações em conjunto, resultam numa diminuição da frequência cardíaca (bradicardia reflexa) e da resistência periférica (simpato-inibição), diminuindo a pressão arterial (Jänig, 2006). (Fig 3)

Figura 3: Esquema das vias do barorreflexo



Fonte: Modificado de: Ganong´s Review of Medical Physiology

Uma série de estudos utilizando abordagens farmacológicas têm evidenciado as diferentes classes de neurotransmissores entre os núcleos envolvidos no controle neural da pressão arterial, principalmente no que diz respeito ao reflexo barorreceptor.

Os interneurônios GABAérgicos do NTS, por exemplo, que estão presentes em regiões que recebem aferentes do barorreflexo, quando estimulados promovem aumento da pressão arterial. Um exemplo disso é que a microinjeção de baclofen (agonista GABAérgico do receptor $GABA_B$) no NTS de ratos Sprague-Dawley, acordados causa um aumento da PAM em torno de 40 mmHg (Persson, 1981). Florentino et al. (1990) realizou o mesmo procedimento, só que em ratos anestesiados, e observou além do aumento da PAM, um aumento significativo da frequência cardíaca. Estudos de Sved e Sved (1990) demonstram que não o estímulo, mas a inibição dos neurônios GABAérgicos do NTS com phaclofen

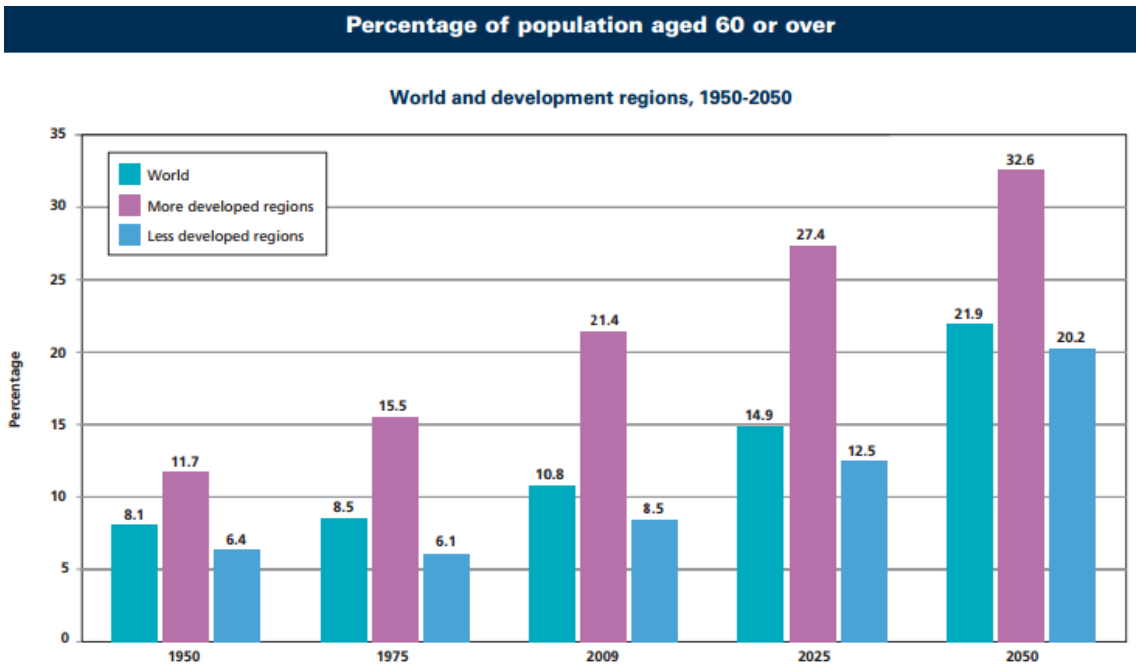
(antagonista GABAérgico do tipo B), e constataram que a inibição do sistema GABAérgico neste núcleo acarreta na queda da pressão arterial.

O glutamato também age excitando neurônios do RVLM, o que leva ao aumento do tônus simpático, com consequente aumento de pressão arterial. Isso pode ser comprovado pelos experimentos realizados por Ross et al. (1984) que demonstraram que o estímulo elétrico ou com glutamato do RVLM causam uma elevação da pressão arterial. Por outro lado, microinjeção de GABA neste mesmo núcleo produz uma redução dose-dependente da pressão arterial.

1.3 Envelhecimento

Em 2009, estima-se que 737 milhões de pessoas tinham 60 anos ou mais, e constituíam a "população mais velha" do mundo, dos quais quase dois terços viviam em países em desenvolvimento. Prevê-se que o seu número aumente para 2 milhões em 2050 (22% da população mundial, Fig 4) , ultrapassando o número de crianças (pessoas com idades compreendidas entre os 0 e os 14 anos) (Nações Unidas, 2009).

Figura 4: Percentual da população acima de 60 anos

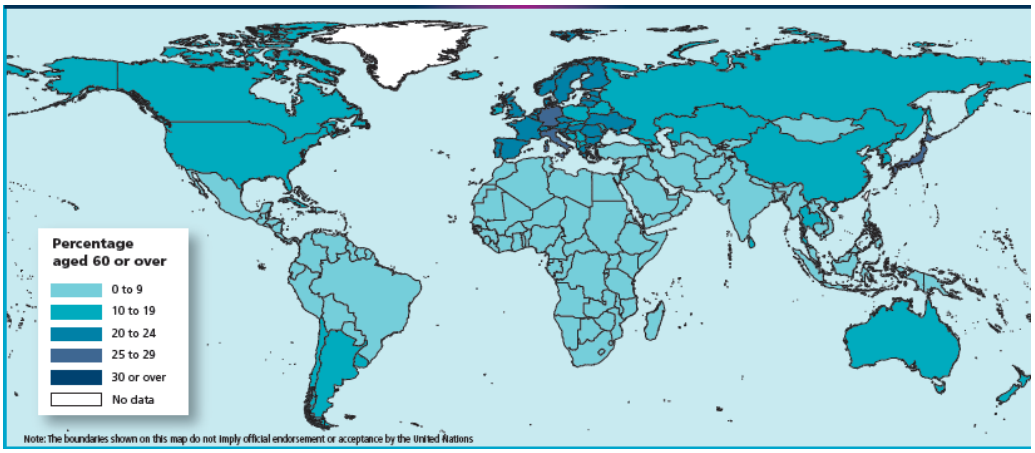


Fonte: Nações Unidas, 2009

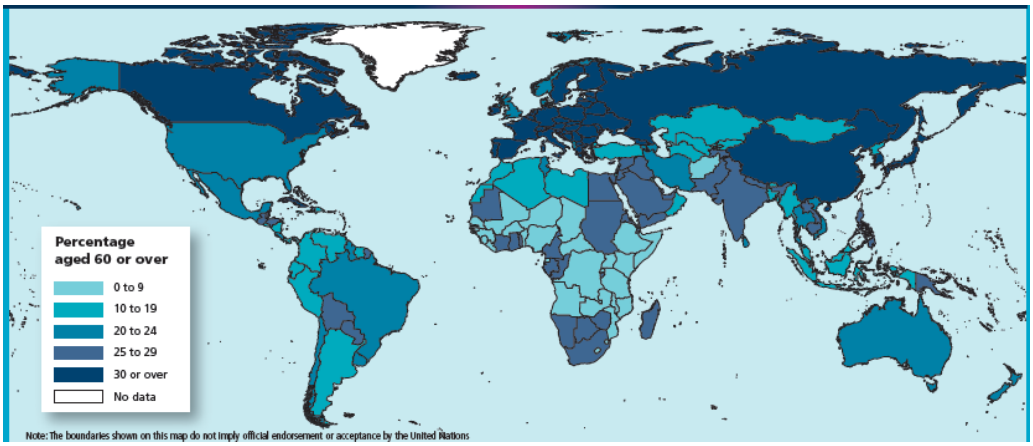
Hoje, mais da metade da população idosa vive na Ásia (54%) e um quinto vive na Europa (21%). Há uma relação direta entre aumento da idade da população e o índice de desenvolvimento do país. No Brasil, por exemplo, em 2009 a população acima de 60 anos era de 0-9%. Estima-se que esse número atinja 20 à 24% em 2050 (Fig 5) (Nações Unidas, 2009).

Figura 5: Distribuição mundial em percentual de pessoas idosas. **A**: 2099 e **B**: 2050

A



B



Fonte: Nações Unidas, 2009

A percentagem de idosos é atualmente mais elevada nos países desenvolvidos. Na Europa, uma em cada cinco pessoas já tem 60 anos ou mais. As proporções equivalentes são uma em cada dez na Ásia e na América Latina e no Caribe, e uma em cada 19 na África (Nações Unidas, 2009). A população mais velha também está envelhecendo. Atualmente, os idosos mais velhos (pessoas com 80 anos ou mais) constituem 14% da população com 60 anos ou mais. Os idosos mais velhos constituem um dos segmentos de crescimento mais rápido da população e, até 2050, 20% da população mais velha terá 80 anos ou mais. O número de centenários (pessoas com 100 anos ou mais) está crescendo ainda mais rápido do que os mais velhos, e deverá crescer nove vezes até 2050, de aproximadamente 454 mil em 2009 para 4,1 milhões em 2050 (Nações Unidas, 2009).

As mudanças que constituem e influenciam o envelhecimento são complexas. No nível biológico, o envelhecimento é associado ao acúmulo de uma grande variedade de danos moleculares e celulares. Com o tempo, esse dano leva a uma perda gradual nas reservas fisiológicas, um aumento do risco de contrair diversas doenças, e um declínio geral na capacidade intrínseca do indivíduo. Porém, essas mudanças não são lineares ou consistentes e são apenas vagamente associadas a idade de uma pessoa em anos, pois o estilo de vida, neste caso, influenciará no aparecimento ou não dessas desordens fisiológicas.

Aos 60 anos de idade, há perdas das funções fisiológicas, ocasionando perdas de audição, visão e movimentos relacionados a idade, bem como doenças não transmissíveis ,incluindo doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias crônicas, câncer e demência. (OMS, 2002). A seguir, como foco desta tese, iremos discutir as modificações fisiológicas que ocorrem no envelhecimento, associadas à hipertensão, e por seguinte as alternativas não farmacológicas, como o exercício físico, e sua função na melhora desse quadro.

Inúmeras disfunções, tanto periféricas (Rossoni et al, 2011) quanto centrais (De Meersman , Stein 2007) ocorrem com o envelhecimento. O avanço da idade, associado à hipertensão, pode estar inserido num contexto fisiológico com diversas modificações.

Alguns estudos mostram que há disfunções autonômicas no envelhecimento e isso poderia ocasionar o aparecimento de doenças do aparelho circulatório. Assim, o envelhecimento pode ser um fator de risco para a piora do quadro hipertensivo,

como mostra Hart et al. (2009). Estes autores descrevem que idosos com média de 60 anos, quando comparados com jovens com média de 26 anos, apresentaram aumento na variabilidade da frequência cardíaca, da pressão arterial sistólica, da atividade nervosa simpática muscular e no conteúdo de norepinefrina plasmática. Além disso, houve uma relação entre o aumento da atividade simpática com o aumento da pressão arterial diastólica e do débito cardíaco. Essa correlação direta parece não ocorrer nos indivíduos jovens, possivelmente devido à existência de algum mecanismo compensatório, que é perdido ao longo dos anos. Ainda se tratando de humanos, outro estudo descreve uma correlação direta entre aumento do sistema nervoso simpático, medido por meio de atividade do nervo peroneal, com o aumento da pressão arterial média, tanto em homens quando em mulheres (Narkiewicz et al,. 2005). Dessa forma, é bem descrito na literatura, que no envelhecimento podemos encontrar uma disfunção autonômica caraterizada por aumento do tônus simpático. Estudos realizando manobras farmacológicas podem comprovar esse desequilíbrio, por exemplo, em um estudo realizado com indivíduos normotensos, no qual jovens tinha me média 24 anos de idade, e idosos 65 anos de idade, receberam o tratamento com bloqueador ganglionar, trimetafan, que é um antagonista de receptores nicotínicos, e houve queda mais acentuada das pressões sistólica, diastólica e média nos indivíduos idosos do que nos jovens, demonstrando um tônus simpático elevado no envelhecimento, mesmo que não acompanhado de um quadro hipertensivo.

O desequilíbrio do SNA é caracterizado não apenas pelo aumento do tônus simpático, mas também pela redução do tônus parassimpático. Essas alterações, em conjunto, podem contribuir de forma significativa com o aparecimento das disfunções no sistema cardiovascular no envelhecimento. Uma análise longitudinal realizada tanto em homens quanto em mulheres onde se avaliou os componentes de variabilidade cardíaca do simpático e parassimpático foi evidenciado uma queda gradativa no componente de alta frequência (HF), que diz respeito à modulação parassimpática (De Meersman , Stein 2007).

Além do desequilíbrio simpato-vagal, a atividade barorreflexa parece estar comprometida no envelhecimento, sendo grandezas inversamente proporcionais (Laitinen et al., 1998). Um dos primeiros a descrever o declínio na sensibilidade barorreflexa foi Gribbin et al. (1971). Seu trabalho incluiu indivíduos de várias faixas

etárias e mostrou um declínio gradual da sensibilidade barorreflexa com o aumento progressivo da idade.

Essas correlações também foram vastamente estudadas em modelo animal, e descritas em literatura. Tanabe e Buñag (1991) demonstraram um prejuízo do barorreflexo em resposta à fenilefrina, caracterizado por diminuição da resposta bradicárdica em ratos mais velhos quando comparados com os mais jovens.

Além do desequilíbrio autonômico, o envelhecimento também promove modificações plásticas nos SNC de ratos. Um estudo abrangendo a hipertensão associada ao envelhecimento analisou o número de neurônios contidos no NA e no DMV, que são núcleos responsáveis pelo tônus parassimpático para o coração. As análises revelaram que estes núcleos em animais SHR mais velhos possuíam menos neurônios do que os núcleos dos animais SHR mais jovens. Além disso, os animais SHR mais velhos também apresentaram menos neurônios nesses núcleos do que os WKY da mesma idade. Os animais SHR jovens e WKY jovens apresentaram o mesmo número de neurônios, mostrando que não só o fator envelhecimento, mas também o fator hipertensão, são deletérios (Corbett et al., 2007).

Essas alterações centrais podem levar à modificações dos níveis pressóricos, como mostrado por Alzoubi et al. (2010), que encontraram a pressão arterial sistólica e média elevadas em ratos com idade avançada (22 meses de vida) em relação aos animais adultos (6 meses). Por este motivo, uma das hipóteses desta tese é que o número de neurônios do DMV poderiam estar alterados em animais SHR quando comparados com os seus controles normotensos (WKY) e que o treinamento físico poderia reverter esta situação.

1.4 Benefícios do exercício físico no controle cardiovascular

Os principais riscos globais de mortalidade no mundo são a hipertensão arterial (responsável por 13% das mortes em todo o mundo), tabagismo (9%), hiperglicemia (6%), sedentarismo (6%) e obesidade (5%) (Fig 6) (OMS, 2009).

Figura 6: Sedentarismo como quarto fatos de risco de óbito mundial

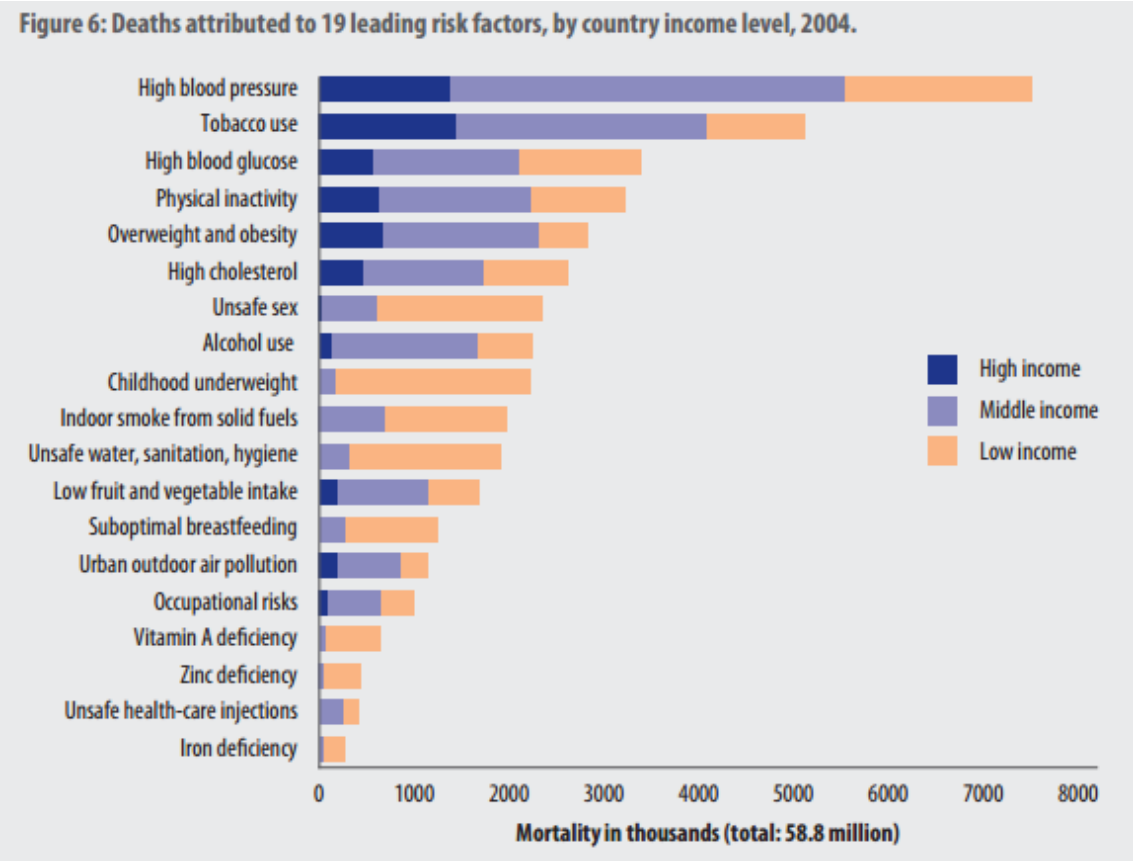


Figura 6: Fonte: OMS 2009

Como citado anteriormente, o sedentarismo é o quarto fator de risco de doenças não transmissíveis. Devido à sua elevada prevalência, é responsável por quase tantas mortes quanto o tabagismo (OMS, 2009).

O estilo de vida inativo leva ao aumento do colesterol, acúmulo de gordura visceral, acompanhado de um sistema imunológico inato e adaptativo, levando à inflamação vascular persistente de baixo grau, que é um importante mecanismo regulatório na aterosclerose. Além disso, o sedentarismo está relacionado ao aumento de doenças cardiovasculares (Alves et al., 2016) e a prática de atividade física está relacionada a uma série de benefícios preventivos e/ou de melhora como prevenção do diabetes, associado à distúrbios cardiovasculares, obesidade,

hipertensão, aterosclerose, melhora os padrões cardiorrespiratórios, inflamação e etc. (Fig 7).

Figura 7: Prevenções e melhoras do exercício físico

Table 1 Summary of the benefits of physical activity in primary prevention

Physical activity in primary prevention	
Prevents	**Improves**
Diseases development associated with cardiovascular disease (hypertension, diabetes and metabolic syndrome)	Physical activity levels and physical fitness (cardiorespiratory fitness and skeletal muscle strength)
Obesity	Prevents weight gains, and improves blood cholesterol profile towards increased HDL blood levels and lower LDL blood levels
Type 2 diabetes	Glycemic control, and improves insulin sensitivity in type 2 diabetics
Hypertension	Prevents the development of hypertension in normotensive individuals, and reduces blood pressure in hypertensive patients
Vascular inflammation and atherosclerosis	Reduces blood concentrations of several inflammatory biomarkers such as C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α

Fonte Alves et al., 2016

Muitos são os benefícios do exercício físico que podem ser relacionados a uma melhora do funcionamento do sistema cardiovascular. Podemos citar, por exemplo, aqueles relativos ao reequilíbrio do sistema nervoso autônomo.

Gava et al. (1995) mostraram em seu trabalho que o treinamento físico de baixa intensidade foi capaz de reduzir o tônus simpático a níveis semelhantes aos encontrados em animais normotensos sedentários, e esta atenuação no tônus simpático parece ser um dos mecanismos responsáveis pela redução da pressão arterial verificada em animais treinados.

Estudos de Moraes-Silva et al. (2010) mostraram que o treinamento físico em esteira por 10 semanas, em animais SHR com 2 meses de idade, foi capaz de

reduzir a frequência cardíaca, pressão sistólica e diastólica, o componente simpático para o coração e vasos, e aumentar o componente parassimpático para o coração. Além disso, eles observaram uma melhora na sensibilidade barorreflexa em resposta a doses crescentes de agentes vasoativos, fenilefrina (vasoconstritor) e nitroprussiato de sódio (vasodilatador).

Um estudo realizado em humanos hipertensos, diabéticos e com dislipidemia, com idade acima de 65 anos, mostrou que o exercício aeróbico por 12 semanas foi capaz de melhorar a sensibilidade barorreflexa nesses indivíduos, porém essa melhora não foi acompanhada de alterações hemodinâmica (Madden KM et al., 2010).

Um estudo de Rossoni et al. (2011) mostrou que o exercício físico em animais idosos (22 meses de idade) e hipertensos foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica, após 4 semanas de treinamento aeróbio. Esta redução foi acompanhada também de redução na frequência cardíaca chegando a valores similares aqueles encontrados nos animais normotensos. Além disso, este estudo também mostrou que, em animais hipertensos e idosos, o exercício foi capaz de exercer benefícios relacionados ao remodelamento arterial, hipertrofia cardíaca e conteúdo de colágeno no miocárdio. Os autores discutiram que estas modificações poderiam ser consequência da redução da frequência cardíaca observada nos SHR treinados.

Assim, o exercício físico parece ser uma boa alternativa não farmacológica, que pode melhorar a qualidade de vida de indivíduos idosos, hipertensos ou não.

2 HIPÓTESE

Sendo assim nossa hipótese foi de que o exercício físico, em animais em envelhecimento e hipertensos, fosse capaz de melhorar as disfunções do SNA com consequente melhora da sensibilidade do barorreflexo, equilíbrio simpato-vagal, dos parâmetros hemodinâmicos e do número de neurônios dos núcleos centrais responsáveis pelo controle cardiovascular.

3 OBJETIVOS

Foram objetivos específicos deste trabalho analisar e comparar em animais hipertensos e normotensos em envelhecimento, os efeitos temporais desencadeados pelo treinamento ou sedentarismo no:

a) Peso corporal dos animais
b) Desempenho em esteira (testes de esforço máximo)
c) Avaliação dos componentes hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca)
d) Avaliação da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca;
e) Avaliação da função barorreflexa;
f) Avaliação dos neurônios positivos para ChAT e TH no NA, DMV e região C1 do RVLM

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) com idade entre 12-14 meses, pertencentes às linhagens Wistar-Kyoto (WKY, normotensos, n=45) e Spontaneously Hypertensive Rat (SHR, ratos espontaneamente hipertensos, n=45). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP em gaiolas coletivas sob condições favoráveis de temperatura (22±1 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração (Nuvilab®). Os protocolos apresentados neste projeto foram submetidos à Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP (n^0 115 nas fls. 11 do livro 03).

4.2 Protocolos de Treinamento Físico e Sedentarismo

O protocolo de treinamento foi realizado em esteira ergométrica (Millenium) adaptada para ratos (ver figura 1). No início dos experimentos (quando completaram 12 meses de idade) os ratos passaram por uma adaptação, durante 1 mês (adaptação ao espaço e à corrida na esteira; 8 sessões no total, 2 vezes/semana 10 minutos, a 0,4-0,7 Km/h, 0% de inclinação).

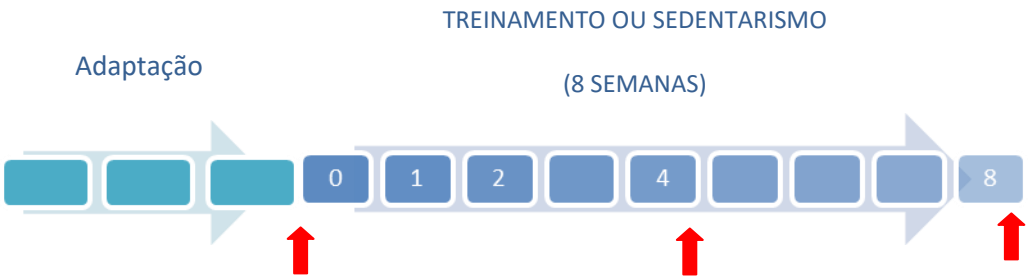
No final deste período, os animais inaptos para corrida foram excluídos do estudo e os aptos foram submetidos ao teste máximo de esforço em esteira e, posteriormente, aos protocolos. O teste de esforço máximo foi mensurado de forma indireta e individual, considerando-se o desempenho físico de cada rato (inicio a 0,3 Km/h, acréscimos de 0,3 Km/h a cada 3 minutos) até a exaustão.

O teste de esforço máximo foi realizado em 3 momentos durante os protocolos experimentais (semanas 0, 4 e 8). O protocolo de T adotado foi o aeróbio de intensidade baixa a moderada (50–60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço) realizado durante 1 hora/dia, 5 dias/semana, por 8 semanas (Fig 2), conforme descrito anteriormente (Ceroni et al., 2009; Cavalleri et al., 2011). Os

grupos S foram mantidos sedentários por período equivalente de tempo e colocados 1 vez por semana na esteira (0,4-0,7 km/h, 5-10 minutos).

Figura 8: Foto dos animais em treinamento de corrida na esteira.

Figura 9: Desenho experimental para os protocolos de treinamento físico e sedentarismo. A seta vermelha representa o período de teste máximo de esforço dos animais.



4.3 Registro dos parâmetros cardiovasculares

Um dia antes dos registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 10%, 100 mg/Kg e cloridrato de xylasina 2%, 20 mg/Kg, i.p.) para o isolamento da artéria e veia femoral e introdução de cateteres para registro da PA e infusão sistêmica de fármacos, respectivamente. O cateter arterial foi conectado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab System, ADInstruments) e PA e FC foram registrados (LabChart, ADIntruments e frequência de amostragem de 2000 Hz nos animais em livre movimentação por 30-40 minutos (valores basais) até completa ambientação do animal. Os vasos arteriais dos animais treinados foram cateterizados 1-2 horas após a última sessão de exercício de forma que os parâmetros hemodinâmicos pudessem ser avaliados sempre ao mesmo tempo, ou seja, 25-26 horas após a última sessão de treinamento.

4.4 Teste da sensibilidade dos barorreflexo

No dia da execução do protocolo experimental para avaliar a sensibilidade do barorreflexo foi a PA e FC foram registradas com o animal não-anestesiado e em repouso, o qual denominamos período basal (30 minutos), Logo após foram administradas doses crescentes em bolus de fenilefrina (agonista dos receptores alfa-1 adrenérgicos) e nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico, (volume 0,1 mL, i.v.), para a determinação da atividade barorreflexa, conforme tabela a seguir:

Tabela 1: Doses de fenilefrina (F1 a F9) e de nitroprussiato de sódio (N1 a N9) utilizadas para injeção intravenosa e ativação do barorreflexo.

Dose	Concentração (µg/Kg)	Dose	Concentração (µg/Kg)
F1	0,1	N1	0,2
F2	0,2	N2	0,4
F3	0,4	N3	0,8
F4	0,8	N4	1,6
F5	1,6	N5	3,2
F6	3,2	N6	6,4
F7	6,4	N7	12,8
F8	12,8	N8	25,6
F9	25,6	N9	51,2

Entre as diferentes doses foram aguardados tempo suficiente para o retorno da PA e FC a seus valores basais. Para cada dose de fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram coletados os valores antes e após a administração das drogas de FC e PAM grupo. No software graphpad prism 6.0 foram geradas as barocurvas individuais (de cada rato), plotadas com eixo X, como variável independente para pressão arterial média (PAM, mmHg) e no eixo Y, como variável dependente, para a Frequência Cardíaca (FC, bpm). Os valores de platô inferior, *range*, curvatura e BP50 foram calculados pelo software graphpad prism 6.0. O ganho foi calculado pela fórmula:

GANHO DO BARORREFLEXO: (-range x curvatura)/n

As médias destes valores foram calculadas, e foram utilizadas para construir a barocurva de cada grupo.

4.5 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso

Para realizar as análises da variabilidade da PAS e IP foram selecionados trechos de 5 minutos de registro estável da pressão arterial e frequência cardíaca diretamente do programa LabChart. Os valores provenientes da análise do registro

foram lidos no programa computacional denominado de Cardioseries (v. 2.4 Brasil – http://sites.google.com/site/cardioseries) desenvolvido por Daniel Penteado Martins Dias. O índice de atividade simpática e parassimpática foram obtidos por análise da variabilidade da PAS e IP por meio da uma análise espectral dos registros. O Cardioseries é capaz de detectar os pontos de inflexão em sinais periódicos gerando séries temporais da PA sistólica, batimento a batimento. As séries temporais de intervalo de pulso (IP) também foram calculadas, pelos intervalos entre consecutivos valores de pressão sistólica. Para cada registro foram calculados índices de variabilidade da PA e IP no domínio do tempo.

A variabilidade da PAS foi quantificada por meio do desvio padrão de valores sucessivos de PA (SDNN). A variabilidade do IP foi quantificada pelo SDNN e pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD). A variabilidade da PA e IP também foram avaliadas no domínio da frequência, por meio da análise espectral.

As séries temporais da PAS sistólica e IP foram interpoladas em 20 Hz e divididas em segmentos contínuos de 512 batimentos, sobrepostos em 50%. Cada segmento foi submetido a um “janelamento” do tipo *Hanning* e a análise espectral foi realizada pela transformada rápida de Fourier (FFT). Os componentes oscilatórios encontrados foram quantificados em faixas de baixa (LF: 0,15 a 1,5 Hz) e alta frequência (HF: 1,5 a 5,0 Hz) em valores absolutos e índices normalizados LFnu = LF / (LF + HF), HFnu = HF / (LF + HF) e LF/ HF .

4.6 Procedimentos de imunohistoquímica

Ao término dos experimentos de monitoramentos dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com soro fisiológico (NaCl 145 mM), seguido de paraformaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 2 horas a 4 °C e transferidos para uma solução desidratante por 8 horas (sacarose 20%). Os encéfalos foram cortados em criostato numa espessura de 30 µm e guardados em solução anti-congelante (crioprotetora: 20% de glicerol, 30% de etilenoglicol em 50 mM de fosfato, pH 7,4) que preserva as qualidades do tecido encefálico para posterior análise.

Para o protocolo de imunomarcação da colina acetiltransferase (ChAT) anticorpo primário *goat anti-Chat* (1:2000; Millipore) foi utilizado, seguido do anticorpo secundário donkey *anti-Goat* (1:800; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA), Para amplificação da reação, foi utilizado Kit ABC (Vector, Burlingame, CA, USA) e a subsequente coloração com 3-3-di-aminobenzidina (DAB).

Para os experimentos de imunomarcação dos neurônios noradrenérgicos, foi utilizado o anticorpo primário *mouse anti-TH* (1:1000; Millipore), seguido do anticorpo segundário *donkey anti-mouse* (1:500; Jackson).

Finalmente, os cortes encefálicos foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas e analisados em microscópio. A análise e nomenclatura neuroanatômica foi feita de acordo com os atlas de Paxinos e Watson (1998).

Para contagem de neurônios do DMV foram utilizados os bregmas entre -13.56 à -13.92, e para NA e C1 os bregmas entre -11.88 à -12.36. A fotos dos cortes histológicos foram tiradas no programa NIS-Elements e a contagem dos neurônios foi feita no programa Image ProPlus.

Foi utilizado fator de correção na contagem de neurônios, de acordo com Abercrombie (1946), que foi calculado por meio da fórmula:

$$P = A \frac{M}{L + M}$$

Onde, P é o fator de correção, que foi aplicado para cada contagem, A corresponde ao número de neurônios contados, M corresponde à espessura dos cortes e L corresponde ao tamanho do neurônio.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de peso corporal, desempenho em esteira, parâmetros relacionados à sensibilidade do barorrefexo, hemodinâmica e análise espectral, foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0 e apresentados como média±EPM. Foi utilizada a ANOVA de 2 vias, seguida de *post hoc* de Tukey.

A análise da contagem dos neurônios foi realizada também utilizando o software GraphPad Prism 6.0 e apresentados como média±EPM. Foi utilizado test *t* não pareado. O nível de significância foi fixado em $p<0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Análise do peso corporal

Na figura 10 estão representados os valores de peso corporal dos animais normotensos (WKY) e podemos observar que não houve diferença estatística no peso dos animais WKY treinados nas semanas 2 (T2: 363±7 g) e 8 (T8: 369±7,3 g), quando comparados com seus respectivos controles sedentários (S2: 361±6,7 g e S8: 347±8,3 g).

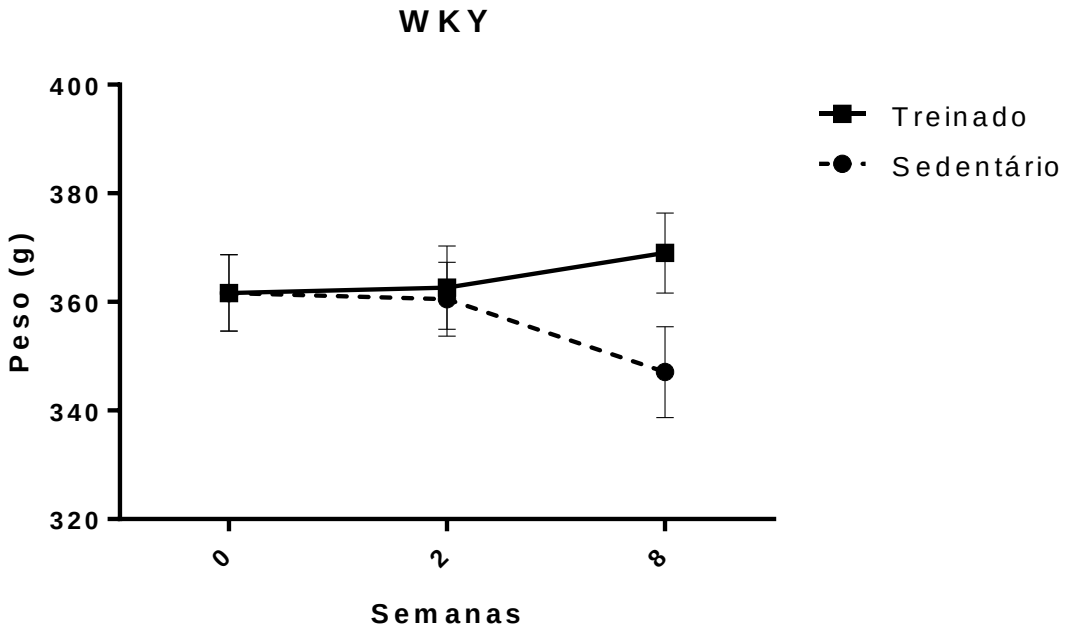


Figura 10: Valores do peso corporal em gramas (g) dos grupos de WKY treinados (T2=14 e T8=11) e sedentários (S0=12, S2=14 e S8=15) avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento.

Na figura 11 estão apresentados os valores de peso corporal dos animais SHR e podemos observar que não houve diferença no peso dos SHR treinados nas semanas 2 (T2: 360±7,3 g) e 8 (T8: 351±6,3 g), quando comparados com seus respectivos controles sedentários (S2: 352±8,3 g e S8: 347±8,3 g).

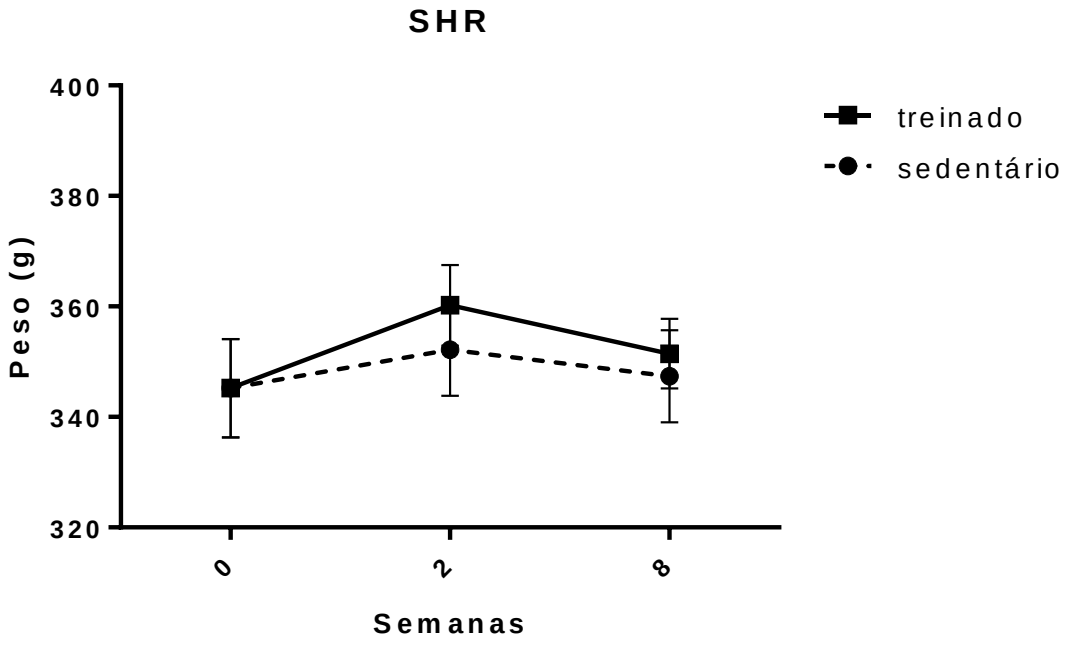


Figura 11: Valores do peso corporal em gramas (g) dos grupos de SHR treinados (T2=14 e T8=11) e sedentários (S0=14, S2=14 e S8=14) avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento.

6.2 Desempenho na esteira

O desempenho dos animais WKY (Figura 12) treinados (T4: 0,96±0,04 km/h e T8: 1,0±0,05 km/h) foi maior do que o desempenho dos animais sedentários (S0: 0,71±0,06 km/h, S4: 0,46±0,09 km/h e S8: 0,32±0,02 km/h).

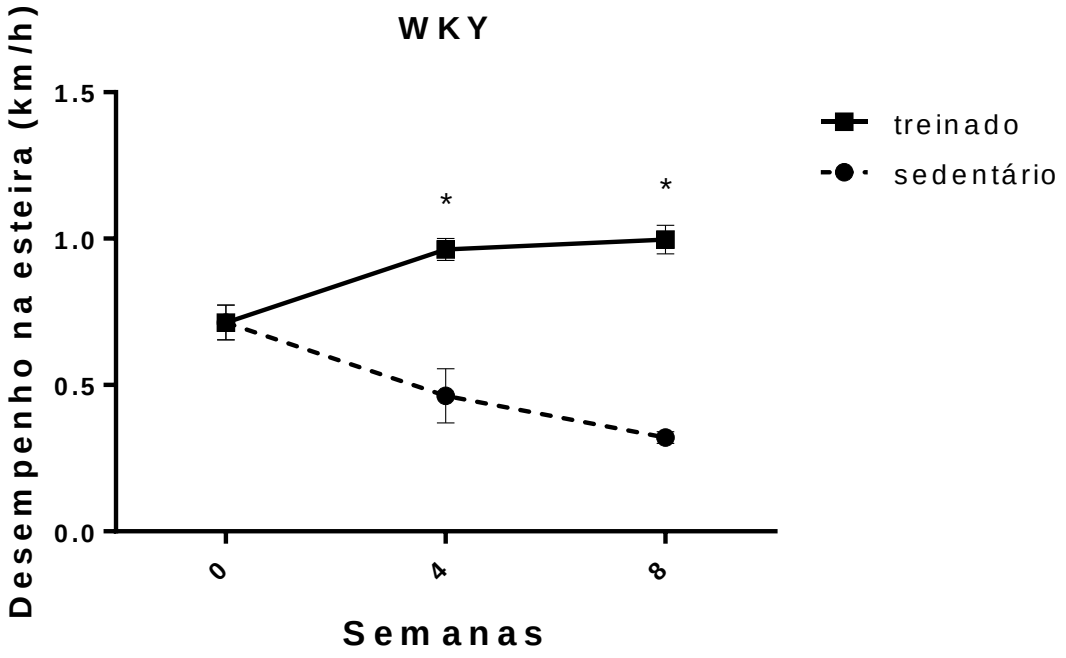


Figura 12: Valores da velocidade (km/h) representativos do desempenho na esteira do grupo WKY treinado (T4=36 E T8=27) e sedentário (S0=108, S4=24 e S8=24). * p<0,05 quando comparado com os grupos sedentários (S0, S4 e S8)

O desempenho dos animais SHR (Figura 13) treinados (T4: 01,25±0,04 km/h e T8: 1,4±0,1 km/h) foi maior do que o desempenho dos animais sedentários (S0: 0,9±0,1 km/h, S4: 0,68±0,06 km/h e S8: 0,5±0,16 km/h).

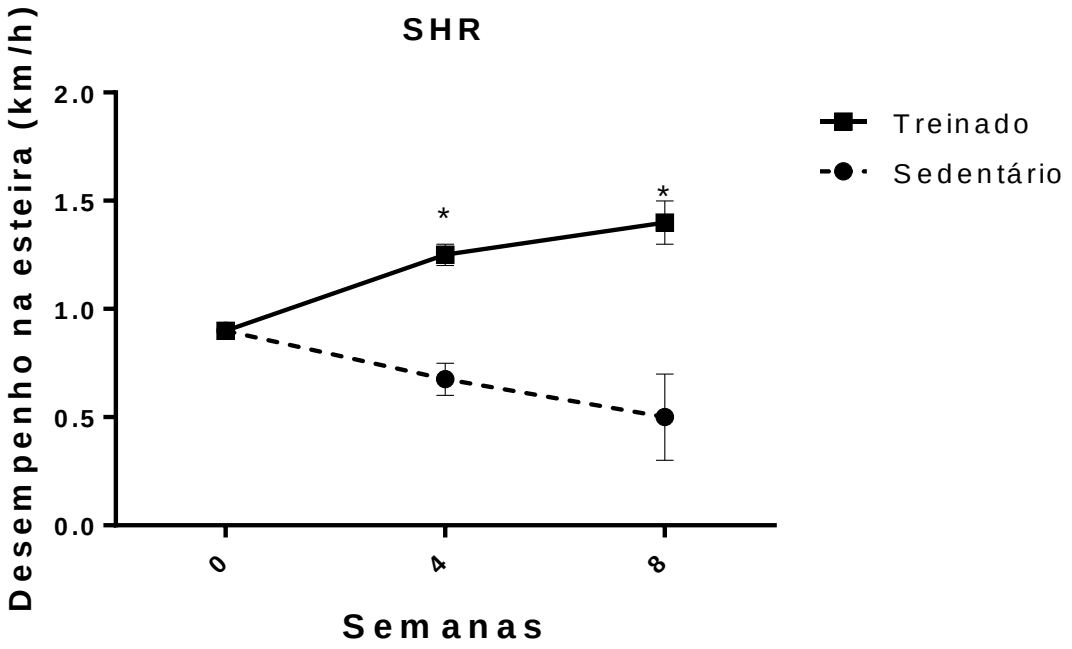


Figura 13: Valores das velocidade (km/h) representativos do desempenho na esteira do grupo hipertenso (SHR) treinado (T4=19 e T8=16) e sedentário (S0=193, S4=25 e S8=18). * p<0,05 quando comparado com os grupos sedentários (S0, S4 e S8)

6.3 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

A figura 14 representa a análise dos parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial sistólica, diastólica e média, e frequência cardíaca, dos animais WKY submetidos ou não ao treinamento físico. Como podemos observar (dados descritos na tabela 2), o exercício físico não foi capaz de provocar redução desses valores.

WKY

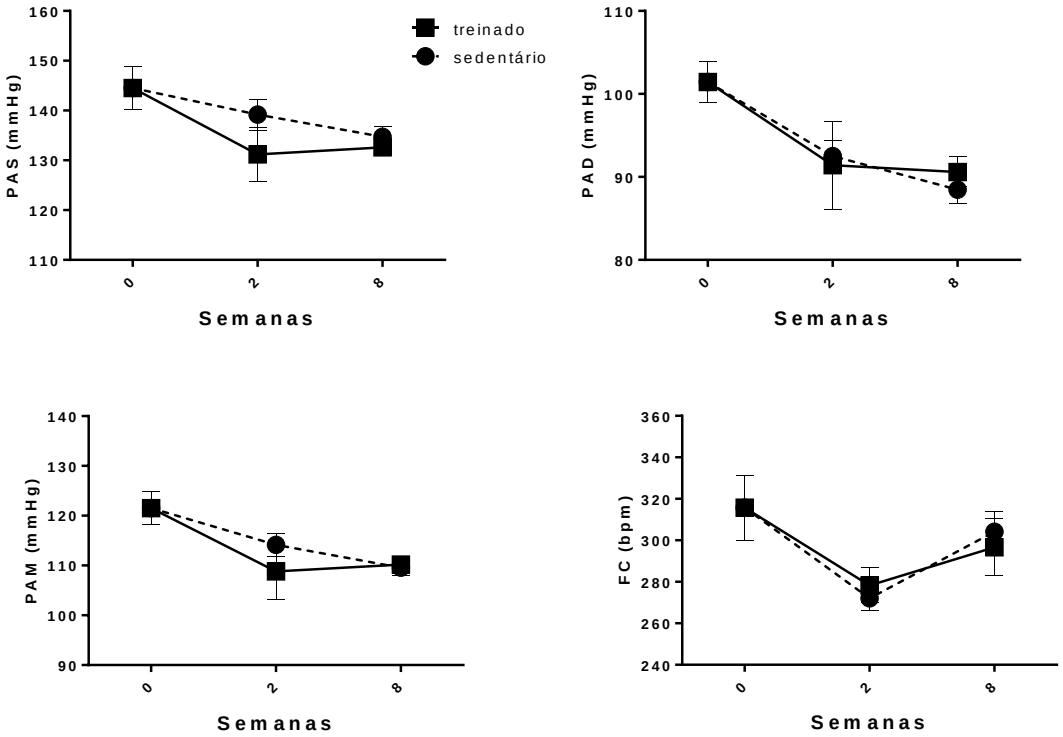


Figura 14: Efeitos do treinamento físico e sedentarismo nas variáveis cardiovasculares de animais WKY: Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais normotensos WKY treinados (T2=10 e T8=5) e sedentários (S0=8, S2=6 e S8=11), avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento. * p<0,05 versus S8.

Tabela 2: Valores referentes aos parâmetros hemodinâmicos dos animais WKY com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento e seus respectivos controles sedentários (S).

	S0	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
PAS (mmHg)	145±4,3	139±3,1	131±5,4	135±2,0	133±1,6
PAD (mmHg)	101±2,8*	93±1,9	91±5,3	88±1,7	91±1,8
PAM (mmHg)	122±3,3	114±2,4	109±5,5	110±1,6	110±1,3
FC (bpm)	316±15,6	272±5,8	278±8,4	304±9,7	296±13,7

*p<0,05 quando comparado ao grupo S8

A figura 15 representa a análise dos parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial sistólica, diastólica e média, e frequência cardíaca, dos animais SHR submetidos ou não ao treinamento físico. Como podemos observar (dados descritos na tabela 3), o exercício físico foi capaz de diminuir a PAS, PAD e PAM dos animais treinados (T2 e T8), quando comparados aos animais sedentários do grupo S8.

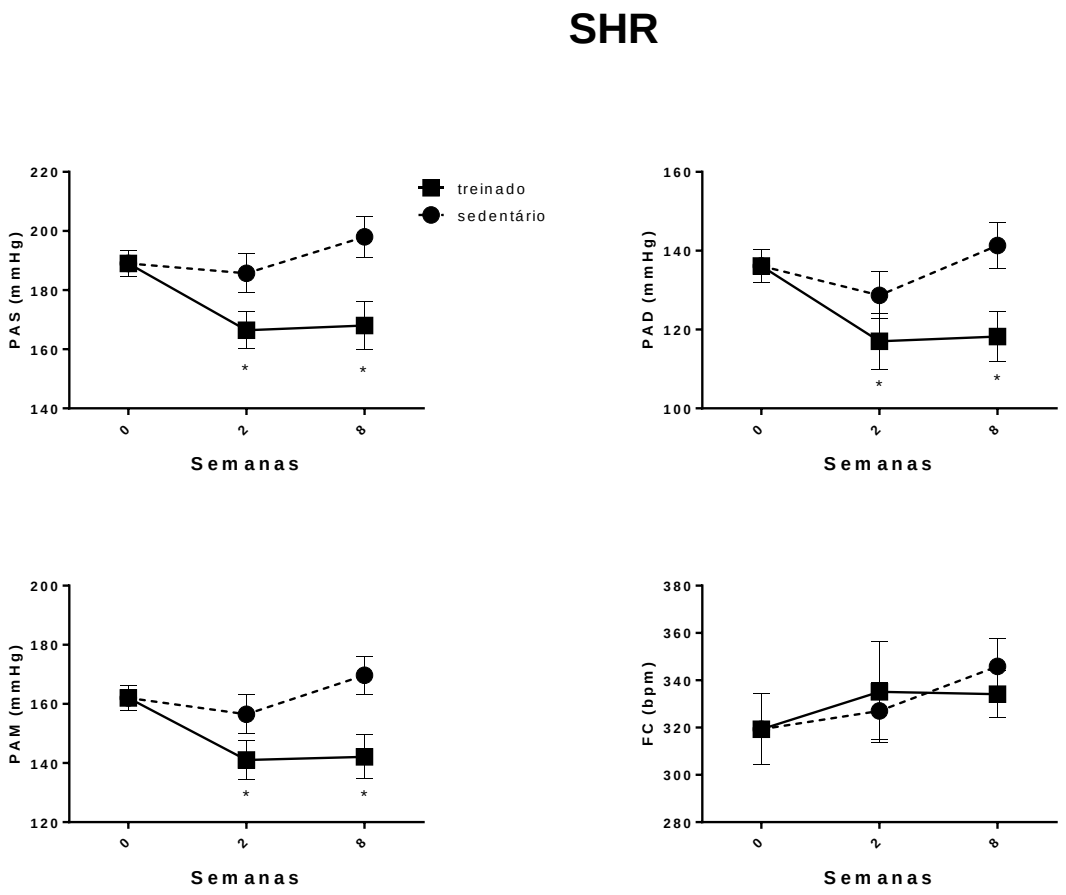


Figura 15: Efeitos do treinamento físico e sedentarismo nas variáveis cardiovasculares de animais SHR: pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais normotensos SHR treinados (T2=7 e T8=9) e sedentários (S0=8, S2=6 e S8=9), avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento. * p<0,05 versus grupo S8.

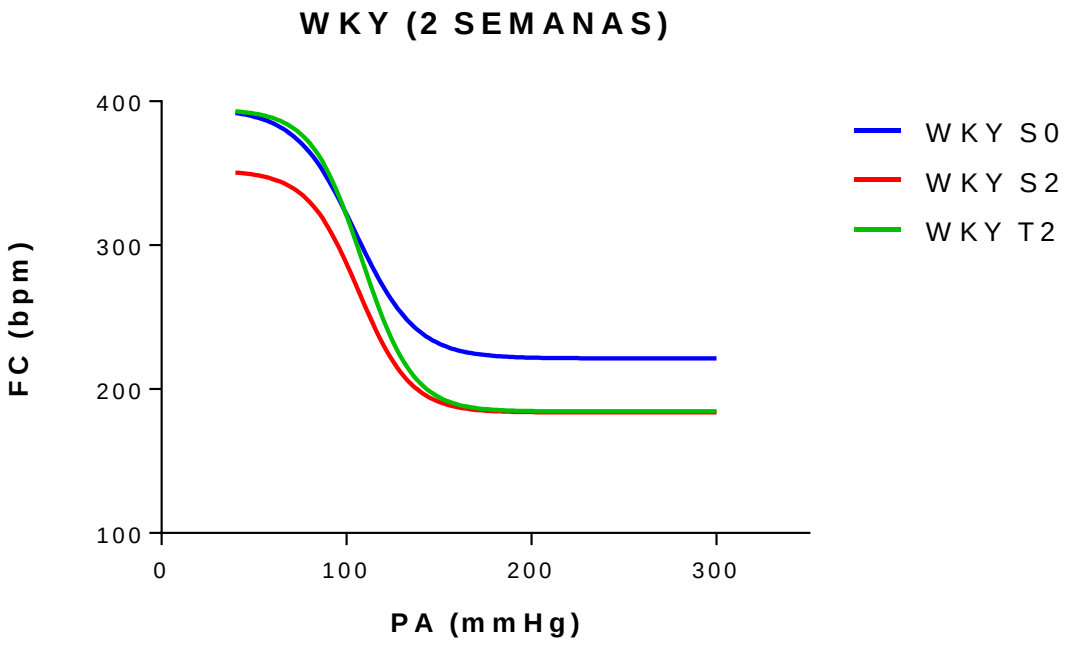
Tabela 3: Valores referentes aos parâmetros hemodinâmicos dos animais SHR com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento e seus respectivos controles sedentários (S0, S2 e S8).

	S0	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
PAS (mmHg)	189±4,4	186±6,6	166±6,3 *	198±6,9	168±8,2*
PAD (mmHg)	136±4,2	129±5,9	117±7,0 *	141±5,8	118±6,3 *
PAM (mmHg)	162±4,2	157±6,3	141±6,6 *	170±6,4	142±7,3 *
FC (bpm)	319±15,0	327±12,1	335±21,3	346±12,0	334±9,9

*p<0,05 quando comparado ao grupo S8

6.4 Análise da sensibilidade barorreflexa

A figura 16 representa análise do barorreflexo dos animais WKY sedentários e treinados submetidos a 2 e 8 semanas de treinamento aeróbico. Como podemos observar (dados descritos na tabela 4), o exercício físico não foi capaz de alterar esses parâmetros.



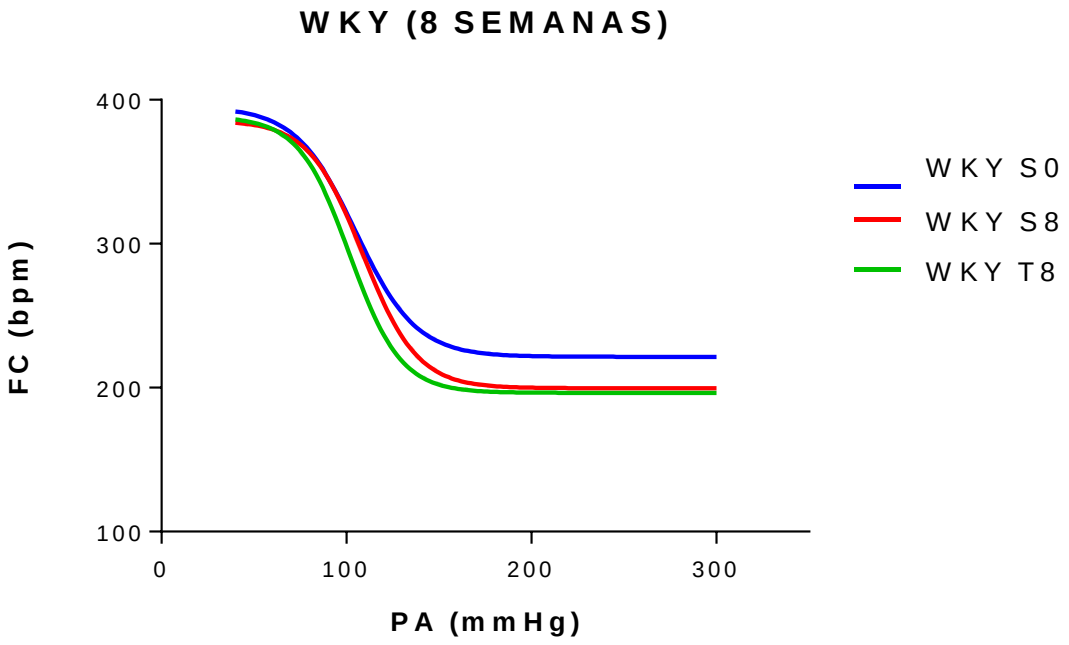
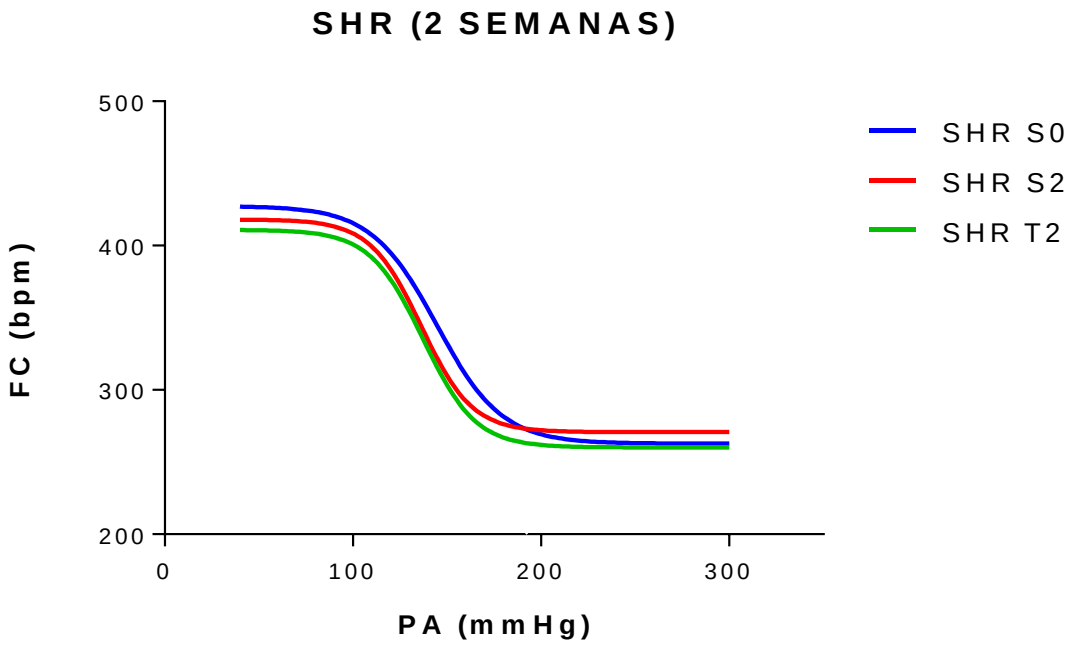


Figura 16: Curvas sigmoides da sensibilidade do barorreflexo dos animais WKY sedentários (S, S0 n=9, S2 n=8 e S8 n=6) e treinados (T, T2 n=9 e T8 n=7), avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento.

Tabela 4: Valores referentes às barocurvas dos animais WKY com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento e seus respectivos controles sedentários (S0, S2 e S8).

	WKY S0	**WKY S2**	**WKY T2**	**WKY S8**	**WKY T8**
Platô Inf. (batimentos min $^{-1}$)	221,5±11,8	183,8±15,2	184,5±10,5	199,7±23,4	196,4±9,9
Range (batimentos min $^{-1}$)	173,6±17,4	168,1±13	210±28,7	186,1±18,5	192±16,8
BP50 (mmHg)	105,1±5,1	106,6±5,4	108,5±5,5	108,9±4,71	101,8±3,9
Ganho (batimentos min $^{-1}$ mmHg)	2,61±0,29	2,86±0,17	3,2±0,62	2,96±0,46	3,41±0,31

A figura 17 representa análise do barorreflexo dos animais SHR sedentários e treinados durante 2 e 8 semanas. Como podemos observar (dados descritos na tabela 5), o exercício físico por 8 semanas foi capaz de aumentar o *range* e o ganho, sem alterar o platô inferior e o BP50.



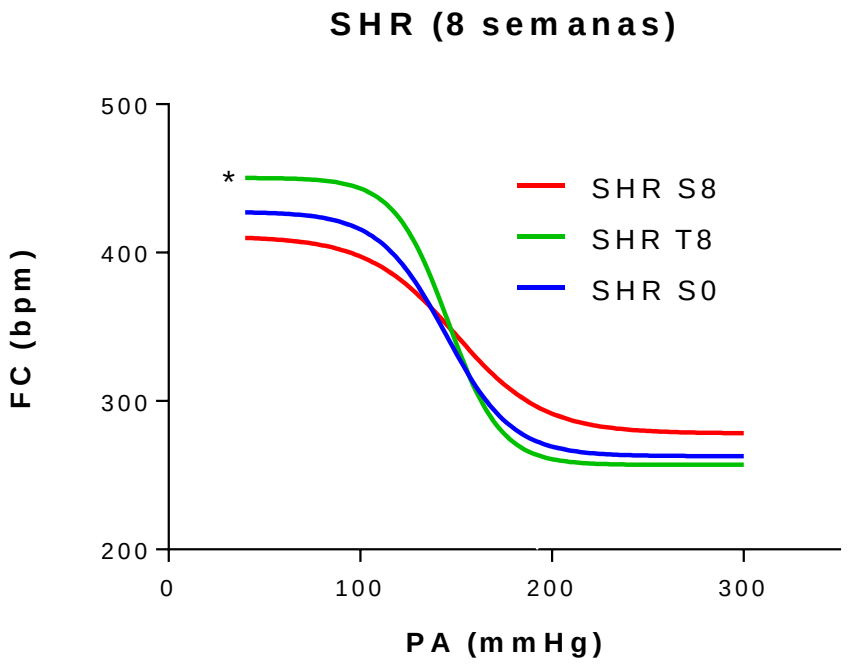


Figura 17: Curvas sigmoides da sensibilidade do barorreflexo dos animais SHR sedentários (S0 n=8, S2 n=6 e S8 n=8) e treinados (T2 n=7 e T8 n=8), avaliados em diferentes períodos (semanas) do protocolo de treinamento. * p<0,05 versus S8.

Tabela 5: Valores referentes às barocurvas dos animais SHR com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento comparados aos seus controles sedentários (S0, S2 e S8).

	SHR S0	**SHR S2**	**SHR T2**	**SHR S8**	**SHR T8**
Platô Inf. (batimentos min $^{-1}$)	262,8±60	270,7±8,8	260,1±13,1	278,2±7,2	257±8,8
Range (batimentos min $^{-1}$)	164,2±36	147,3±13	150,7±10,6	132,8±7	193,4±9,9 *
BP50 (mmHg)	144,1±7,9	136,1±5,8	137,1±8,1	149,7±4	145,6±9,01
Ganho (batimentos min $^{-1}$ mmHg)	2,2±0,36	2,68±0,41	2,58±0,38	1,47±0,21	2,9±0,62 *

*p<0,05 quando comparado ao grupo S8

6.5 Variabilidade da PA e FC de animais submetidos ao treinamento físico

A figura 18 representa os valores da análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) dos animais WKY submetidos ou não ao treinamento físico. Como podemos observar (valores descritos na tabela 6), houve diferença apenas na variância da PAS dos animais do grupo S0 quando comparados com os demais grupos.

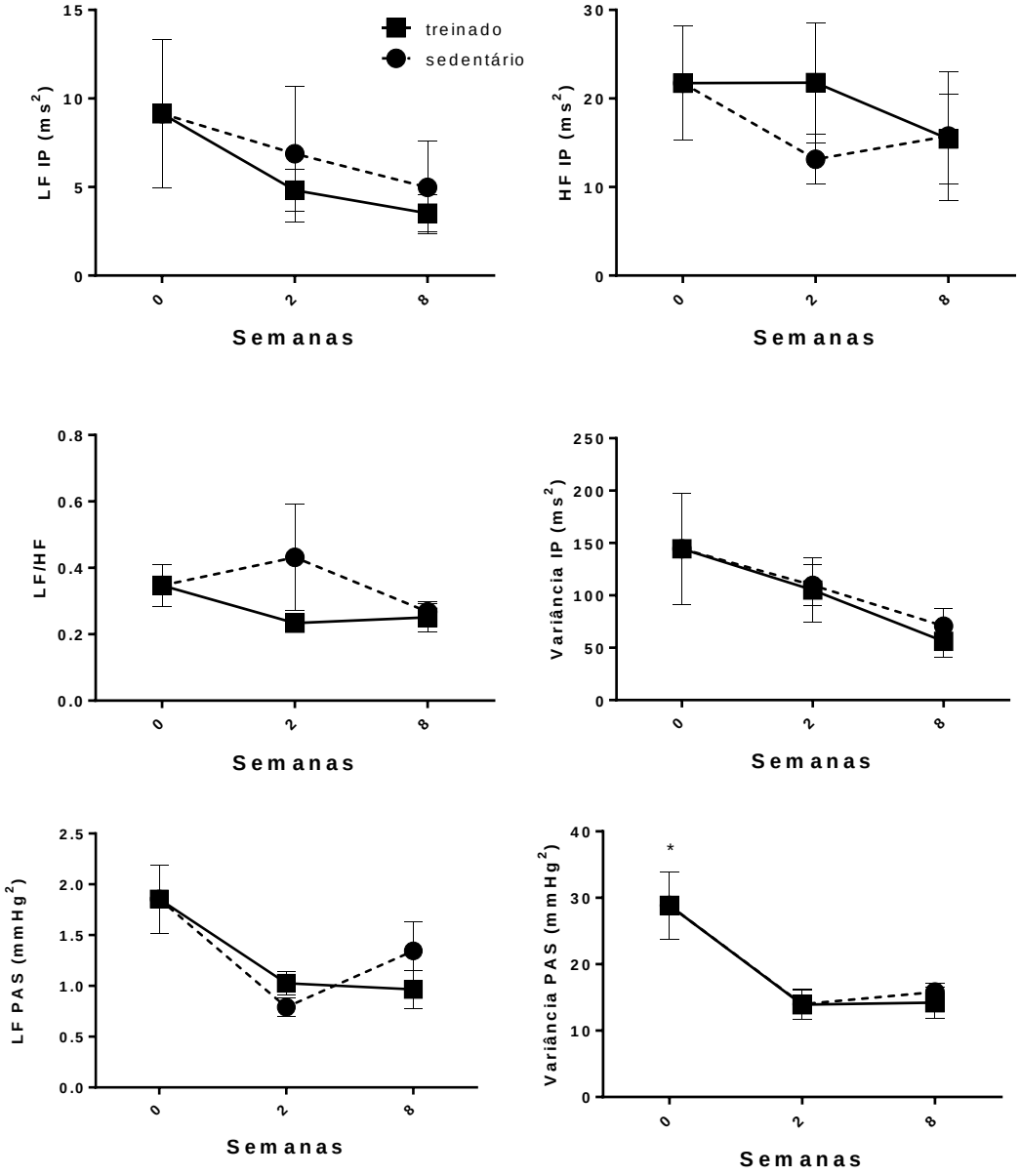


Figura 18: Análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) de WKY sedentários e treinados: Low frequency (LF), High frequency (HF), Razão LF/HF e Variância do Intervalo de pulso (IP), e Low frequency (LF) e Variância da pressão arterial sistólica (PAS), dos animais sedentários (S0=7, S2=7 e S8=10) e treinados (T2=6 e T8=9). * p<0,05 versus S2, S8, T2 e T8.

Tabela 6: Valores referentes aos parâmetros da análise variabilidade do IP e PAS dos animais WKY com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento comparados aos controles sedentários (S0, S2 e S8).

IP	**S0**	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
LF abs. (ms^2)	9,15±4,2	6,88±3,83	4,82±1,09	4,98±2,63	3,51±1,06
HF abs. (ms^2)	21,73±16,48	13,15±2,82	21,79±6,18	15,78±7,27	15,43±5,08
Razão LF/HF	0,35±0,06	0,43±0,16	0,23±0,02	0,27±0,0,02	0,25±0,05
Variância (ms^2)	144,57±53,24	109,67±19,61	114,57±31,19	70,76±16,4	56,17±14,86
PAS	**S0**	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
LF abs. ($mmHg^2$)	1,86±0,34	0,79±0,1	1,03±0,1	1,35±0,29	0,97±0,19
Variância ($mmHg^2$)	28,86±5,08 *	13,99±2,33	13,91±2,05	15,8±1,35	14,2±2,33

*$p<0,05$ quando comparado aos grupos S2, S8, T2 e T8

A figura 19 representa os valores da análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) dos animais SHR submetidos ou não ao treinamento físico. Como podemos observar (valores descritos na tabela 7), o exercício físico, por 8 semanas, foi capaz de reduzir o componente de alta frequência (HF) dos animais treinados (T8), quando comparados aos animais sedentários dos grupos S0 e S8.

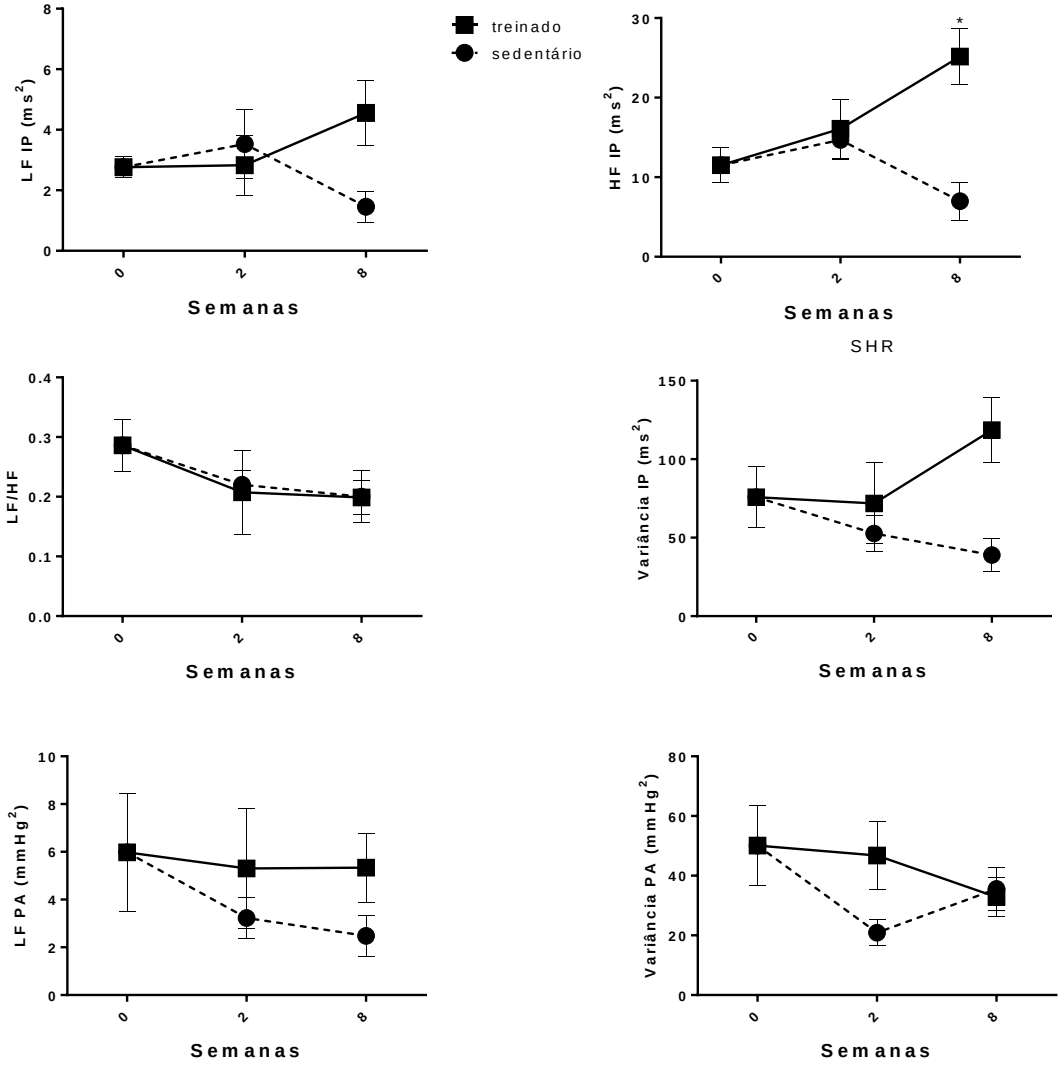


Figura 19: Análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) de SHR sedentários e treinados: Low frequency (LF), High frequency (HF), Razão LF/HF e Variância do Intervalo de pulso (IP), e Low frequency (LF) e Variância da pressão arterial sistólica (PAS), dos animais sedentários (S0=9, S2=6 e S8=8) e treinados (T2=6 e T8=10). * p<0,05 versus S0 e S8.

Tabela 7: Valores referentes aos parâmetros da análise da variabilidade do IP e da PAS dos animais SHR com duas (T2) e oito (T8) semanas de treinamento comparados aos seus controles sedentários (S0, S2 e S8).

IP	**S0**	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
LF abs. (ms^2)	2,7±0,3	3,5±1,5	2,8±0,8	1,4±0,6	4,4±1,0
HF abs. (ms^2)	11,5±2,2	14,7±6,5	16,0±3,0	7,0±2,8	25,1±3,4 *
Razão LF/HF	0,3±0,04	0,2±0,1	0,21±0,06	0,2±0,08	0,2±0,03
Variância (ms^2)	75,7±19,6	52,7±23,58	71,8±21,0	38,8±15,8	118±20,7
PAS	**S0**	**S2**	**T2**	**S8**	**T8**
LF abs. ($mmHg^2$)	5,9±2,4	3,2±0,1,4	5,3±2,0	2,4±1,0	5,3±1,4
Variância ($mmHg^2$)	50,0±12,5	20,9±9,3	46,7±9,2	35,5±14,5	32,8±6,6

*$p<0,05$ quando comparado aos grupos S0 e S8

6.6 Estudos de imunohistoquímica

A figura 20 representa os cortes histológicos contendo os núcleo bulbares de interesse (NA, C1 e DMV) dos animais WKY treinados (T8) e sedentários (S8). Os neurônios reativos ao ChAT foram avaliados no NA e DMV, e os reativos à TH foram avaliados na região C1 do RVLM.

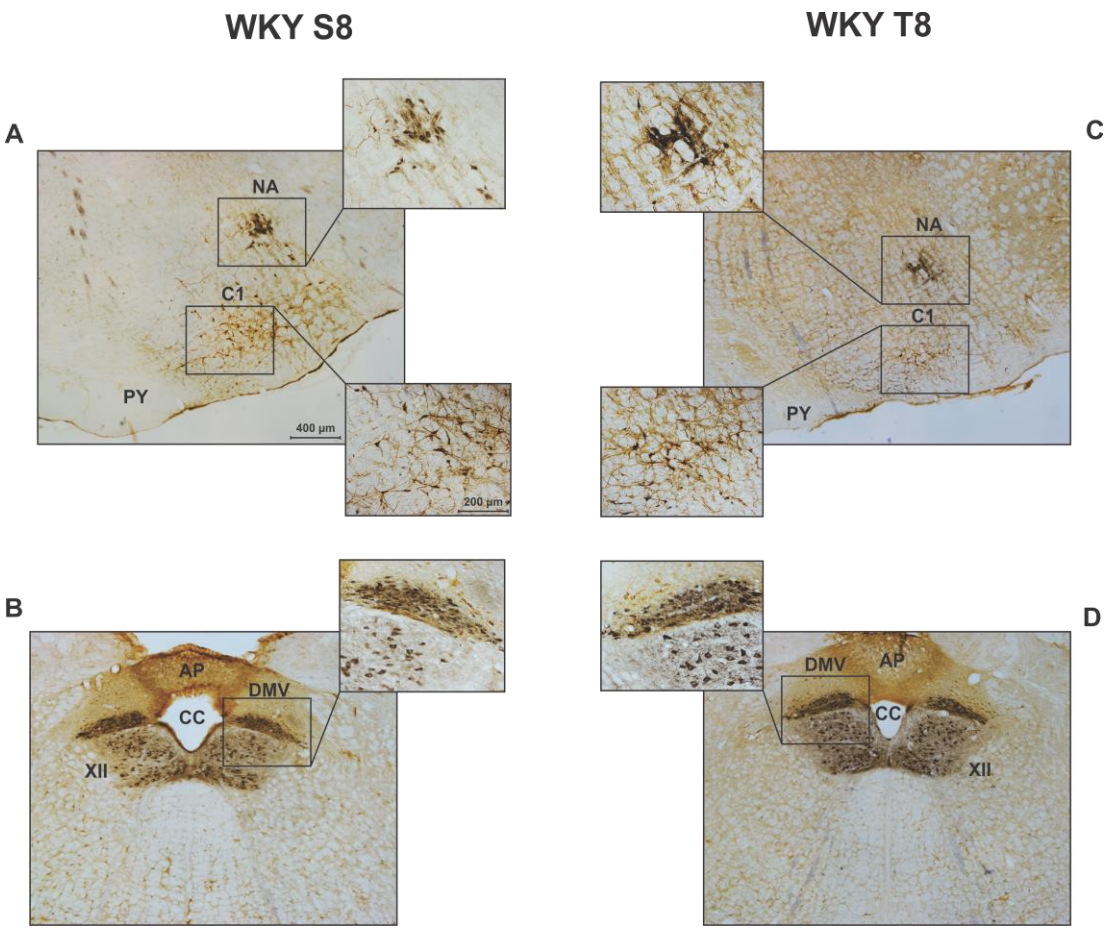


Figura 20: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos transversais do tronco-cerebral de WKY demonstrando o núcleo ambíguo (NA) e dorsal motor do vago (DMV) com neurônios marcados com ChAT (colina acetiltransferase), e a região C1 contendo neurônios marcados com TH (tirosina hidroxilase). **Painel A**: NA e C1 do grupo S8, **B**: DMV do grupo S8, **C**: NA e C1 do grupo T8 e **D**: DMV do grupo T8. AP: Área Postrema, CC: Canal Central e PY: Pirâmides.

A figura 21 é a representação gráfica do número de neurônios do DMV, NA e C1 avaliados nos grupos de animais WKY submetidos ou não ao treinamento físico por 8 semanas. Como podemos observar, o exercício físico não foi capaz de alterar o número de neurônios marcados com ChAT e TH em nenhum dos núcleos analisados.

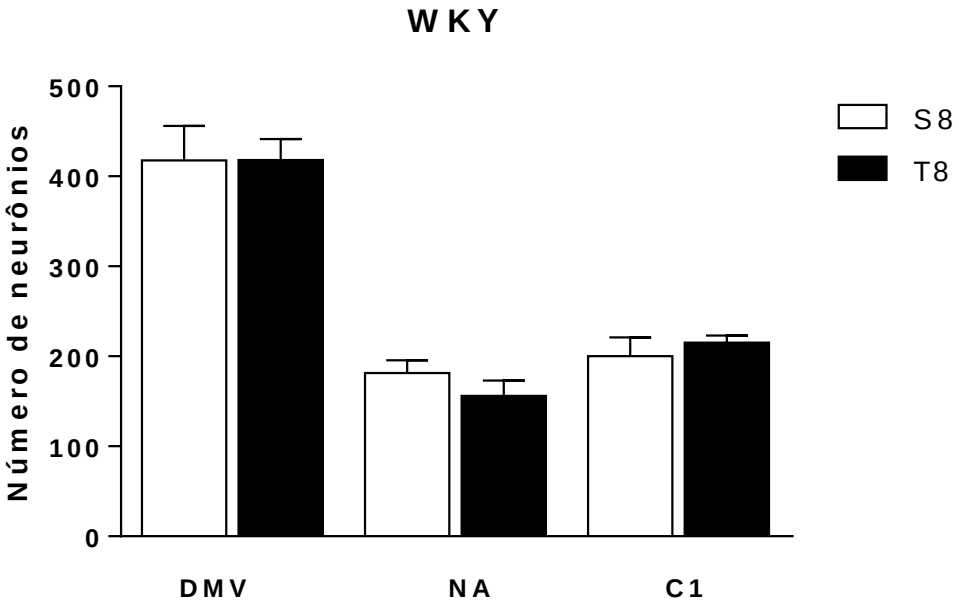


Figura 21: Número de neurônios do DMV, NA e C1 dos animais WKY sedentários (S8=4) e treinados (T8=3).

A figura 22 representa os cortes histológicos contendo dos núcleos bulbares de interesse (NA, C1 e DMV) dos animais SHR treinados e sedentários. Os neurônios reativos ao ChAT foram avaliados no NA e DMV, e os reativos à TH foram avaliados na região C1 do RVLM.

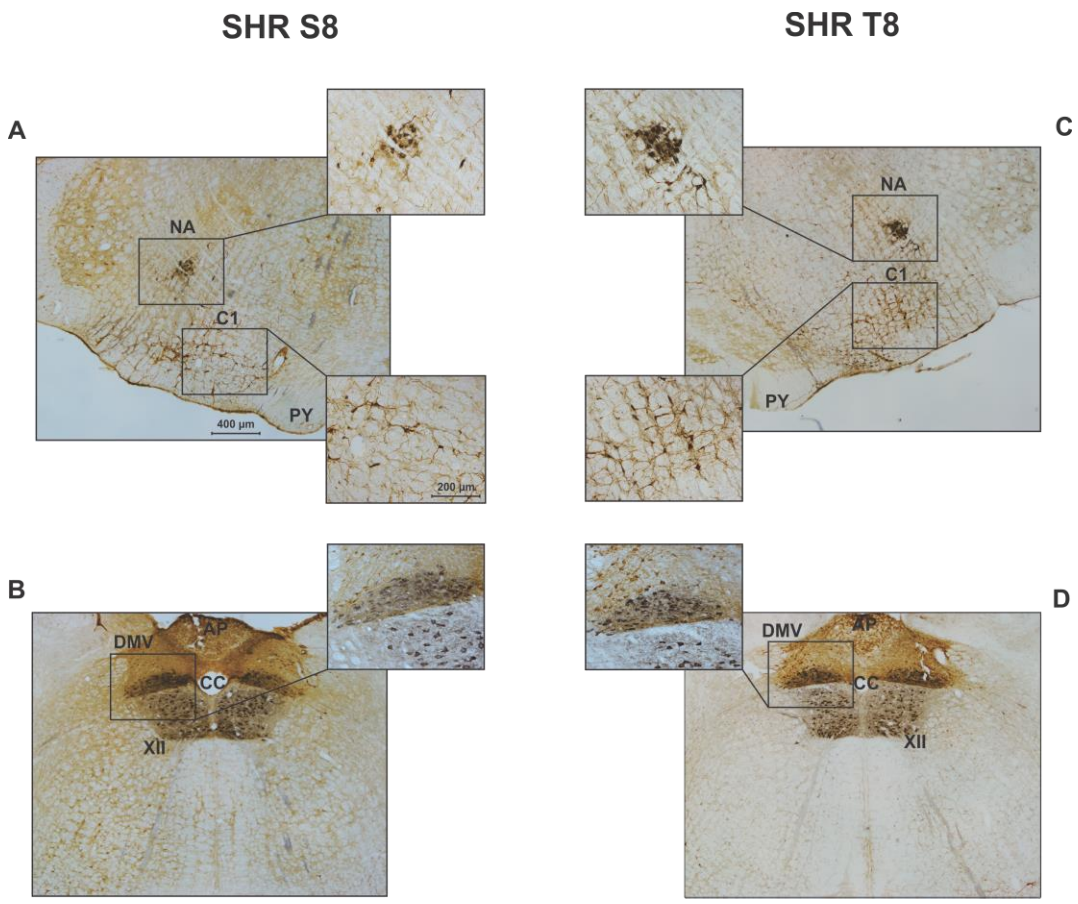


Figura 22: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos transversais do tronco-cerebral de SHR demonstrando o o núcleo ambíguo (NA) e dorsal motor do vago (DMV) com neurônios marcados com ChAT (colina acetiltransferase), e a região C1 contendo neurônios marcados com TH (tirosina hidroxilase). **Painel A**: NA e C1 do grupo S8, **B**: DMV do grupo S8, **C**: NA e C1 do grupo T8 e **D**: DMV do grupo T8. AP: Área Postrema, CC: Canal Central e PY: Pirâmides.

A figura 23 é a representação a gráfica do neurônios do DMV, NA e C1 dos animais WKY submetidos ou não ao treinamento físico por 8 semanas. Como podemos observar, o exercício não foi capaz de alterar o número de neurônios marcados com ChAT e TH em nenhum dos núcleos analisados.

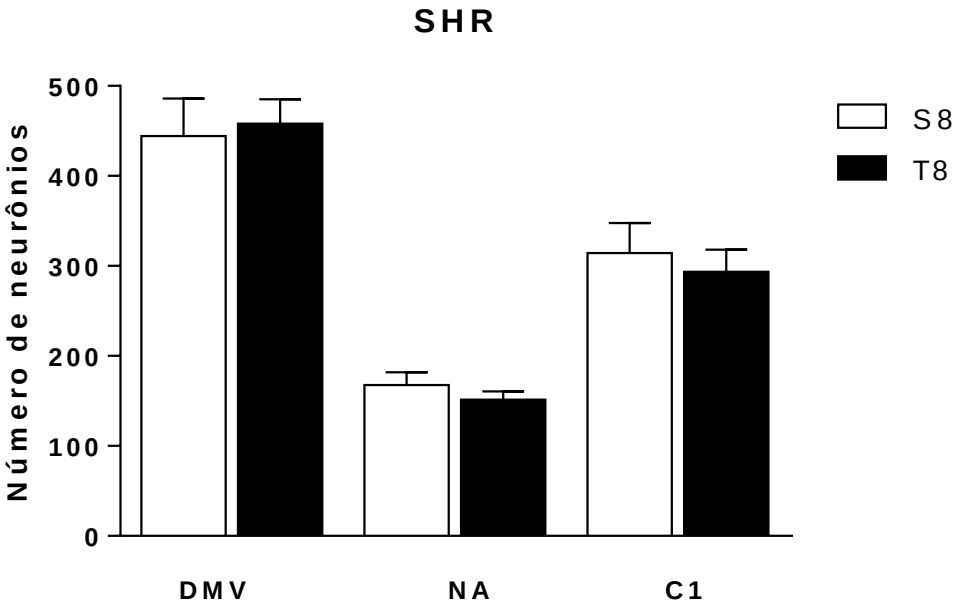


Figura 23: Número de neurônios contidos no DMV, NA e C1 dos animais SHR sedentários (S8=4) e treinados (T8=3).

A figura 24 representa a comparação no número de neurônios marcados para TH, contidos na região C1 do RVLM dos animais WKY e SHR submetidos ou não ao treinamento físico por 8 semanas. Como podemos observar, há um aumento na quantidade de neurônios marcados com TH na região C1 dos animais SHR (S8: 314±33,2 e T8: 293±24,2) quando comparados com os animais WKY (S8: 200±20,9 e T8: 215±8,2) independente do treinamento físico.

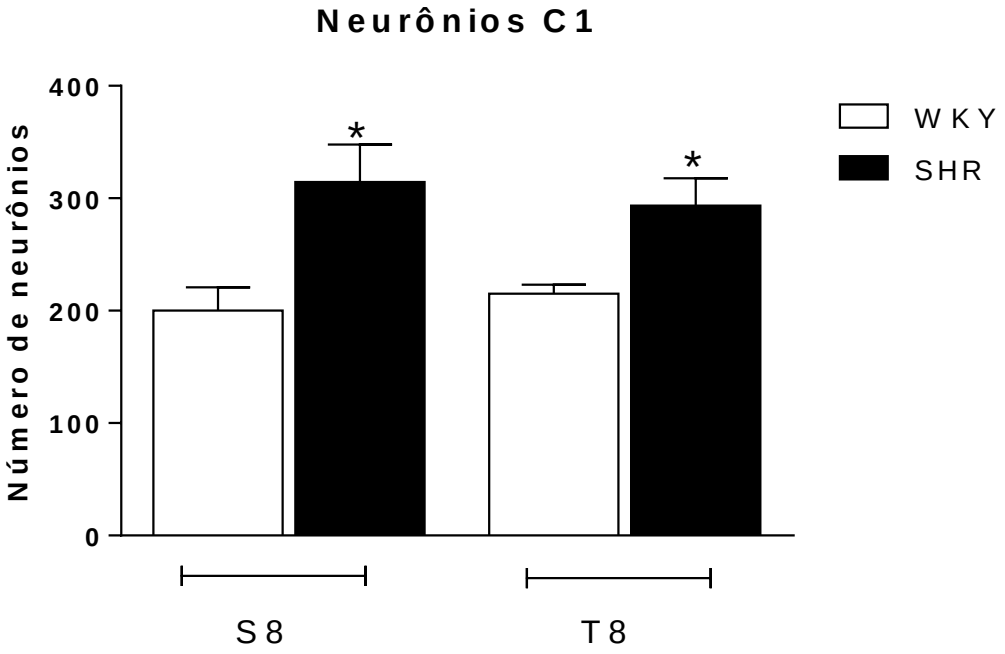


Figura 24: Número de neurônios TH^+ na região C1 dos animais WKY (S8=4 e T8=3) e SHR (S8=4 e T8=3). * p<0,05 versus grupo sedentário correspondente (WKY S8 e SHR S8)

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que os animais hipertensos (SHR) em envelhecimento submetidos ao treinamento físico aeróbio tiveram uma significativa melhora da performance na esteira sem alteração no peso corporal dos mesmos. Além disso, estes animais apresentaram uma redução da pressão arterial sistólica, diastólica e média. Observamos também uma melhora significativa da sensibilidade barorreflexa, um aumento da modulação parassimpática para o coração, identificado pelo aumento do componente HF do intervalo de pulso. Por fim, observamos que o treinamento físico de 8 semanas não promoveu alterações significativas no número de neurônios no DMV e NA positivos para ChAT e positivos para TH da região C1 de animais normotensos e hipertensos, apesar dos animais SHR terem maior número de neurônios TH na região C1 quando comparados aos WKY.

7.1 Desempenho em esteira e peso corporal em animais submetidos ao treinamento aeróbio.

A prática de atividade física promove vários ajustes hemodinâmicos que envolvem tanto alterações ao nível do sistema nervoso central (Krieger et al., 2001) bem como em mecanismos sistêmicos e periféricos (Rossoni et al., 2011). Coimbra et al. (2008) demonstraram que o treinamento físico de baixa intensidade em esteira foi capaz de aumentar a densidade de vênulas e capilares nos músculos locomotores, tanto em ratas SHR quanto em normotensas (WKY), fato correlacionado a melhora da capacidade física (desempenho na esteira) desses animais.

Corroborando com este trabalho, Melo et al. (2003) evidenciaram, por meio da técnica de análise histológica de músculos locomotores, que o treinamento em esteira de baixa intensidade por 13 semanas em ratos SHR e WKY foi capaz de promover modificações na microcirculação de músculos esqueléticos. Além disso, foi observado nas arteríolas dos animais hipertensos treinados uma espessura de parede semelhante àquela encontrada nas arteríolas de animais normotensos. O exercício também foi capaz de aumentar a densidade de vênulas de músculos

esqueléticos exercitados ou não. Dessa forma, estes autores sugeriram que todos esses ajustes que levaram a uma melhor perfusão da musculatura esquelética, contribuíram para um melhor desempenho dos animais treinados em relação aos animais sedentários. Deste modo, apesar de não termos avaliado estes parâmetros morfométricos musculares, podemos sugerir que o melhor desempenho dos animais treinados nesse estudo, mesmo com a idade mais avançada, deva-se a melhora também destes parâmetros.

Alterações metabólicas também são consequências da atividade física crônica (Mazzeo e Horvath, 1986). Estudos de Mazzeo e Horvath (1986), realizado com ratas em envelhecimento, avaliou os efeitos do exercício físico de baixa intensidade no metabolismo desses animais e não foi observada diferença significativa no peso corporal das ratas treinadas quando comparadas com as sedentárias. No entanto, estes autores observaram que, nas ratas treinadas, houve um aumento significativo de massa magra quando comparado com o controle sedentário. Além disso, o percentual de gordura corporal foi significativamente maior nos animas sedentários. Dessa forma, animais treinados e sedentários, com o mesmo peso corporal, parecem ter percentuais de massa magra e massa gorda diferentes, favorecendo uma queda no percentual de gordura e um aumento no percentual de massa magra, resultando em não alteração do peso corporal. Neste sentido, podemos especular que a ausência na diferença de peso dos animais treinados, do presente trabalho, possa ser justificada por essa afirmativa.

7.2 Benefícios cardiovasculares em animais hipertensos submetidos ao treinamento aeróbio

A regulação da pressão arterial é extremamente refinada e complexa, pois envolve uma série de mecanismos centrais e periféricos. Os principais elementos que regulam essa grandeza são:

- Fatores locais: miogênicos, metabólicos, parácrinos, autócrinos, endoteliais e temperatura.
- Neurais: macanorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares e termorreceptores.

- Hormonais: catecolaminas, sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina e ocitocina (Margarida, 2008)

Destes, avaliamos as modulações que o SNA exerce sobre o sistema cardiovascular, utilizando para isso instrumento matemático muito útil para este fim que é a análise espectral, e também a sensibilidade da função barorreflexa.

Inúmeros estudos podem ser encontrados na literatura mostrando os efeitos benéficos do exercício físico em relação aos fatores hemodinâmicos (Ceroni et al., 2009; Cavalleri et al., 2011). Um trabalho realizado com ratos SHR, os quais foram submetidos ao treinamento físico em esteira por 18 semanas, mostrou uma queda de pressão arterial média, sistólica e diastólica, e da frequência cardíaca, quando comparados aos animais do grupo sedentário (Véras-Silva et al., 1997). Felix e Michelini (2007) também mostraram que o exercício físico em esteira por 12 semanas reduziu a PAM e FC nos ratos SHR, mas não nos WKY. Além disso, eles descrevem que há uma superexpressão de angiotensinogênio no NTS comissural dos ratos SHR, que também foi reduzida com o exercício.

Dessa forma, nosso questionamento foi: O exercício físico seria capaz de reduzir a pressão arterial e frequência cardíaca em um modelo de hipertensão crônica (envelhecimento)? Nossa resposta foi parcialmente positiva, uma vez que observamos em nosso modelo experimental queda da pressão arterial sistólica, diastólica e média, sem alterações na frequência cardíaca. Quais seriam então os mecanismos de modulação responsáveis por essa queda? Tentamos especular, baseado em nossos resultados, que o tônus simpático para os vasos poderia ter diminuído, mas infelizmente nossos experimentos realizados com prazosin não deram certo, uma vez que todos os animais do grupo sedentário morreram, nos restando apenas os registros dos animais treinados, ou seja, sem um controle efetivo para comparações e análise estatística.

Sabemos que mecanismos periféricos sofrem modulações com o exercício físico. Estudo de Rossoni et al. (2011), por exemplo, evidenciaram que o exercício físico em ratos em envelhecimento (21 meses de idade) e treinados por 13 semanas foi capaz de diminuir a razão parede/luz das arteríolas do miocárdio. Esses resultados foram acompanhados de uma queda da pressão diastólica, sistólica e da

frequência cardíaca. Outro dado interessante que pode ser encontrado na literatura mostra que o treinamento físico em animais SHR por 13 semanas foi capaz de reduzir a razão parede/luz das arteríolas de músculos treinados ou não, e, além disso, foi capaz de aumentar a densidade de capilares (microcirculação) nos músculos treinados (Melo et al., 2003). Coimbra et al. (2008) mostraram que o exercício físico reduziu a resistência ao fluxo nas patas traseiras de SHR treinados em esteira por 13 semanas. Também observou-se neste estudo aumento da rede de capilares dos músculos locomotores. Dessa forma, o exercício físico mostra-se capaz de aumentar o lúmen das arteríolas e diminuir a espessura de suas paredes, possivelmente devido à redução do remodelamento vascular, e aumento da quantidade da rede capilar.

Fatores de relaxamento também são influenciados pela atividade física, podendo ter sua biodisponibilidade aumentada (Roque et al., 2013). Roque et al. (2013) mostraram que o treinamento físico em esteira por 12 semanas foi capaz de reduzir o percentual de contração em resposta à U46619 (vasoconstrictor, agonista de receptor de tromboxano A2) em artéria mesentérica, além disso, a biodisponibilidade de NO observada nessas artérias estava aumentada. O relaxamento encontrado nas artérias/arteríolas devido à prática de atividade física deve-se não somente ao aumento da biodisponibilidade de fatores relaxantes, mas pode também estar relacionado ao decréscimo de fatores contráteis (Silva Jr. et al., 2015).

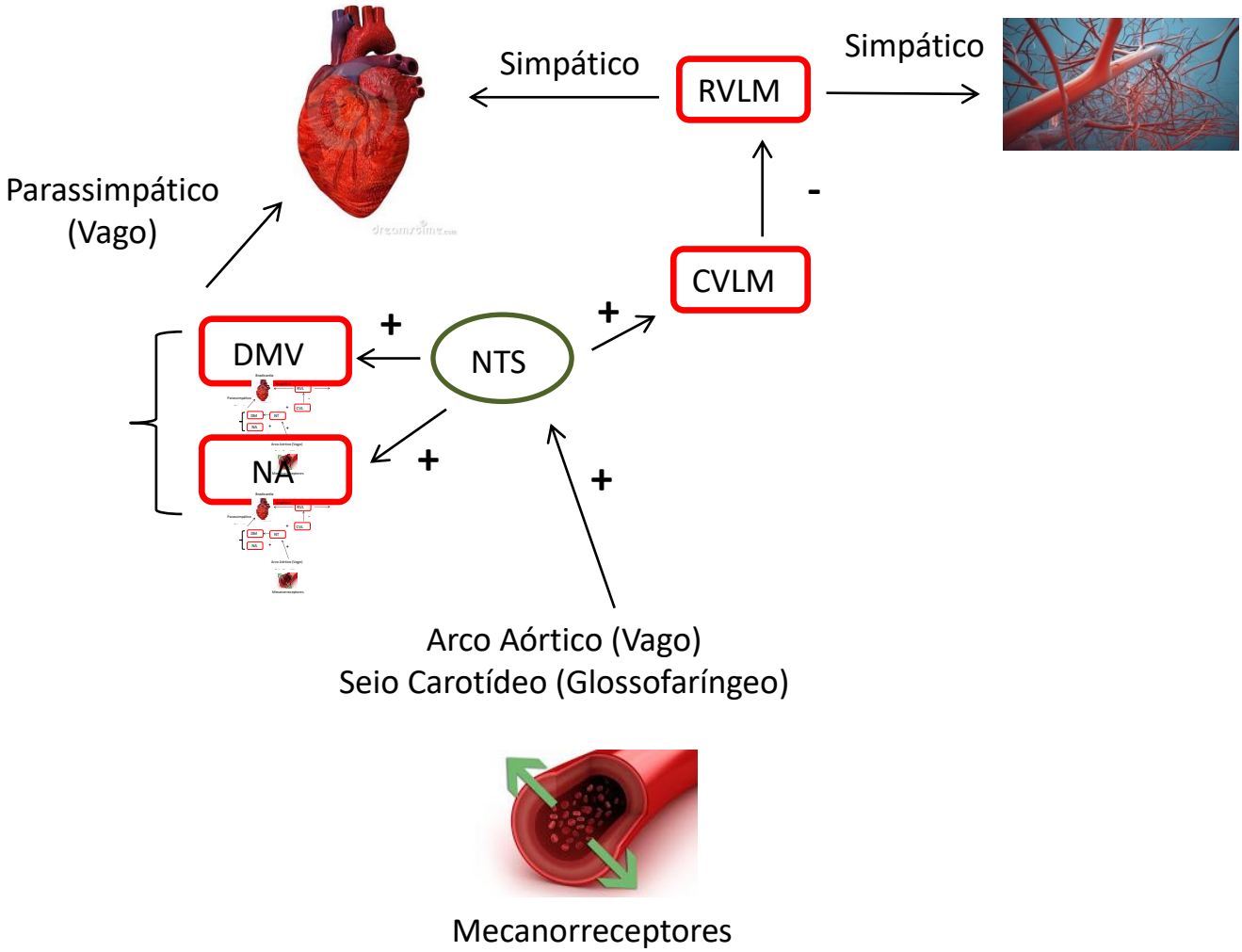
Gomes-Santos et al. (2014) mostraram que a atividade física em esteira, em WKY com insuficiência cardíaca, reduziu a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. Além disso, houve redução também dos níveis plasmáticos de angiotensina II neste mesmo modelo experimental. Silva Jr. et al. (2015) demonstram que animais SHR treinados em esteira tiveram os níveis de angiotensina, tanto plasmática quanto somática (artérias renal, femoral e carótida) reduzidos.

Dessa forma, possivelmente todos esses fatores em conjunto, os quais levam a uma diminuição da resistência ao fluxo, podem ter acarretado numa diminuição da pressão arterial.

Além disso, uma rede neuronal complexa (Figura 25), também responsável pelo controle cardiovascular, pode sofrer influências negativas, como na hipertensão

e no envelhecimento (Hypertensive cardiovascular disease, 1982; Pintérová et al., 2011), e positivas, como no treinamento físico (Michelini, 2001).

Figura 25: Figura esquemática do controle neural da circulação



Os núcleos envolvidos no controle cardiovascular trabalham por influência de informações provenientes da periferia (Ex: barorreflexo) (Hypertensive cardiovascular disease, 1982), mas também possuem um tônus que a todo o momento é influenciado por neurotransmissores excitatórios e inibitórios (Hypertensive cardiovascular disease, 1982). Um questionamento muito interessante

que fizemos foi: Os núcleos responsáveis pelo controle parassimpático, nos animais SHR em envelhecimento, NTS, DMV e NA, estariam com suas funções comprometidas? Os núcleos responsáveis pelo controle simpático, nos animais SHR em envelhecimento, RVLM, estariam com uma função excitatória exacerbada? Seria o exercício físico capaz de reestabelecer essa homeostasia central?

Podemos encontrar na literatura muitas fontes que comprovam as modificações centrais encontradas no quadro hipertensivo, acompanhado ou não do envelhecimento.

Sabe-se que o sistema nervoso central de animais SHR, mais especificamente os núcleos cardioexcitatórios, estão menos inibidos, o que pode contribuir com a elevação da pressão arterial (Ichida et al.,1995). Além disso, sabe-se que o GABA é um neurotransmissor inibitório que teria a função de diminuir a atividade desses núcleos, a fim de manter uma homeostasia central e periférica da pressão arterial (Hypertensive cardiovascular disease, 1982). Trabalhos antigos já mostravam a importância do GABA e sua relevância no aparecimento da hipertensão. Hashimoto et al. (1989) mostraram que o conteúdo de GABA no cerebelo, hipotálamo e hipocampo de animais SHR, estava diminuído quando comparado aos núcleos dos animais WKY. Além disso, Sasaki et al. (1986) mostraram que injeção intracerebroventricular de GABA, reduz a atividade nervosa simpática, PA e FC, em maior magnitude em ratos SHR do que em WKY, mostrando que nos animais SHR o drive excitatório é maior.

Estudos mais recentes e com tecnologias mais modernas, já permitem a comunidade científica estudar os fenômenos patológicos em núcleos e até mesmo em neurônios específicos. Dessa forma, consegue-se isolar e estudar a contribuição de determinado núcleo na manutenção da hipertensão, como fizeram Geraldes et al. (2014). Esse estudo foi realizado em animais SHR, e utilizaram lentivírus superexpressando canais de potássio para promover a inibição de neurônios do RVLM, e verificar sua importância na elevação da pressão arterial nesse modelo experimental. Observou-se queda considerável da pressão arterial média e frequência cardíaca.

Em humanos hipertensos ou idosos, podemos encontrar aumento do *drive* excitatório, caracterizado pelo aumento do tônus simpático e do conteúdo de epinefrina plasmática (Esler et al., 2001; Mancia e Grassi, 2014). Esse quadro ocorre

possivelmente devido à diminuição da inibição central, ocasionando exacerbação do sistema. Um estudo realizado em Melbourne recrutou homens com idade entre 20-30 anos e 60-75 anos, e mostrou que os indivíduos idosos possuíam um *turnover* de norepinefrina subcortical e seu conteúdo plasmático aumentados. Mancia e Grassi (2014) mostram que em humanos hipertensos há um aumento da atividade simpática, caracterizada por aumento dos níveis de norepinefrina plasmática, o que poderia ser, ao menos em parte, responsável pelos níveis pressóricos elevados.

O NTS é um núcleo complexo que contém uma série de neurotransmissores, e sua integridade é fundamental no controle da pressão arterial (Guynet, 2006). Os receptores α2 adrenérgicos presentes no tronco encefálico, são conhecidos como alvos de drogas anti-hipertensivas, pois induzem simpato-inibição e consequente queda na pressão arterial. Alguns autores atribuem os níveis elevados de pressão arterial a anomalias associadas às circuitarias no NTS, pois a diminuição do conteúdo de norepinefrina e da densidade de receptores α2 no NTS já foi demonstrada (Yamada et al., 1989). Dessa forma, Carretiero et al (2012) avaliaram a densidade de receptores α2 no NTS de ratos WKY e SHR, e acompanharam também os níveis pressóricos. As avaliações foram feitas com 15, 30, 60 e 90 dias de vida e foi observada uma queda gradual na quantidade de receptores α2, acompanhada de aumento na pressão arterial, apenas nos animais SHR. Outro trabalho que demonstra a importância desses receptores, e consequente melhora na função barorreflexa, foi feito por Hayashi et al. (1993), no qual foi administrado sistêmicamente clonidina (agonista α2) em ratos SHR. Esses animais tiveram um aumento da função barorreflexa.

Dessa forma, tanto o envelhecimento quanto a hipertensão podem comprometer o funcionamento do sistema nervoso central. Um estudo longitudinal onde se utilizou ratos SHR e WKY monitorados nas semanas 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 de vida, mostrou que a pressão arterial aumentou apenas nos animais SHR, como era esperado, porém, o componente LF da pressão arterial, ou seja, a modulação simpática para os vasos, aumentou gradativamente com o passar das semanas nos dois grupos, mostrando que o fator tempo (envelhecimento) foi fundamental para o aparecimento deste efeito deletério, tanto nos animais hipertensos como nos normotensos. A sensibilidade do barorreflexo dos animais SHR não variou com o tempo, mas a todo o momento foi reduzida quando comparada com os animais WKY (Negai et al., 2003).

Dessa forma, muitas modificações centrais podem estar presentes no nosso modelo experimental, que além de se tratar de animais hipertensos, são também animais em envelhecimento.

Está bem descrito que modificações centrais ocorrem tanto no envelhecimento, quanto na hipertensão. Terapias não farmacológicas, como exercício físico, têm sido investigadas na tentativa de atenuar esses mecanismos patológicos, e até mesmo reduzir os efeitos deletérios causados pela hipertensão.

Podemos encontrar na literatura trabalhos que mostram os benefícios do exercício, restaurando o desequilíbrio simpato-vagal. Um trabalho realizado com ratos treinados por 12 semanas mostrou que o exercício foi capaz de reduzir o componente simpático para o coração e para os vasos (Ceroni et al., 2009). Estes efeitos também foram observados em humanos, onde o exercício físico em bicicleta ergométrica de alta intensidade, agudamente (22 minutos), foi capaz de reduzir o componente LF e aumentar o componente HF (Guiraud et al. 2013).

Um estudo realizado com atletas idosos, com média de 69 anos, comparou a variabilidade da frequência cardíaca desses indivíduos com idosos sedentários da mesma idade. Os parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca apresentou uma correlação positiva com o desempenho atlético, e correlação negativa com a obesidade. Os resultados dos idosos atletas foram comparados com os dos jovens sedentários, com idade abaixo de 40 anos e, de forma surpreendente, o controle vagal desses idosos foi compatível com o dos jovens sedentários, mostrando que o exercício físico atenuou o declínio do tônus vagal (Meersman , Stein 2007).

Os barorreceptores arteriais exercem a função de controlar a atividade de nervos autonômicos cardíacos, participando assim da regulação do sistema cardiovascular na adaptação de uma série de mecanismos fisiológicos (La Rovere , Pinna 2014). Estes podem ter o seu funcionamento alterado devido ao processo de envelhecimento (La Rovere , Pinna 2014) ou na hipertensão, tanto em humanos quanto em animais experimentais SHR (Krieger et al., 2001). O prejuízo desse reflexo tem sido alvo de muitos estudos, bem como manobras que possam restabelecê-lo.

Estudos de Ceroni et al. (2009) demostram que a atividade física em ratos SHR foi capaz de melhorar a função barorreflexa, representada pelo aumento do "*range*" e do ganho da barocurva desses animais. Além disso, esse mesmo trabalho mostrou que a desnervação sino-aórtica dos animais SHR impediu o aparecimento

de melhoras cardiovasculares decorrentes do exercício físico, como a diminuição do componente simpático, LF, para os vasos.

Além de promover melhora da função barorreflexa e melhorar o desequilíbrio simpato-vagal, o exercício também promove modificações na plasticidade neuronal. Waki et al. (2013) descrevem que o exercício físico em animais SHR foi capaz de promover diminuição de fatores de transcrição para leucotrieno, prostaglandinas, quimiocinas e TNFα no NTS desses animais. Além disso, houve queda da pressão arterial média e diastólica, e uma melhor resposta depressora em resposta à histamina. Ainda com respeito à plasticidade, um estudo realizado com ratos SHR treinados em esteira, avaliou o NTS desses animais para analisar como o exercício atuaria nesse núcleo. Após o término do exercício (2 horas após), os animais foram sacrificados para a realização do protocolo de imunohistoquímica, que consistiu em analisar neurônios TH c-fos positivos da região A1 e A2 do NTS. Foi observado um aumento desses neurônios nos animais treinados, ou seja, o exercício foi capaz de ativar os neurônios A1 e A2 do NTS (Ohiwa et al., 2005).

Com base em todos esses dados da literatura, nosso desafio foi utilizar o treinamento físico como terapia não farmacológica e não invasiva, no intuito de atenuar os efeitos deletérios de um quadro hipertensivo crônico no envelhecimento. Obtivemos sucesso em algumas avaliações, como citado anteriormente, que foram as melhoras hemodinâmicas. Observamos ainda um aumento da modulação parassimpática para o coração, e uma melhora da função barorreflexa.

Esses benefícios encontrados podem estar relacionados a uma melhora dessas circuitarias citadas anteriormente (Fig 25). As vias que envolvem o barorreflexo e o controle cardiovascular são complexas de serem avaliadas, pois envolvem uma série de núcleos e neurotransmissores. Alterações negativas nessas vias, como ocorrem na hipertensão e no envelhecimento, e alterações positivas, que ocorrem no exercício, podem envolver uma série de mecanismos. Assim, acreditamos que uma melhora da modulação parassimpática para o coração, mesmo que não acompanhada por bradicardia de repouso, como seria esperado, é benéfica para o sistema cardiovascular, e pode ter contribuído para a melhora da função barorreflexa. Para avaliar se os benefícios do exercício físico na função barorreflexa envolvia alterações em núcleos bulbares diretamente relacionados com o controle cardiovascular, decidimos avaliar a quantificação de neurônios positivos para ChAT, no DMV e NA, e positivos para TH na região C1 do RVLM.

Nessa análise, avaliamos o número de neurônios positivos para essas enzimas, e não observamos diferença na contagem de neurônios dos animais treinados WKY e SHR, ou seja, o exercício físico não foi capaz de modificar o número de neurônios. Mas um dado muito interessante que encontramos, foi que os animais SHR treinados ou não, possuem uma quantidade maior de neurônios C1 do que os animais WKY, treinados ou não. Possivelmente, isso nos ajuda a compreender a existência de um maior tônus simpático encontrado nos SHR.

Sabemos que plasticidade neuronal que envolve modificação no número de neurônios em idosos não é simples. Podemos encontrar na literatura dados que mostram plasticidade neuronal com exercício no que diz respeito à morfologia do neurônio. Um trabalho realizado com ratos Sprague-Dawley, com treinamento espontâneo, analisou o RVLM desses animais através de imunohistoquímica para TH. Brevemente, foi injetado CTB, que é um traçador retrógrado, na medula espinhal desses animais e feito TH na região do RVLM. Constatou-se que os neurônios do RVLM estavam duplamente marcados, com CTB e TH, ou seja, esses neurônios se projetavam para a medula espinhal e eram catecolaminérgicos. O grande questionamento do trabalho foi: O exercício seria capaz de diminuir o número de neurônios? A resposta foi negativa para essa questão, mas foram observadas várias modificações anatômicas dos neurônios dos animais treinados, quando comparados com os sedentários, como redução do número de interseção de dendritos, redução no comprimento dos dendritos, diminuição de dendritos secundários e diminuição na quantidade de ramificação dos dendritos. Ou seja, todas essas modificações diminuem a probabilidade desses neurônios, do RVLM, em fazer sinapse, o que poderia contribuir para a diminuição do tônus simpático. Dessa forma, o exercício físico em animais idosos pode não alterar o número de neurônios centrais, mas supostamente poderia modificar sua estrutura morfológica, o que poderia contribuir para as melhoras funcionais causadas pelo exercício.

8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o exercício físico foi capaz de reduzir a pressão arterial média, sistólica e diastólica, dos animais SHR treinados por 2 e 8 semanas, sem alterações na frequência cardíaca. Além disso, o exercício físico por 8 semanas, nos animais SHR, foi capaz de aumentar o componente HF do intervalo de pulso, ou seja, melhorar a modulação parassimpática para o coração,melhorar a função barorreflexa sem alterações no número de neurônios positivos para ChAT no DMV e NA e positivos para TH na região C1 do RVLM. Dessa forma, o exercício físico foi benéfico em melhorar alguns fatores deletérios causados pelo envelhecimento acompanhado de hipertensão.

REFERÊNCIA*

Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat Rec. 1946; 239-47.

Alves AJ, Viana JL, Cavalcante SL, Oliveira NL, Duarte JA, Mota J, Oliveira J, Ribeiro F. Physical activity in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Overview updated World. J Cardiol. 2016; 575-583.

Alzoubi KH, Aleisa AM, Alkadhi KA (2010). In vivo expression of ganglionic long-term potentiation in superior cervical ganglia from hypertensive aged rats. Neurobiol Aging. 2010; 805-12.

Hypertensive cardiovascular disease: Pathophysiology and Treatment. 1.ed. Bélgica: University of Leuven; 1982.

Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Vol 208, número 02, 2017.

Carrettiero DC, Ferrari MFR, Fior-Chadi DR. Alpha-2adrenergic receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats during development. Autonomic Neuroscience:Basic and Clinical.2012; 39-46.

Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordão MT, Ceroni A, Michelini LC. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011; 958-66.

Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Exp Physiol. 2009; 630-40.

Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRP, Cordeiro JÁ et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. Arq Bras Card. 2008; 31-35.

Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? Hypertension. 2008; 514-21.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular. Physiol Rev.1994; 323-64.

De Meersman RE, Stein PK. Vagal modulation and aging. Biol Psychol. 2007; 165-73.

Esler M, Hastings J, Lambert G, Kaye D, Jennings G, Seals DR. The influence of aging on the human sympathetic nervous system and brain norepinephrine turnover. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 909-16.

Felix JV, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. Hypertension. 2007; 780-5.

Florentino A, Varga K, Kunos G. Mechanism of the cardiovascular effects of GABAB receptor activation in the nucleus tractus solitarii of the rat. Brain Research. 1990; 264–270.

Ganong WF: Ganong´s Review of Medical Physiology. 23. ed. New York: MacGraw-Hill; 2010. 714p

Gava NS, Véras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1995; 1129-33.

Geraldes V, Goncalves-Rosa N, Liu B, Paton JF, Rocha I. Essential role of RVL medullary neuronal activity in the long term maintenance of hypertension in conscious SHR. Auton Neurosci. 2014; 22-31.

Guyenet PG. The sympatetic controlo f blood pressure. Nat Ver Neurosci. 2006; 335-46.

Gomes-Santos IL, Fernandes T, Couto GK, Ferreira-Filho JC, Salemi VM, Fernandes FB et al. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. PLoS One. 2014; 98012.

Gribbin B, Pickering TG, Sleight P, Peto R. Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. Circ Res. 1971; 424-31.

Guiraud T, Labrun ee M, Gaucher-Cazalis K, Despas F, Meyer P, Bosquet L, et al. High- intensity interval exercise improves vagal tone and decreases arrhythmias in chronic heart failure. Med Sci Sports. 2013; 1861-7.

Guyton AC. Guyton & Hall. 11. ed. Mississipi:Elsevier Sounders; 2006. 1116p.

Hart EC, Joyner MJ, Wallin BG, Johnson CP, Curry TB, Eisenach JH, et al. Age-related differences in the sympathetic-hemodynamic balance in man. Hypertension. 2009; 127-33.

Hashimoto T, Kimori M, Nakamura Y, Kuriyama K. Effect of NC-1100 [1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(4-diphenylmethylpiperazinyl) ethanol dihydrochloride] on gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in rat brain: analysis using stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Jpn J Pharmacol. 1989; 131-9.

Hayashi J, Takeda K, Kuwabara T, Takesako T, Itoh H, Hirata M et al. Clonidine improves central attenuation of the baroreflex in spontaneously hypertensive rats. Jpn Heart J. 1993; 333-9.

Jänig W The integrative action of the autonomic nervous system. Nova York: Cambridge; 2006.

Jones PP, Shapiro LF, Keisling GA, Jordan J, Shannon JR, Quaife RA et al. Altered autonomic support of arterial blood pressure with age in healthy men. Circulation. 2001; 2424-9.

Krieger EM, Da Silva GJ, Negrão CE. Effects of exercise training on baroreflex controlo f cardiovascular system. Ann N Y Acad Sci. 2001; 338-47.

La Rovere MT, Pinna GD. Beneficial effects of physical activity on baroreflex control in the elderly. Ann Noninvasive Electrocardiol. 2014; 303-10.

Laitinen T, Hartikainen J, Vanninen E, Niskanen L, Geelen G, Länsimies E. Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in healthy subjects. J Appl Physiol.1998; 576-83.

Madden KM, Lockhart C, Potter TF, Cuff D. Aerobic training restores arterial baroreflex sensitivity in older adults with type 2 diabetes, hypertension and hypercholesterolemia. Clin J Sport Med. 2010; 312-7.

Malta DC, Moura L, Souza FM, Rocha FM, Fernandes FM. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. Ministério da Saúde, Brasília,2009; 337-362.

Mancia G, Grassi G. The autonomic nervous system and hypertension. Circ Res. 2014; 1804-14.

Margarida de Mello Aires. 3ª ed. Rio de janeiro;2008 p 571-93

Mazzeo RS e Horvath SM. Effects of training on weight, food intake, and body composition in aging rats. Am J Clin Nutr. 2009; 732-8.

Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. Hypertension. 2003; 851-7.

Mischel NA, Llewellyn-Smith IJ, Mueller PJ. Physical (in)activity-dependent structural plasticity in bulbospinal catecholaminergic neurons of rat rostral ventrolateral medulla. J Comp Neurol. 2014; 499-513.

Michelini LC. Ann N Y. Oxytocin in the NTS: A New modulator of cardiovascular control during exercise. Acad Sci . 2001; 206-20.

Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR et al. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2010; 114-20.

Nações Unidas – Worl Population Ageing. EUA. Nova York; 2009

Nagai R, Nagata S, Fukuya F, Higaki J, Rakugi H, Ogihara T. Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;419-25.

Narkiewicz K, Phillips BG, Kato M, Hering D, Bieniaszewski L, Somers VK. Gender-selective interaction between aging, blood pressure, and sympathetic nerve activity. Hypertension. 2005; 522-5.

Ohiwa N, Saito T, Chang H, Omori T, Fujikawa T, Asada T et al. Activation of A1 and A2 noradrenergic neurons in response to running in the rat. Neurosci Lett. 2006;46-50.

Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. J Hypertension. 2009;963-975.

Persson, P. A hypertensive response to baclofen in the nucleus tractus solitarii in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology.1981;226-231.

Pintérová M, Kuneš J, Zicha J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. Physiol Res.2011; 381-402.

Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. Br J Pharmacol. 2013; 686-703.

Rosário TM, Scala LCNS, França GVA, Pereira MRG, Jardim PCBV . Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. Arq Bras Card. 2009; 672-678.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J et al (1984). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of lectrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. J Neurosci. 1984; 474-94.

Rossoni LV, Oliveira RA, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension. 2011;2349-2358.

Sasaki S, Lee LC, Nakamura Y, Iyota I, Fukuyama M, Inoue A et al. Hypotension and hypothalamic depression produced by intracerebroventricular injections of GABA in spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J. 1986;1140-8.

Silva SD Jr, Zampieri TT, Ruggeri A, Ceroni A, Aragão DS, Fernandes FB et al. Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training - focus on the balance betweenvasoconstrictor and vasodilator axes. Circ J. 2015; 1372-80.

Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/ Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol 2010. 1p.

Sved AF, Sved JC. Endogenous GABA acts on GABAB receptors in nucleus tractus solitarius to increase blood pressure. Brain Research. 1990; 235–240.

Tanabe S, Buñag RD. Aging escalates baroreceptor reflex suppression by the posterior hypothalamus in rats. Hypertension. 1991; 80-90.

Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol. 1997; 2627-31.

Waki H, Gouraud SS, Bhuiyan ME, Takagishi M, Yamazaki T, Kohsaka A et al. Transcriptome of the NTS in exercise-trained spontaneously hypertensive rats: implications for NTS function and plasticity in regulating blood pressure. Physiol Genomics. 2013; 58-67.

Williams B. The year in hypertension. JACC. 2010; 66-73.

World Health Organization. Suiça. Geneva; 2009.

World Health Organization. Suiça. Geneva; 2002.

Yamada S, Ashizawa N, Nakayama K, Tomita T, Hayashi E. Decreased density of alpha 2-adrenoceptors in medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 1989;440-6.