GUSTAVO GASTÃO DAVANZO

**INFLAMASSOMA NLRP3 COMO UM POSSÍVEL
MECANISMO NA MEDIAÇÃO DE DÉFICITS
FUNCIONAIS NA HIPERTENSÃO: EFEITOS DO
TREINAMENTO AERÓBIO**

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

São Paulo
2016

GUSTAVO GASTÃO DAVANZO

**INFLAMASSOMA NLRP3 COMO UM POSSÍVEL
MECANISMO NA MEDIAÇÃO DE DÉFICITS
FUNCIONAIS NA HIPERTENSÃO: EFEITOS DO
TREINAMENTO AERÓBIO**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lisete Compagno Michelinini

Versão Original

São Paulo
2016

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)

Gastão Davanzo, Gustavo
INFLAMASSOMA NLRP3 COMO UM POSSÍVEL MECANISMO NA
MEDIÇÃO DE DÉFICITS FUNCIONAIS NA HIPERTENSÃO:
EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO / Gustavo Gastão
Davanzo; orientadora Lisete Compagno Micheliní. -
- São Paulo, 2016.
90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de
São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Inflamassoma. 2. Hipertensão. 3. Treinamento
Aeróbico. 4. Ratos. 5. PCR. I. Compagno Micheliní,
Lisete, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Gustavo Gastão Davanzo

Título da Dissertação/Tese: INFLAMASSOMA NLRP3 COMO UM POSSÍVEL MECANISMO NA MEDIAÇÃO DE DÉFICITS FUNCIONAIS NA HIPERTENSÃO: EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO

Orientadora: Prof.^a. Dr^a. Lisete Compagno Michelin

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato (a):

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

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 **003** nas fls.**028** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Lisete Compagno Michelini**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Inflamassomas como um possível mecanismo na mediação de déficits funcionais na hipertensão: efeitos do treinamento aeróbio*" do qual participam o(s) aluno(s) **Gustavo Gastão Davanzo**, Especialista de Laboratório **Alexandre Ceroni**, Treinamento Técnico **Matheus Garcia de Fragas**, 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 **12.02.2015**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

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

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

**Dedico esta tese aos meus familiares e
amigos que deram todo apoio para
que este sonho se tornasse realidade**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos **MEUS PAIS E IRMÃ**, que nunca mediram esforços para que este sonho se concretizasse. Dizia Newton: “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes” e sem dúvida alguma, vocês são os principais gigantes em minha vida! Muitíssimo obrigado.

Não poderia deixar de agradecer à **THEREZA APPAREDIDA ALVES VIDAL (DONA TECA)**, à qual serei eternamente grato pela bolsa que possibilitou que o sonho da universidade se tornasse realidade. Obrigado por tudo e descanse em paz.

Aos demais **FAMILIARES**, que a cada visita a Votuporanga me lembravam que família é só uma e só nós temos uma tão animada. Amo vocês!

À orientadora **LISETE COMPAGNO MICHELINI** pela oportunidade de fazer parte do grupo de uma das principais pesquisadoras na área de Fisiologia Cardiovascular do país. Agradeço pelo aprendizado de cada JC, de cada reunião e pela paciência quando tudo dava errado.

Agradeço ao professor **NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA** por todos os ensinamentos que cada conversa foi capaz de propiciar.

Ao **ALEXANDRE CERONI** pela ajuda durante procedimentos, compras e discussões. Agradeço imensamente pelo aprendizado!

Agradeço à banca de qualificação formada pelo professor **VAGNER ROBERTO ANTUNES, CLARICE KAZUE FUJIHARA E REINALDO CORREIA DA SILVA** pela compreensão dos problemas e sugestões para que este trabalho se concretizasse.

Aos funcionários do ICB. Ao pessoal da secretaria da pós-graduação **JOSÉ MARIA** e **PALOMA** por toda a paciência e ajuda que deram durante toda essa jornada. Ao pessoal da Biblioteca pelo apoio. E ao pessoal do Biotério, pelo cuidado com os animais.

Ao pessoal da limpeza pelo sorriso e alegria que vocês traziam a cada dia.

Aos professores **MIGUEL ARCANJO ÁREAS** e **DORA MARIA GRASSI-KASSISSE** meus pais acadêmicos, que deram todo o apoio para alçar esse novo voo fora das seguranças e certezas do LABEEST.

Aos amigos de Campinas, São Paulo e Votuporanga pelos momentos de alegria, risadas e ajuda. Agradeço em especial a **ALINE MIKA MATSUGUMA**, minha grande amiga e confidente.

Ao pessoal do laboratório (e agregados) **JÚNIOR, VANESSA, LEILA, ADRIANA, NILSON, SARA, VIC, e MARCELO** por todos os momentos juntos, as alegrias, confraternizações, cafés, discussões ... que a carreira de vocês seja repleta de conquistas!

Por último, mas não menos importante, fica a obrigação de agradecer de maneira especial ao **MATHEUS GARCIA FRAGAS e CARLA ROCHA DOS SANTOS**, primeiramente pela amizade que criamos nesse tempo juntos, pelas centenas de coletas, confidências, opiniões e trocas de experiência. Com toda a certeza, sem vocês esse mestrado teria sido bem mais chato e difícil. Desejo toda a felicidade do mundo e serei eternamente grato por tudo que me ensinaram!

.

**Por um mundo onde sejamos socialmente iguais,
humanamente diferentes e totalmente livres.**

Rosa Luxemburgo

RESUMO

Davanzo, GG. Inflamassoma NLRP3 como um possível mecanismo na mediação de déficits funcionais na hipertensão: efeitos do treinamento aeróbio. [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O processo inflamatório pode ser iniciado pela presença de patógenos (PAMPs) ou de moléculas associadas ao dano tecidual (DAMPs), estes sinais são reconhecidos por células do sistema imune via receptores de reconhecimento de padrão localizados na membrana ou no citoplasma destas células. A ativação da família de receptores intracitoplasmáticos do tipo NOD (NLR) pode levar à formação de complexos proteicos denominados inflamassomas, entre eles, o inflamassoma NLRP3, formado por três estruturas básicas: receptores do tipo NOD, proteína adaptadora (ASC) e pró-caspase 1. Essas caspases ativas são capazes de induzir a maturação proteolítica de interleucina-1 beta (IL-1b) e IL-18, que então são liberadas para o meio extracelular. É sabido que a hipertensão é uma doença inflamatória associada à presença de DAMPs em regiões de controle da pressão arterial, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) bem como, que o treinamento aeróbio é uma conduta eficaz em reverter muitos dos efeitos deletérios da hipertensão. Desta forma, é nossa hipótese de trabalho que inflamassomas NLRP3 possam estar ativados na hipertensão e que o treinamento aeróbio corrija muitos déficits do controle cardiovascular por modular a resposta imune inata. Em ratos machos adultos Wistar Kyoto e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), foram feitas análises de parâmetros cardiovasculares, além da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e citocinas, e proteica de citocinas no PVN de animais sedentários ou treinados por quatro semanas de ambas as linhagens. Nossos resultados mostram que animais hipertensos se caracterizam por valores aumentados de pressão arterial e frequência cardíaca de repouso, associados à disfunção autonômica ao coração e vasos. SHR apresentam inflamação no PVN, o que foi evidenciado pelo elevado perfil de expressão dos constituintes da via do inflamassoma NLRP3, TLR-4 e citocinas pró-inflamatórias. O treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade reduziu a expressão gênica desses parâmetros e proteica de citocinas pró-inflamatórias, bem como a disfunção autonômica, além de determinar a instalação da bradicardia de repouso. Nossos dados sugerem que a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias no PVN de SHR seja devido à ativação do inflamassoma NLRP3, numa via dependente de TLR-4. Nosso trabalho é o primeiro a investigar o papel de inflamassomas em regiões autonômicas em hipertensos, bem como o efeito do treinamento físico sobre este perfil inflamatório.

Palavras-chave: Inflamassomas. Hipertensão. Treinamento aeróbio. Ratos.

ABSTRACT

Davanzo, GG. NLRP3 inflammasome as a possible mechanism in the mediation of functional deficits in hypertension: effects of aerobic training. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

The inflammatory process can be triggered by the presence of pathogens (PAMPs) or damaged-associated molecules pattern (DAMPs), this danger signals are recognized by immune system via pattern recognition receptors (PRR) in membrane or in the cytoplasm cells. The activation of NOD like receptors in the cytoplasm can trigger the formation of protein complex called inflammasomes, such as the NLRP3 inflammasome, which is comprised of three basics structures: NOD like receptor, adaptor protein and pro-caspase-1. This complex can induce the proteolytic maturation of pro-inflammatory cytokines (PICs), like interleukin 1 beta (IL-1b) and IL-18, which are then released into the extracellular medium. It is known that hypertension is an inflammatory disease associated with DAMPs in blood pressure controlling areas in hypothalamus, like paraventricular nucleus (PVN) and that aerobic training can reverse the deleterious effects of hypertension. So, is our hypothesis that NLRP3 inflammasomes can be active in hypertension and that the exercise training restored the cardiovascular deficits by modulate the innate response. In adult male rats Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats (SHR), cardiovascular parameters, gene expression of inflammasomes members or cytokines and cytokines protein contents were measured in the PVN of sedentary or four weeks trained groups from both lineages. Our results show that hypertensive animals are characterized by enhanced blood pressure and resting heart rate values, associated with autonomic dysfunction to heart e vessels. SHR had PVN inflammation, what is evidenced by the enhanced inflammasome NLRP3, TLR-4 and PICs expression in this area. The aerobic training with low or moderate intensity reduce the gene expression of these parameters and the protein expression of PICs, as well as, the autonomic dysfunction, in addition to determining the installation of resting bradycardia. Our data suggest that the elevated expression of PICs in SHR PVN is due to the activation of NLRP3 inflammasomes, in a TLR-4 dependent pathway. Our work is the first to investigate the role of inflammasomes in autonomic brain areas in hypertensive rats, as well as, the effect of exercise training on this inflammatory profile.

Keywords: Inflammasomes. Hypertension. Exercise training. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – ativação do NLRP3 inflamassoma. Fonte: Haitao Guo, 2015.....	22
Figura 2 – SHR apresentam taquicardia de repouso e hipertensão estabelecida.....	32
Figura 3 – A hipertensão espontânea caracteriza-se por elevada atividade vasomotora, maior modulação hormonal e reduzida sensibilidade barorreflexa	33
Figura 4 – A hipertensão espontânea caracteriza-se pelo desequilíbrio simpato-vagal ao coração.....	34
Figura 5 – SHR apresentam ativação de TLR4 e NLRP3 e perfil inflamatório.....	36
Figura 6 - SHR e WKY não apresentam diferença no conteúdo proteico de IL-1 β	37
Figura 7 – Apesar do melhor desempenho dos SHR, o ganho induzido pelo treinamento é similar em ambos os grupos.....	38
Figura 8 - Treinamento reduziu a taquicardia de repouso de ambas as linhagens.....	41
Figura 9 – Nos SHR o treinamento impede aumento idade-dependente da Var-PAS	43
Figura 10 – Há maior elevação induzida pelo treinamento da Var-IP nos SHR-T.....	45
Figura 11 – Treinamento aeróbio reduz a expressão de TLR-4	47
Figura 12 – Treinamento aeróbio reduz a expressão de genes da via do inflamassoma NLRP3.....	48
Figura 13 – Treinamento aeróbio diminui a expressão de caspases inflamatórias	49
Figura 14 - Treinamento aeróbio reduz a expressão de PICs em SHR	50
Figura 15 – Treinamento induz redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 em SHR.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - primers utilizados para PCR.....	28
Tabela 2 - Valores basais absolutos de PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min) e valores dos componentes espectrais da PAS e frequência cardíaca (quantificada pelo intervalo de pulso, IP) dos ratos adultos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	31
Tabela 3 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma, receptores TLR4 e de proteínas pró-inflamatórias no PVN de WKY e SHR	35
Tabela 4 – Expressão proteica de IL-1 β no PVN de WKY e SHR	37
Tabela 5 - Valores dos testes de esforço máximo nas semanas 0 e 4 dos grupos WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	38
Tabela 6 - Valores basais absolutos de PA média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min), da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) e seus componentes espectrais nos grupos WKY treinados (T) e sedentários (S) durante as 4 semanas experimentais..	39
Tabela 7 - Valores basais absolutos de PA média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min), da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) e seus componentes espectrais nos grupos SHR treinados (T) e sedentários (S) durante as 4 semanas experimentais.	40
Tabela 8 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e citocinas pró-inflamatórias no PVN de WKY submetidos a 4 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).	46
Tabela 9 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e citocinas pró-inflamatórias no PVN de SHR submetidos a 4 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).	46
Tabela 10 - Expressão proteica de citocinas no PVN de WKY e SHR	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II – Angiotensina II

ASC - Proteína associada a apoptose
contendo um domínio CARD

AT1r – Receptor do tipo 1 de
angiotensina II

BBB – Barreira hematoencefálica

BVLc – Bulbo ventrolateral caudal

BVLr – Bulbo ventrolateral rostral

cDNA – DNA complementar

DAMPs – Padrões moleculares
associados a dano

DC – Débito cardíaco

DEPC – dietilpirocarbonato

DMV – núcleo dorsal motor do vago

DNA – ácido desoxirribonucleico

FC – Frequência cardíaca

GABA – ácido gama-aminobutírico

HMGB1 – High mobility group box-1

HPRT - Hipoxantina-guanina
fosforibosil transferase

IL-6 – Interleucina-6

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-18 – Interleucina-18

IML – Coluna intermédio-lateral

NA - núcleo ambíguo

NLR – Receptores do tipo NOD

NTS - núcleo do trato solitário

OT – Ocitocina

PA – Pressão arterial

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAMPs – Padrões moleculares
associados a patógenos

PAS – Pressão arterial sistólica

PCR – Reação em cadeia da
polimerase

PICs – Citocinas pró-inflamatórias

PRR – Receptores de reconhecimento
de padrões

PVN – núcleo paraventricular do
hipotálamo

RNA_m – Ácido ribonucleico
mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RV – Retorno Venoso

S – Sedentário

SFO – Núcleo subfornicial

SHR – Ratos espontaneamente
hipertensos

SNC – Sistema nervoso central

SON – Núcleo supraóptico

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

T – Treinamento aeróbio/treinado

TLR - Receptores do tipo Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

VP – Vasopressina

WKY – Ratos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Controle da Pressão Arterial	15
1.2	Caracterização da hipertensão arterial.....	16
1.3	Hipertensão como processo inflamatório	18
1.4	Reconhecimento de danos pelo sistema imune	19
1.5	Ativação do Inflamassoma	20
1.6	Treinamento aeróbio na hipertensão arterial.....	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Animais e desenho experimental.....	26
3.2	Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais	26
3.3	Protocolo de Treinamento Aeróbio ou Sedentarismo.....	26
3.5	Análise espectral da PA e FC	27
3.6	Obtenção dos tecidos encefálicos.....	27
3.7	RT-PCR em tempo real.....	27
3.8	Quantificação de citocinas por método Multiplex	29
3.9	Análise Estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Efeito da hipertensão sobre os constituintes do inflamassoma.....	31
4.2	Efeito do treinamento sobre os constituintes do inflamassoma	37
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Controle da Pressão Arterial

Para que todos os tecidos sejam supridos por aporte sanguíneo adequado, uma série de mecanismos locais, hormonais e neurais atuam na regulação da pressão arterial (PA) em valores adequados durante toda a vida do indivíduo. Esse ajuste fino da PA é feito por regiões do sistema nervoso central (SNC) que recebem aferências de receptores periféricos, localizados em diferentes pontos do sistema cardiovascular, integram estas informações e por meio de respostas neuro-hormonais modulam as atividades cardíacas e vasculares. Dentre esses receptores, destacam-se os mecanorreceptores arteriais, chamados de barorreceptores, os quimiorreceptores arteriais e os receptores cardiopulmonares. Dentre esses, os barorreceptores são essenciais para a regulação momento a momento da PA, formando assim, o braço aferente do barorreflexo (1,2). Os barorreceptores estão localizados na aorta e na bifurcação das carótidas, assim, a passagem de sangue nesses vasos causa deformação das terminações nervosas, havendo então influxo de íons sódio e cálcio por canais iônicos, que irão gerar potenciais de ação com maior ou menor frequência, de acordo com a deformação do vaso (3). Esses potenciais de ação serão transmitidos por neurônios bipolares pelo nervo depressor aórtico (provenientes dos receptores da aorta) e nervo sinusal (provenientes dos receptores carotídeos) e conduzidos ao núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo, onde integram-se às demais áreas de modulação autonômica. O arco reflexo básico do controle cardiovascular responde a variações de PA, para que os valores normais sejam retomados rapidamente.

Frente a elevações de PA, ocorre aumento na frequência de disparos das aferências dos barorreceptores, estimulando neurônios secundários do NTS, onde neurônios glutamatérgicos se projetam ao bulbo ventrolateral caudal (BVLc), onde fazem sinapse com neurônios inibitórios liberadores de ácido gama aminobutírico (GABA) que se direcionam ao bulbo ventrolateral rostral (BVLr) (4)(5). Neste núcleo estão localizados os neurônios pré-motores simpáticos responsáveis pela geração do tônus simpático ao coração e vasos (2,6). Portanto, a inibição dos neurônios do BVLr causa redução do tônus simpático, causando redução do débito cardíaco, do retorno venoso e da resistência periférica, com consequente queda da PA. A

atividade simpática também é alterada por mudanças na PA, visto que neurônios de segunda ordem do NTS se projetam para o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e núcleo ambíguo (NA), promovendo aumento da atividade parassimpática ao coração, contribuindo para a queda do débito cardíaco e da PA (7).

Por outro lado, redução da PA causa redução na frequência de disparos dos barorreceptores, ocorrendo menor ativação dos núcleos ambíguo e dorsal motor do vago, conseqüentemente, do sistema nervoso parassimpático, além de redução da atividade inibitório do BVLc sobre o BVLr, levando ao aumento da atividade simpática. Em conjunto, essas alterações produzirão reflexamente taquicardia, vasoconstrição periférica e aumento da contratilidade cardíaca.

O controle cardiovascular conta também com circuitos suprabulbares de integração e modulação para ajustes da PA frente a variações que podem ser causadas, por exemplo: pelo exercício físico, situações de estresse, sono, entre outros. Nessas situações, além da resposta reflexa, mostra-se essencial que as informações que chegam ao NTS também sejam transmitidas para áreas suprabulbares, por meio de neurônios noradrenérgicos, para regiões do hipotálamo, amígdala e córtex (7,8). No hipotálamo, os neurônios ascendentes projetam-se para neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que sintetizam vasopressina (VP) e ocitocina (OT), que serão liberadas na circulação pela neurohipófise (9,10) e também para neurônios parvocelulares do PVN, vasopressinérgicos e ocitocinérgicos, que se projetam ao NTS, DMV, NA e BVL (11–13), que constituem a alça suprabulbar de controle autonômico do sistema cardiovascular. Essas projeções ao bulbo se mostraram importantes na regulação do funcionamento do barorreflexo (14–17).

1.2 Caracterização da hipertensão arterial

O avanço tecnológico e científico possibilitou o desenvolvimento de diversas condutas terapêuticas para diminuir o número de mortes causadas por infecções, além de aumentar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas. Por outro lado, a urbanização e globalização, trouxeram consigo o aumento relativo no número de óbitos causados por doenças relacionadas aos hábitos de vida urbanos, como: doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecções no trato respiratório inferior, cânceres de pulmão, brônquios e

tranqueia, diabetes mellitus e hipertensão (18). Dentre essas, destacam-se as doenças cardiovasculares que, segundo a Organização Mundial da Saúde, são responsáveis globalmente por aproximadamente 17 milhões de mortes ao ano, representando um terço do total, sendo a hipertensão, aumento mantido da pressão arterial em valores iguais ou superiores a 140 mmHg de PA sistólica e/ou PA diastólica igual ou superior a 90 mmHg, responsável por 9,4 milhões de mortes no mundo a cada ano (19). Apesar da elevação da pressão arterial (PA) por si só não levar ao óbito, os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela hipertensão favorecem o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo, como o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e a insuficiência renal, entre outros, sendo responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana (20). Diversos agravantes, além de histórico familiar, podem contribuir para a instalação de um quadro hipertensivo, como: inatividade, excesso de sal na dieta, ingestão de álcool, stress, obesidade, entre outros (21).

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial onde se evidencia e alteração de mecanismos simpato-humorais, como: disfunção autonômica, atividade aumentada de fatores neuro-hormonais e um perfil inflamatório de baixo grau (22,23). A disfunção autonômica é a principal característica da hipertensão neurogênica, caracterizada por um aumento do sistema nervoso simpático cardíaco e vasomotor, em detrimento da redução do sistema nervoso parassimpático, levando entre outras coisas, ao remodelamento vascular, hipertrofia cardíaca, hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA) plasmático e tecidual e produção de citocinas pró-inflamatórias (PICs) (24).

Angiotensina II (Ang II) é o principal mediador do SRA e o mais importante mediador da hipertensão (25). Em situações normais, Ang II não atravessa a barreira hematoencefálica (BBB), ainda que sua ação em órgãos circunventriculares, como o órgão subfornicial (SFO), leve a ativação de vias centrais que se projetam principalmente para regiões hipotalâmicas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com consequente busca por água, sede, o efeito pressórico e a secreção de vasopressina (26,27). Por outro lado, Ang II também tem papel importante em regiões intra-BBB, como mostrado pela infusão de Ang II intracerebroventricular aumentando a PA e a expressão de PICs no baço, através da ativação central de nervos simpáticos (28), a administração de Ang II no PVN e BVLR promove resposta pressórica e simpato-excitação (29,30). O bloqueio

do receptor do tipo 1 de angiotensina II (AT1r) no PVN e BVLR atenua simpato-excitação (31,32) e no NTS aumenta a sensibilidade barorreflexa (33). Recentemente foi mostrado que Ang II circulante é encontrada em no PVN, NTS e BVLR de hipertensos, por conta do aumento da permeabilidade da BBB dessas regiões (34).

1.3 Hipertensão como processo inflamatório

Além de mecanismos neuro-humorais, a hipertensão também é tida como uma doença inflamatória, onde os níveis de moléculas inflamatórias, como proteína C-reativa, fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-6, interleucina-1 β , proteína quimiotática de monócitos-1 e moléculas de adesão estão aumentadas em hipertensos (21–23). Assim como em outros tecidos, no SNC, citocinas tem sido encontradas em diversos núcleos de relevância cardiovascular, como PVN e NTS (35–38). Além disso, a infusão intracerebroventricular de PICs, como IL-1 β , causa aumento de PA e da atividade simpática (39). A inflamação em animais espontaneamente hipertensos (SHR) não se restringe à periferia, sendo encontrada também nos vasos cerebrais (40). Waki *et al* em elegante trabalho, mostrou que no NTS de SHR ocorre maior expressão de moléculas de adesão e acúmulo de leucócitos (41). Trabalho recente de Dange e colaboradores mostrou que animais SHR apresentam maior expressão gênica e proteica IL-1 β , TNF- α e maior atividade da subunidade p65 do NF-kB, além disso, neste mesmo trabalho o pesquisador mostra que os receptores do tipo Toll 4 (TLR-4) estão co-localizados com neurônios e micróglia, mas não astrócitos desta região, quando foi administrada cronicamente por meio de injeção bilateral no PVN dos animais uma droga que inibe TLR-4 viu-se redução do processo inflamatório, bem como queda nos valores de pressão arterial (42). Nesse mesmo ano, a pesquisadora Vinicia Biancardi e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que na ausência de TLR-4 a angiotensina induz menor ativação de micróglia e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em preparados de PVN (43). Essa inflamação em hipertensos tem sido relacionada à maior atividade da micróglia, macrófagos residentes do SNC, que respondem a lesões no cérebro, produzindo mediadores inflamatórios, como IL-1 β e TNF α (38). Assim, acredita-se que a combinação de citocinas periféricas que atravessam a BBB e a geração de citocinas pelas células do SNC contribuem para o processo neuroinflamatório característico da hipertensão.

Acredita-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias no PVN seja devido à ação da angiotensina II em órgãos cingulares e principalmente, devido à lesão de barreira hematoencefálica, causaria a ativação de micróglia e leucócitos infiltrantes, principalmente via TLR-4, levaria à maior produção de citocinas inflamatórias, pela ativação da via do NF-KB (34,37).

1.4 Reconhecimento de danos pelo sistema imune

O sistema imune inato a primeira linha de defesa do organismo, frente a estímulos aversivos, como lesões, inflamações, danos celulares ou microorganismos invasores (44,45). Para que essa resposta seja eficaz, o sistema imune possui uma série de barreiras, células fagocíticas e proteínas sanguíneas, que farão o reconhecimento, liberação de citocinas, quimiocinas, assim como finalização ou início de uma resposta imunológica mais especializada, denominada resposta imune adaptativa.

Para o reconhecimento de microorganismos ou lesões o sistema imune dispõe de uma série de receptores específicos, coletivamente chamados “receptores de reconhecimento de padrões” (*pattern recognition receptors* - PRR) (46), que ao reconhecerem porções estruturais conservadas de microorganismos, chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou moléculas endógenas liberadas durante lesões celulares, as “danger-associated molecular patterns” (DAMPs), ativam vias de sinalização que resultam na produção de PICs e quimiocinas (47). Sendo assim, o processo inflamatório é desencadeado por alterações na homeostasia tecidual, de tal forma que, mesmo na ausência de patógenos a resposta inflamatória pode haver resposta inflamatória, o que levou a se conceituar a chamada “inflamação estéril” (47).

Dentre os PRRs, parte deles estão localizados na membrana plasmática das células, como: receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C; e também no citosol, como: receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG, sensores de DNA citosólico (48).

Os TLR são glicoproteínas de membrana que possuem dois domínios: o domínio externo N-terminal rico em repetições de leucinas (LRR – “leucine-rich repeat”) e o domínio intracelular C terminal, chamado TIR, que possui homologia com o domínio intracelular do receptor para IL-1 (IL-1R), chamado de domínio TIR (49). Os TLR podem estar ligados à membrana plasmática ou associados a vesículas

endossomais e retículo endoplasmático, podendo reconhecer PAMPs provenientes de bactérias, vírus, protozoários e fungos. Dentro destes ligantes os mais bem caracterizados são: os peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, zimozan presente em fungos (ligantes de TLR-2), RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR-3), lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante TLR-4), flagelina presente em bactérias móveis (ligante de TLR-5) e sequências de DNA ricas em CpG não metilados, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR-9) (46). A ativação de TLRs por seus ligantes leva à dimerização do receptor e recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, que irão transduzir o sinal, levando à ativação de quinases e fatores de transcrição, como o NF- κ B (“Nuclear factor kappa enhancer binding protein”) e IRFs (“IFN-responsive factors”), além de sinergizarem com outros receptores da resposta imune inata, sendo esta interação importante para a condução da resposta imune adaptativa (44,46).

A família dos NLRs é caracterizada pela presença de 3 domínios funcionais: um domínio central de oligomerização (NACHT), um domínio C-terminal LRR, que confere o reconhecimento do ligante e um domínio N-terminal de transdução do sinal, podendo conter domínios CARD (“Caspase activation and recruitment domain”), ou PYD (pyrin domain) ou BIR (“Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat”) (50). De acordo com os domínios N-terminais variáveis, os NLRs podem ser classificados como NLRA contendo um domínio transativador ácido; NLRB ou proteínas neuronais inibidores de apoptose (NAIPs) com domínio BIR; NLRCs que possuem um domínio CARD; NLRPs contendo domínio PYD.(51). Esses domínios são fundamentais para a indução de respostas imunes específicas. Parte dos NLRs (NOD 1 e NOD 2) são conhecidos por induzirem respostas imunes dependente da ativação de NF- κ B (50) Os NLRs que possuem domínio CARD conseguem recrutar e ativar caspase-1, no entanto os NLRs que possuem outros domínios necessitam de outras moléculas para induzir a ativação da caspase-1(50). Os membros dos NLRs capazes de ativar caspases foram denominados inflamassomas (52)

1.5 Ativação do Inflamassoma

Inflamassomas são complexos proteicos intracitoplasmáticos que medeiam a maturação de caspases pró-inflamatórias, as quais levam à ativação de citocinas pró-inflamatórias (53). Podemos citar dentre os inflamassomas: NLRP1, NLRP3

(também chamados de Nalp1 e Nalp3), NAIP, NLRC 4 (também chamado de Ipaf) e AIM2, que apesar de não pertencer à família dos NLRs também é capaz de formar o complexo inflamassoma e ativar caspase-1 (54). Como os inflamassomas NLRP3 e AIM 2 possuem o domínio N-terminal PYD, estes não conseguem ativar diretamente caspase-1, sendo necessário recrutar a molécula adaptadora ASC, via seu domínio PYD. ASC contém um domínio CARD que se liga e recruta pró-caspase-1, via interações CARD-CARD (55). Por outro lado, os inflamassomas NLRP1 e NLRC4 possuem domínio N-terminal do tipo CARD, podendo recrutar ASC ou interagir diretamente com a pró-caspase-1, via interações CARD-CARD (56)

A ativação canônica de ativação do inflamassoma requer um passo inicial (*senal 1*, usualmente mediado por TLRs ou receptores de citocinas pró-inflamatórias) que desencadeia a formação/disponibilidade dos NLR, em especial a isoforma NLRP3 (receptor do tipo NOD com domínio pirina 3), seguida da sensibilização pelos DAMPs (*senal 2*), os quais induzem a oligomerização e formação dos inflamassomas, formados pelos NLRP3, pro-caspase 1 e uma proteína adaptadora, a ASC (“proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD”), a qual contém um domínio de recrutamento e ativação da caspase (50,52,53,57). Uma vez formados, os inflamassomas promovem a ativação de várias citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, a Interleucina-1 β [IL-1 β] e a IL-18) a partir de seus precursores inativos (pró-IL-1 β e pró-IL-18), desencadeando o processo inflamatório (58) (Figura 1).

Figura 1 – ativação do NLRP3 inflamassoma. Fonte: Haitao Guo, 2015.

Além disso, trabalhos recentes mostram que caspase-8 e caspase-11 também podem levar à formação de inflamassoma. Caspase-8 pode interagir com o inflamassoma NLRP3 modulando suas funções efetoras (60). Além disso, uma via de ativação não-canônica do inflamassoma envolvendo caspase-11, mostra que esta é importante em infecções com patógenos provenientes de bactérias Gram-negativas, como o lipopolissacarídeo de membrana dessas bactérias, que ganha acesso ao citosol da célula infectada e ativa caspase-11 independentemente de TLR-4, levando à ativação da capacidade proteolítica destas, e então ao processamento de IL-1 β numa via dependente de caspase-1 ou independente de caspase-1 (54,61). Com isso podemos ver que existem diversas formas de ativação do inflamassoma. Além do processamento e maturação de citocinas, a ativação de caspase-1 e caspase-11 como resultado da ativação dos inflamassomas mostrou-se importante para um tipo de morte celular induzida por infecção, denominado piroptose (54).

Entre as DAMPs capazes de desencadear a formação dos inflamassomas citam-se o aumento da concentração de ROS, de ATP extracelular, do ácido úrico, colesterol, sílica, de proteínas malformadas (62) e mesmo da HMGB1 ("high mobility group box-1"), uma proteína nuclear que normalmente interage com o DNA

regulando a transcrição gênica, mas quando presente no citoplasma ou no meio extracelular desencadeia o processo inflamatório (62,63). Várias destes DAMPs encontram-se presentes na hipertensão como demonstrado por trabalhos de nosso e outros grupos (21,63,64). É, portanto, bastante provável que a inflamação crônica na hipertensão (assim como em outras doenças crônicas) seja desencadeada pela formação/ativação de inflamassomas. De fato, níveis elevados de IL-1 β , IL-18 assim como TNF α e IL-6 tem sido descritos na doença renal crônica, e na hipertensão espontânea (SHR, o melhor modelo experimental da hipertensão primária) (63,65). Além disso, recentemente nosso grupo demonstrou que no PVN de SHR na fase crônica da hipertensão ativação da micróglia, aumento do estresse oxidativo, aumento da expressão da ERK1/2, a ativação do NF- κ B e o aumento da síntese de IL-6 e TNF α (63) .

Em conjunto estas observações sugerem que a hipertensão possa estar associada à ativação de inflamassomas. No entanto, nenhum estudo investigou diretamente se a hipertensão se encontra ou não associada à ativação de inflamassomas no SNC. Esta é uma das hipóteses deste projeto e um dos objetivos de nosso estudo.

1.6 Treinamento aeróbio na hipertensão arterial

Sabe-se a alguns anos que prática de atividade física regular vem sendo aconselhado como uma maneira não farmacológica de melhora na qualidade de vida. Em indivíduos hipertensos, um programa de treinamento aeróbio regular mostra-se eficaz na redução da PA sistólica (PAS) em 8 mmHg e na PA diastólica (PAD) em 5 mmHg (66). Dentre os diversos mecanismos envolvidos nessa redução dos valores de pressão arterial, vem sendo mostrado que o remodelamento arteriolar eutrófico, a redução do componente simpático para vasos, rins e coração, acompanhada pelo aumento da atividade parassimpática e da sensibilidade barorreflexa e quimiorreflexa são de grande importância (63,67–72). Diversos trabalhos do grupo da Dra. Lisete C. Michelini vem demonstrando o importante papel do treinamento aeróbio na redução da excitabilidade de neurônios pré-motores simpáticos no PVN (73) e aumento da densidade das projeções ocitocinérgicas do PVN ao complexo NTS-DMV (14,71,74–78), contribuindo assim para o aumento da atividade vagal, e conseqüentemente, para a redução da FC de repouso e aumento da sensibilidade do controle barorreflexo cardíaco. Trabalhos recentes de nosso

grupo mostra que o treinamento foi capaz de reduzir simultaneamente no PVN a ativação da micróglia, a expressão da NADPH oxidase e a formação de ROS, a fosforilação da ERK1/2 e a translocação de NF- κ B ao núcleo e a formação de citocinas pró-inflamatórias (63,64), o que corrobora com estudos onde mostra-se redução do SRA cerebral e PICs no PVN (63,79,80), BVLr (79,81) e NTS (82) em animais treinados.

Baseado nessas observações é também nossa hipótese de trabalho que o treinamento possa corrigir os déficits do controle cardiovascular por modular a ativação de inflamassomas.

2 OBJETIVOS

Assim, utilizando o modelo experimental de hipertensão arterial espontânea (SHR) em ratos adultos (3 meses de idade) e seus controles Wistar Kyoto (WKY), pareados por idade e sexo, o trabalho foi teve 2 objetivos principais:

1. Investigar em SHR na fase crônica da hipertensão e seus controles normotensos a presença e/ou atividade de inflamassomas no PVN através da expressão gênica e/ou proteica de seus diferentes constituintes (NLRP3, ASC, Pro-caspase-1, Pró-caspase-8, Pró-caspase-11), assim como a expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-18 e TNF α), correlacionando-os com os níveis de pressão arterial;
2. Identificar nos SHR e WKY os efeitos de quatro semanas de treinamento ou sedentarismo sobre os parâmetros funcionais e balanço autonômico ao coração, bem como sobre a expressão gênica e proteica de inflamassomas e do perfil inflamatório no PVN.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e desenho experimental

Ratos SHR e WKY SPF, machos, com 1 mês de idade vindos do Biotério de Produção de Ratos do ICB foram mantidos (3-4 ratos/caixa) no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica com temperatura e ciclo claro/escuro controlados, e livre acesso à ração e água. SHR e WKY adultos (90 dias) foram alocados aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S). Os procedimentos descritos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (protocolo número 003/15 – aprovado em 12/02/15).

3.2 Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais

Na 11ª semana de vida, os animais todos os grupos passaram pelo processo de adaptação à esteira ergométrica (Millenium, Inbramed, adaptada para ratos), 10 minutos por dia. A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada indiretamente através do teste de esforço máximo durante exercício escalonado em esteira ergométrica no quinto dia de adaptação à esteira. O teste era iniciado com uma velocidade de 0,3 km/h seguida de incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal. Estes testes foram realizados no início (90 dias de vida) e ao final dos protocolos experimentais, possibilitando, respectivamente, a determinação da intensidade do treinamento e a quantificação do ganho no desempenho aeróbio ao final das 4 semanas experimentais.

3.3 Protocolo de Treinamento Aeróbio ou Sedentarismo

Após o período inicial de adaptação à esteira, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento que consistiu de corrida em esteira, 1 hora/dia, 5 dias/semana com intensidade de 50-60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço máximo. Os ratos alocados aos grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo e realizaram os testes de esforço máximo nos mesmos tempos experimentais. Ao final do protocolo de 4 semanas de T ou S foi realizado um novo teste de esforço.

3.4 Mensuração da PA e FC basais

Ao final dos protocolos os ratos foram anestesiados (cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), ip. para implantação de cânulas arterial e venosa (artéria e veia femorais) que foram fixadas e exteriorizadas no dorso do animal. A PA e FC foram continuamente monitoradas no dia subsequente por um período de 30-40 minutos em ratos conscientes, após o cessar da atividade exploratória do animal.

3.5 Análise espectral da PA e FC

Aquisição contínua dos sinais de PA e FC permitiu a obtenção de séries temporais para análise da variabilidade da PA sistólica e do intervalo de pulso (variabilidade da FC), bem como de seus respectivos componentes espectrais de alta (indicador da atividade parassimpática) e baixa frequência (indicador da atividade simpática). Esta análise foi realizada no *software* Matlab 6.0 R2013a, através de uma rotina específica para este *software*.

3.6 Obtenção dos tecidos encefálicos

Após os estudos funcionais, os ratos foram anestesiados profundamente e, imediatamente após a parada respiratória, perfundidos via transcardíaca com solução salina para a remoção total do sangue. O encéfalo foi rapidamente removido e mantido em gelo para obtenção de fatias coronais espessas (1 mm) do hipotálamo, permitindo o isolamento do PVN, através de microdissecção dessas regiões. Os tecidos obtidos foram colocados em eppendorfs estéreis e armazenados em freezer -80°C para processamento posterior.

3.7 RT-PCR em tempo real

- Extração do RNA

O RNA total foi extraído (TRIzol®) de acordo com as recomendações do fabricante. Após precipitação e lavagem do RNA total, foram feitas leituras da concentração de RNA obtida, usando o aparelho NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop, EUA).

- Síntese de cDNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) incubamos 1 μg do RNA total no tampão DNase I Reaction Buffer (Cat. Nº 18068-015, Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo recomendações do fabricante. A seguir foi feita a inibição da DNase com 1

μ L EDTA 20mM (Invitrogen, California, EUA) e incubados a 65 °C por 10 minutos. Para transcrição reversa foi usado kit Impron II transcriptase reversa (Cat. Nº A3800, Promega, Wisconsin, EUA) seguindo recomendações do fabricante. Para a síntese do DNA complementar também foram utilizados primers randômicos (Random Primers Cat. Nº 48190-011, Invitrogen, Califórnia, EUA) e dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados Cat. Nº 10297-018, Invitrogen, Califórnia, EUA) e RNase OUT (Cat. Nº 10777-019, Invitrogen, Califórnia, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C.

- PCR em tempo real

A tabela 1 mostra os primers utilizados. Utilizamos Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) como gene normalizador.

Tabela 1 - primers utilizados para PCR

Primer	Sequência	Eficiência (%)
GAPDH	Sense: AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT Antisense: CTT GCC GTG GGT AGA GTC AT	116
NLRP3	Sense: TGG TCA AGG AGC ATC CAA GCA Antisense: AAG TGT TCA TCC TCA GGC TCA AA	102
ASC	Sense: CCC ATA GAC CTC ACT GAT AAA C Antisense: AGA GCA TCC AGC AAA CCA	109
CASPASE-1	Sense: GAG CTT CAG TCA GGT CCA TCA Antisense: GCG CCA CCT TCT TTG TTC AG	115
CASPASE-8	Sense: CTG GGA AGG ATC GAC GAT TA Antisense: TGG TCA CCT CAT CCA AAA CA	91
CASPASE-11	Sense: CAC AGT GCG AAA GAA CTG AGG Antisense: CTG TAA GGA ACT CTT TGC CCA G	99
TLR4	Sense: TCA CAA CTT CAG TGG CTG GA Antisense: TCC TGG GGA AAA ACT CTT GA	108
IL-18	Sense: CAA CCG CAG TAA TAC GGA GCA Antisense: TCT GGT CTG GGA TTC GTT GG	84
IL-1 β	Sense: TCG TGC TGT CTG ACC CAT GT Antisense: ACA AAG CTC ATG GAG AAT ACC ACT T	103
TNF- α	Sense: CTG TGC CTC AGC CTC TTC TC Antisense: ACT GAT GAG AGG GAG CCC AT	112

Utilizamos o protocolo estabelecido em nosso laboratório em reação para 10 μL , logo 1 μL de cDNA concentrado, 0,5 μL de primer sense (10 μM), 0,5 μL de primer antisense (10 μM), 5 μL do Master Mix GoTaq qPCR (Cat. Nº A6001/2, Promega, Madison, EUA) complementando com 3 μL de água DEPC. A amplificação foi realizada em aparelho ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystem, EUA). As condições de amplificação foram as seguintes: 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto seguido pela curva de Melting.

Para análise, uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para se determinar a expressão gênica, em relação ao controle GAPDH (gene constitutivo). Dessa maneira, níveis arbitrários de RNAm foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. Para cada amostra, os valores (CT) dos genes alvo foram normalizados e o valor para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo foi calculado utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (previamente descrita por K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector User Bulletin 2). No grupo controle o valor da expressão relativa considerado foi igual a 1.

3.8 Quantificação de citocinas por método Multiplex

As amostras utilizadas foram provenientes do PVN dos diferentes grupos experimentais e o protocolo consiste da incubação da amostra com a amostra de microesferas Milliplex® MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Panel (Catálogo nº RECYTMAG-65K, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) cobertas com anticorpos por 2 horas; dupla lavagem com Wash Buffer; incubação com anticorpos de detecção por 1 hora; seguida de incubação com estreptavidina marcada com ficoeritrina por 30 minutos; após duas lavagens em Wash Buffer é adicionado Drive Fluid e as microesferas foram então identificadas por meio da ficoeritrina utilizando-se o instrumento Magpix® (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Após a leitura, os valores de cada citocinas foram relativizados pela concentração de proteína total, determinadas por leitura usando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Catálogo nº 23227, Thermo scientific, USA).

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos são apresentados como média $\pm$ EPM. Para todas as análises utilizamos ANOVA de 1 fator (condição). O teste *post hoc* foi de *Tuckey*,

com nível de significância de $P < 0,05$, utilizando o software STATISTIC 7.0 (Stat Soft Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da hipertensão sobre os constituintes do inflamassoma

Avaliamos nos mesmos animais os efeitos da hipertensão sobre parâmetros funcionais e sobre a expressão dos diferentes constituintes do inflamassoma. Para tanto ratos adultos (90 dias de idade) normotenso (Wistar Kyoto, WKY) e espontaneamente hipertenso (SHR) foram cronicamente cateterizados para avaliação hemodinâmica em repouso. Analisamos em ambos os grupos os valores basais de pressão arterial (pulsátil e média) e frequência cardíaca, a variabilidade da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso, assim como seus componentes espectrais (Tabela 2, Figuras 1-3).

Tabela 2 - Valores basais absolutos de PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min) e valores dos componentes espectrais da PAS e frequência cardíaca (quantificada pelo intervalo de pulso, IP) dos ratos adultos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

	WKY S0	SHR S0
FC (b/min)	306 ± 6,54	364 ± 5,45 *
PAS (mmHg)	123 ± 2,44	189 ± 4,07 *
PAD (mmHg)	95 ± 1,67	143 ± 6,17 *
PAM (mmHg)	107 ± 1,50	163 ± 2,98 *
Var PAS (mmHg ²)	33,17 ± 3,86	68,57 ± 7,76 *
LF-PAS (mmHg ²)	2,90 ± 0,43	16,13 ± 2,67 *
VLF-PAS (mmHg ²)	14,46 ± 1,90	31,05 ± 4,26 *
Alpha LF (ms ² /mmHg ²)	1,42 ± 0,17	0,48 ± 0,04 *
Var IP (ms ²)	118,2 ± 11,27	80,30 ± 10,50 *
LF-IP (ms ²)	4,02 ± 0,35	3,61 ± 0,66
HF-IP (ms ²)	22,02 ± 2,43	12,37 ± 1,50 *
Razão LF/HF	0,19 ± 0,02	0,29 ± 0,03 *

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média; WKY n = 9-11 e SHR n = 10-13 ratos/grupo. WKY, ratos Wistar Kyoto; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; Var-PAS, variabilidade da PAS; LF-PAS, componente simpático periférico; VLF-PAS, componente hormonal; alpha LF, cálculo do barorreflexo espontâneo; Var-IP, variabilidade do IP; LF-IP, indicativo da atividade simpática ao coração; HF-IP, indicativos da atividade parassimpática ao coração; Significâncias ($P < 0,05$), * vs WKY;

Figura 2 – SHR apresentam taquicardia de repouso e hipertensão estabelecida

Comparação dos valores de (A) FC (b/min) e (B) PAM (mmHg) de ratos adultos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). WKY n = 9-12/grupo Significâncias ($p < 0,05$), * vs WKY.

Observamos que SHR adultos na fase crônica da hipertensão apresentam valores significativamente aumentados de PAM e FC quando comparados aos seus controles normotensos pareados por idade (Tabela 2 e Figura 2).

Foram analisados também a variabilidade da PAS (Var-PAS) e seus componentes espectrais de baixa frequência (LF, indicativo do simpático vasomotor), de muito baixa frequência (VLF, indicativo de variações hormonais/circadianas) e a sensibilidade barorreflexa espontânea (calculada pelo índice alpha LF, utilizando os componentes LF do IP e LF da PAS, em séries temporais de pressão (Tabela 2 e Figura 3). Observamos que o grupo hipertenso apresentou valores significativamente aumentados da variabilidade da PAS, assim como de seus componentes LF e VLF, quando comparados aos WKY pareados por idade. Observamos também que o barorreflexo espontâneo dos SHR encontrava-se reduzido em relação aos WKY.

Figura 3 – A hipertensão espontânea caracteriza-se por elevada atividade vasomotora, maior modulação hormonal e reduzida sensibilidade barorreflexa

Comparação dos componentes espectrais da variabilidade da pressão arterial sistólica (A, Var-PAS) e seus componentes de baixa frequência (B, LF-PAS) e muito baixa frequência (C, VLF-PAS) e cálculo do barorreflexo espontâneo (D, alpha LF) de WKY e SHR adultos. n = 9-13 ratos/grupo. Significâncias (P<0,05), * vs WKY.

Análise espectral em séries temporais do intervalo de pulso (IP) também mostraram (Tabela 2 e Figura 4) redução significativa na variabilidade da FC nos hipertensos, a qual foi acompanhada de inalteração do atividade simpática cardíaca, mas importante redução da atividade parassimpática ao coração, determinando aumento significativo do balanço simpato-vagal ao coração na fase crônica da hipertensão espontânea, como demonstrado pela razão LF/HF.

Figura 4 – A hipertensão espontânea caracteriza-se pelo desequilíbrio simpato-vagal ao coração

Comparação dos componentes espectrais da variabilidade do IP (A, Var-IP) e seus componentes de baixa frequência (B, LF-IP) e alta frequência (C, HF-IP) e cálculo da razão entre ambos (D, LF/HF). n = 9-13 ratos/grupo. Significâncias (P<0,05), * vs WKY.

A literatura recente tem mostrado que SHR na fase crônica da hipertensão apresentam inflamação de baixo grau (“low-grade inflammation”) exibindo em áreas de controle autonômico, como o PVN, ativação de receptores TLR4 e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (38,83). Para confirmarmos o perfil inflamatório e avaliarmos o possível envolvimento do inflamassoma na mediação deste efeito, SHR e seus controles normotensos foram, após os registros funcionais, profundamente anestesiados para a obtenção do tecido cerebral (imediatamente após a parada respiratória) e análise da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma, receptores TLR-4 e citocinas pró-inflamatórias no PVN. Além disto, como controle positivo da inflamação e para confirmarmos o envolvimento dos receptores TLR-4 neste processo, ratos normotensos foram também tratados com

LPS (grupo WKY + LPS). Os resultados são apresentados na Tabela 3 e comparados na Figura 5.

Tabela 3 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma, receptores TLR4 e de proteínas pró-inflamatórias no PVN de WKY e SHR

Gene	WKY	WKY LPS	SHR
NLRP3	1,02 ± 0,10	3,77 ± 0,70 *	2,02 ± 0,93
ASC	1,18 ± 0,34	3,42 ± 1,25	7,53 ± 3,70
CASPASE-1	1,04 ± 0,14	5,18 ± 1,43 *	1,45 ± 0,36
CASPASE-8	1,05 ± 0,17	3,77 ± 1,89 *	1,75 ± 0,52
CASPASE-11	1,02 ± 0,11	5,22 ± 1,28 *	1,73 ± 0,86
TLR-4	1,92 ± 1,03	7,17 ± 0,96 *	9,55 ± 1,69 *
IL-18	1,02 ± 0,12	3,84 ± 1,89 *	1,07 ± 0,36
IL-1β	1,19 ± 0,31	348,42 ± 142,98 *	11,67 ± 3,20
TNF-α	0,97 ± 0,37	187,17 ± 58,36 *	103,93 ± 24,36

Valores são médias ± erro padrão da média. NLRP3, receptor do tipo NOD com domínio pirina 3; ASC, proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD; TLR-4, receptor do tipo Toll 4; IL-18, interleucina 18; IL-1 β , interleucina 1 beta; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa. Valores normalizados pelo gene endógeno GAPDH, n = 4-5 ratos/grupo. Significâncias (P<0,05), * vs WKY.

Figura 5 – SHR apresentam ativação de TLR4 e NLRP3 e perfil inflamatório

Comparação do conteúdo de RNAm dos componentes do inflamassoma (A) NLRP3, ASC e Caspase1; de diferentes caspases (B), das citocinas pró-inflamatórias (C) IL1 β , TNF α e IL-1 e do receptor do tipo Toll 4 (D) no núcleo paraventricular (PVN) de WKY e SHR. n = 4-5 ratos/grupo. Significâncias (p<0,05), * vs WKY S0.

Nossos resultados mostraram que o PVN dos SHR, quando comparados aos WKY, apresentava elevada expressão de TLR4 (5 vezes), NLRP3 (2 vezes), ASC (6,4 vezes), Caspases 1, 8 e 11 (1,4 a 1,7 vezes), de IL-1 β (9,8 vezes) e TNF- α (107 vezes), mas não de IL-18 (Tabela 3 e Figura 5). No entanto, devido à grande variabilidade, alterações significativas foram observadas apenas na expressão de TLR-4. Por sua vez, o tratamento dos WKY com LPS determinou nos normotensos aumentos significativos dos receptores TLR4 (3,7 vezes) e NLRP3 (3,7 vezes), caspases 1 e 11 (5 e 5,1 vezes), assim como das citocinas IL-1 β (292 vezes) e TNF- α (193 vezes) (Tabela 3 e Figura 5).. Estes dados sugerem a participação do inflamassoma, via TLR4 e NOD-like receptor, na mediação das respostas inflamatórias no PVN de SHR.

Analizamos também a expressão proteica da IL-1 beta no PVN dos SHR e WKY, utilizando a técnica Multiplex, e mostramos que o conteúdo desta citocina

encontrava-se ligeiramente elevada no PVN dos SHR (1,3 vezes vs. WKY), mas sem diferença estatística (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4 – Expressão proteica de IL-1 β no PVN de WKY e SHR

	WKY	SHR
IL-1β (pg/mg)	18,34 $\pm$ 2,34	20,75 $\pm$ 2,26

Valores são médias $\pm$ erro padrão da média. WKY n = 4, SHR n = 6. IL-1 β , interleucina 1 beta. Significâncias (P<0,05), * vs WKY

Figura 6 - SHR e WKY não apresentam diferença no conteúdo proteico de IL-1 β

Comparação do conteúdo proteico de IL-1 β no PVN de WKY e SHR. WKY n = 5, SHR n = 6. Significâncias (p<0,05), * vs WKY

4.2 Efeito do treinamento sobre os constituintes do inflamassoma

Avaliamos também os efeitos do treinamento sobre a modulação da expressão do inflamassoma no PVN de WKY e SHR adultos que foram submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) por quatro semanas.

Desde o início dos protocolos SHR apresentaram melhor desempenho que os WKY, evidenciado pelos valores do teste de esforço máximo inicial (dados mostrados na Tabela 5 e Figura 7). O treinamento aeróbio promoveu melhora significativa de desempenho em ambos os grupos quando comparados a seus valores iniciais, com ganho de desempenho (diferença entre as velocidades obtidas no teste de esforço da quarta semana e primeira semana) similar entre os grupos, ou seja, $+0,51 \pm 0,12$ km/h e $+0,56 \pm 0,05$ km/h para WKY-T4 e SHR-T4,

respectivamente (Tabela 5 e Figura 7). Já o sedentarismo promoveu redução de desempenho em ambas as linhagens ($-0,19 \pm 0,03$ km/h e $-0,28 \pm 0,09$ km/h para WKY-S4 e SHR-S4, Tabela 5 e Figura 7), com perda de desempenho significativa apenas nos SHR-S4 quando comparados a seus valores na semana zero.

Tabela 5 - Valores dos testes de esforço máximo nas semanas 0 e 4 dos grupos WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

	WKY S0	WKY S4	WKY T4	SHR S0	SHR S4	SHR T4
Veloc. (Km/h)	$0,98 \pm 0,65$	$0,79 \pm 0,09$	$1,47 \pm 0,11$ †	$1,41 \pm 0,03$ *	$1,13 \pm 0,11$ #	$1,97 \pm 0,04$ †

Valores são médias $\pm$ erro padrão da média. WKY-S0 n = 23; WKY-S4 n = 11; WKY-T4 n = 11; SHR-S0 n = 26; SHR-S4 n = 13; SHR-T4 n = 14. Significâncias ($P < 0,05$) * vs WKY-S0; # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 7 – Apesar do melhor desempenho dos SHR, o ganho induzido pelo treinamento é similar em ambos os grupos

Evolução temporal no desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço em Km/h) de WKY e SHR ao longo dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). WKY-S0 n = 23; WKY-S4 n = 11; WKY-T4 n = 11; SHR-S0 n = 26; SHR-S4 n = 13; SHR-T4 n = 14. Significâncias ($P < 0,05$) * vs WKY S0; # vs semana 0; † vs sedentário

Ao analisarmos os parâmetros cardiovasculares na situação basal observamos que o treinamento foi acompanhado em ambos os grupos de instalação da bradicardia de repouso, um importante marcador da eficácia do treinamento:

houve reduções significativas da FC de repouso dos SHR-T4 e WKY-T4 quando comparados a seus respectivos controles (valores nas Tabelas 6 e 7 e Figura 7). Além disso, o treinamento foi também eficaz em bloquear a taquicardia de repouso característica dos hipertensos espontâneos sedentários (Tabela 7 e Figura 8). Não obstante, o treinamento por 4 semanas não determinou redução da PAM em nenhum dos grupos experimentais.

Tabela 6 - Valores basais absolutos de PA média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min), da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) e seus componentes espectrais nos grupos WKY treinados (T) e sedentários (S) durante as 4 semanas experimentais..

	WKY S0	WKY S4	WKY T4
FC (b/min)	306 ± 6,54	328 ± 7,53	288 ± 6,53 †
PAM (mmHg)	107 ± 1,50	107 ± 1,00	110 ± 1,64
Var PAS (mmHg ²)	33,17 ± 3,86	33,60 ± 3,11	29,66 ± 2,43
LF-PAS (mmHg ²)	2,90 ± 0,43	3,01 ± 0,52	2,94 ± 0,48
VLF-PAS (mmHg ²)	14,46 ± 1,90	13,10 ± 1,92	13,84 ± 3,58
Alpha LF (ms ² /mmHg ²)	1,42 ± 0,17	1,25 ± 0,18	1,40 ± 0,23
Var IP (ms ²)	118,2 ± 11,27	140,35 ± 15,36	194,03 ± 29,38 #
LF-IP (ms ²)	4,02 ± 0,35	3,46 ± 0,64	3,66 ± 0,49
HF-IP (ms ²)	22,02 ± 2,43	23,62 ± 2,87	22,53 ± 3,47
Razão LF/HF	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; Var-PAS, variabilidade da PAS; LF-PAS, componente simpático periférico; VLF-PAS, componente hormonal; alpha LF, barorreflexo espontâneo; Var-PI, variabilidade do IP; LF-IP, componente simpático ao coração; HF-IP, componente parassimpático ao coração; LF/HF, balanço simpato-vagal. WKY S0 n = 9-11; WKY S4 n = 8-9; WKY T4 n = 9-10. Significâncias (P<0,05), # vs semana 0; † vs sedentário.

Tabela 7 - Valores basais absolutos de PA média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, b/min), da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) e seus componentes espectrais nos grupos SHR treinados (T) e sedentários (S) durante as 4 semanas experimentais.

	SHR S0	SHR S4	SHR T4
FC (b/min)	364 ± 5,45	347 ± 6,29	332 ± 5.39 #
PAM (mmHg)	163 ± 2,98	169 ± 4,15	170 ± 3,20
Var PAS (mmHg ²)	68,57 ± 7,76	106,87 ± 16,46 #	84,82 ± 3,62
LF-PAS (mmHg ²)	16,13 ± 2,67	24,75 ± 4,73	17,15 ± 1,79
VLF-PAS (mmHg ²)	31,05 ± 4,26	54,12 ± 10,19 #	39,29 ± 1,93
Alpha LF (ms ² /mmHg ²)	0,48 ± 0,04	0,41 ± 0,05	0,58 ± 0,07
Var IP (ms ²)	80,30 ± 10,50	80,32 ± 9,72	143,51 ± 14,51 †#
LF-IP (ms ²)	3,61 ± 0,66	3,57 ± 0,67	4,53 ± 0,63
HF-IP (ms ²)	12,37 ± 1,50	9,83 ± 0,85	13,16 ± 1,39
Razão LF/HF	0,29 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,30 ± 0,02

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; Var-PAS, variabilidade da PAS; LF-PAS, componente simpático periférico; VLF-PAS, componente hormonal; alpha LF, barorreflexo espontâneo; Var-IP, variabilidade do IP; LF-IP, componente simpático ao coração; HF-IP, componente parassimpático ao coração; LF/HF, balanço simpato-vagal. SHR S0 n = 11-13; SHR S4 n = 10-12; SHR T4 n = 9-12. Significâncias (P<0,05), # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 8 - Treinamento reduziu a taquicardia de repouso de ambas as linhagens

Comparação dos valores de (A) FC (b/min) e (B) PAM (mmHg) de WKY e SHR adultos submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) por 4 semanas. Significâncias ($P < 0,05$), # vs semana 0; † vs sedentário.

A análise da variabilidade e dos componentes espectrais da PAS (Tabela 6, Figura 8) mostrou que nos WKY nenhuma mudança ocorreu durante as 4 semanas experimentais nos ratos treinados ou mantidos sedentários. Interessante observar-se que embora nenhuma alteração de PAM tenha sido detectada nos SHR-T4 vs. SHR-S4, o sedentarismo foi acompanhado de importante aumento da variabilidade da PAS (+56% vs. SHR-S0), efeito este que foi completamente bloqueado pelo treinamento (valores na Tabela 7 e Figura 8^a). A elevação idade-dependente da Var PAS nos SHR-S4 foi determinada por aumentos da atividade do simpático vasomotor e da modulação hormonal (+53% no LF-PAS e +74% no VLF-PAS,

respectivamente vs. valores na semana 0, Tabela 7 e Figura 8B e 8C), parâmetros estes que foram completamente normalizados pelo treinamento aeróbio.

Figura 9 – Nos SHR o treinamento impede aumento idade-dependente da Var-PAS

Efeitos do treinamento (T) ou sedentarismo (S) sobre a variabilidade da (A, Var-PAS) e seus componentes espectrais de baixa frequência (B, LF-PAS), muito baixa frequência (C, VLF-PAS) e barorreflexo espontâneo (D, Alpha-LF) nos WKY e SHR submetidos a 4 semanas de treinamento (T) ou sedentarismos (S). Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

Quanto à variabilidade da frequência cardíaca (Var IP) observamos aumentos significativos em ambos os grupos treinados, com resposta de maior magnitude nos SHR: +79% nos SHR-T4, + 38% nos WKY-T4, quando comparados a seus controles sedentários (Tabelas 6 e 7 e Figura 9A). Nos WKY o aumento da Var-IP deveu-se a pequenas oscilações no LF (ligeiro aumento) e HF (ligeira redução), enquanto que nos SHR, paralelamente a ligeiro aumento do LF, houve elevação proporcionalmente maior do HF-IP (+21%, $P > 0,05$, Tabelas 6 e 7, Figuras 9B e 9C). Estas alterações induzidas pelo treinamento evitaram nos SHR-T4 a tendência ao aumento idade-dependente do balanço simpato-vagal ao coração observado nos SHR-S entre as semanas experimentais 0 e 4, como indicado pela razão LH/HF (Figura 9D).

O cálculo da barorreflexo espontâneo (valores do alpha LF nas Tabelas 6 e 7 e Figura 8D) indicou importante redução da sensibilidade dos barorreceptores em corrigir oscilações instantâneas da pressão arterial (SHR-S0 = $0,48 \pm 0,04$ b/min/mmHg; WKY-S0 = $1,42 \pm 0,17$ b/min/mmHg), confirmando o aumento da variabilidade da PAS nos hipertensos. Enquanto nos WKY treinamento e sedentarismo determinaram pequenas oscilações da alpha LF, nos SHR houve uma maior tendência à redução da sensibilidade barorreflexa nos SHR-S4 e visível tendência à elevação do alpha LF nos SHR-T4 (aumento de 21% após 4 semanas de treinamento, quando comparado a seu controle sedentário, $P > 0,0$, Tabelas 6 e 7 e Figura 8D).

Figura 10 – Há maior elevação induzida pelo treinamento da Var-IP nos SHR-T

Efeitos do treinamento (T) ou sedentarismo (S) sobre a variabilidade do IP e seus componentes espectrais de baixa frequência (B, LF-IP), alta frequência (C, HF-IP) e a razão entre ambos (D, LF/HF) nos grupos WKY e SHR. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

Analizamos no PVN dos mesmos ratos os efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão gênica dos diferentes constituintes do inflamassoma e das citocinas pró-inflamatórias (dados nas Tabelas 8 e 9 e Figura 10).

Como ressaltado na seção anterior, os SHR apresentam elevada expressão dos componentes do inflamassoma (NLRP3, ASC e Caspases). Observamos que o treinamento determinou nos SHR-T4 importante redução da expressão gênica do TLR4 e do ASC (-73% e -86% quando comparados com SHR-S0 e -57% e -59% quando comparados com SHR-S4, Figuras 10 e 11), que foram acompanhadas de reduções de menor magnitude do NLRP3 e caspases (quedas médias de -28% e de -47%, respectivamente, em relação a SHR-S0 e/ou SHR-S4, Figuras 11 e 12). Estas respostas refletiram-se na queda da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no grupo SHR-T4 vs. controles sedentários como as observadas para a IL-1 β (-63%), TNF- α (-46%) e IL-18 (-35%) (dados na Figura 13). A expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias no PVN também se mostrava parcialmente reduzida nos SHR-T4 (-34% e -42% para IL-1 β e TNF- α quando comparados aos SHR-S0; -12% e -11% respectivamente quando comparados aos SHR-S4). Por outro lado, o PVN de hipertensos treinados por 4 semanas mostrou tendência a aumento da IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Tabela 10 Figura 14).

Com exceção da elevação da IL-18 nos WKY-S4 vs. WKY-S0 (Figura 13), quase nenhuma alteração na expressão gênica de receptores, ASC, caspases e citocinas foi observada nos WKY submetidos ao mesmo protocolo de treinamento e com ganho similar de desempenho (Figuras 10-13).

Tabela 8 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e citocinas pró-inflamatórias no PVN de WKY submetidos a 4 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Gene	WKY S0	WKY S4	WKY T4
NLRP3	1,02 ± 0,10	1,65 ± 0,40	1,23 ± 0,19
ASC	1,18 ± 0,34	2,22 ± 0,64	1,15 ± 0,63
CASPASE-1	1,04 ± 0,14	1,43 ± 0,21	0,89 ± 0,16
CASPASE-8	1,05 ± 0,17	1,35 ± 0,16	0,94 ± 0,09
CASPASE-11	1,02 ± 0,11	1,33 ± 0,18	0,94 ± 0,11
TLR-4	1,92 ± 1,03	4,35 ± 1,76	4,12 ± 0,68
IL-18	1,02 ± 0,12	1,89 ± 0,39	1,15 ± 0,18
IL-1β	1,19 ± 0,31	2,43 ± 0,53	1,96 ± 0,42
TNF-α	0,97 ± 0,37	25,85 ± 5,10 #	33,32 ± 6,79 #

Valores são médias ± erro padrão da média, normalizados pelo gene endógeno GAPDH. NLRP3, receptor do tipo NOD com domínio pirina 3; ASC, proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD; TLR-4, receptor do tipo Toll 4; IL-18, interleucina 18; IL-1 β , interleucina 1 beta; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa. WKY S0 n = 4-5; WKY S4 n = 3-4; WKY T4 n = 3-4. Significâncias (P<0,05), # vs semana 0; † vs sedentário.

Tabela 9 - Comparação da expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e citocinas pró-inflamatórias no PVN de SHR submetidos a 4 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Gene	SHR S0	SHR S4	SHR T4
NLRP3	2,02 ± 0,93	1,83 ± 0,61	1,33 ± 0,09
ASC	7,53 ± 3,70	2,55 ± 1,00	1,05 ± 0,27
CASPASE-1	1,45 ± 0,36	1,20 ± 0,25	0,89 ± 0,09
CASPASE-8	1,75 ± 0,52	1,76 ± 0,45	0,82 ± 0,21
CASPASE-11	1,73 ± 0,86	1,40 ± 0,44	0,86 ± 0,05
TLR-4	9,55 ± 1,69	5,82 ± 0,94	2,49 ± 0,74 #
IL-18	1,07 ± 0,36	1,09 ± 0,33	0,70 ± 0,04
IL-1 β	11,67 ± 3,20	12,57 ± 4,60	4,49 ± 1,02
TNF- α	103,93 ± 24,36	152,78 ± 9,65	82,81 ± 24,27

Valores são médias ± erro padrão da média, normalizados pelo gene endógeno GAPDH. NLRP3, receptor do tipo NOD com domínio pirina 3; ASC, proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD; TLR-4, receptor do tipo Toll 4; IL-18, interleucina 18; IL-1 β , interleucina 1 beta; TNF, fator de necrose tumoral alfa. SHR S0 n = 4-5; SHR S4 n = 3-4; SHR T4 n = 6-7. Significâncias (P<0,05), # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 11 – Treinamento aeróbio reduz a expressão de TLR-4

Conteúdo de RNAm do TLR-4 no PVN de WKY e SHR T e S. Significâncias (P<0,05) # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 12 – Treinamento aeróbio reduz a expressão de genes da via do inflamassoma NLRP3

Conteúdo de RNAm dos componentes do inflamassoma (A) NLRP3, (B) ASC (C) Caspase1 no PVN de WKY e SHR T e S. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 13 – Treinamento aeróbio diminui a expressão de caspases inflamatórias

Conteúdo de RNAm das caspases (A) Caspase-1, (B) Caspase-8 (C) Caspase-11 no PVN de WKY e SHR T e S. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

Figura 14 - Treinamento aeróbio reduz a expressão de PICs em SHR

Conteúdo de RNAm dos componentes do inflamassoma (A) NLRP3, (B) ASC (C) Caspase-1, (D) caspase-8, (E) caspase-11, (F) TLR-4, (G) IL-18, (H) IL-1 β e (I) TNF- α no PVN de WKY e SHR T e S. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

As reduções observadas na expressão gênica no grupo treinado também foram vistas na expressão proteica, onde podemos observar redução significativa de

TNF- α , bem como aumento em IL-10 em relação ao seu controle por idade (Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10 - Expressão proteica de citocinas no PVN de WKY e SHR

	WKY S0	WKY S4	WKY T4	SHR S0	SHR S4	SHR T4
IL-18 (pg/mg)	298,14 $\pm$ 22,05	276,14 $\pm$ 10,40	245,96 $\pm$ 27,05	210,17 $\pm$ 9,83	185,86 $\pm$ 22,60	179,93 $\pm$ 15,14
IL-1 β (pg/mg)	18,34 $\pm$ 2,34	20,35 $\pm$ 1,98	15,49 $\pm$ 3,60	20,75 $\pm$ 2,26	15,54 $\pm$ 3,60	13,68 $\pm$ 1,62
TNF- α (pg/mg)	0,64 $\pm$ 0,09	0,62 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,10	0,57 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,04 #
IL-10 (pg/mg)	19,57 $\pm$ 1,98	19,36 $\pm$ 2,13	15,61 $\pm$ 3,09	15,39 $\pm$ 2,72	9,54 $\pm$ 0,52	15,97 $\pm$ 1,71

Valores são médias $\pm$ erro padrão da média. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário. WKY S0 n = 5-6; WKY S4 n = 5-6; WKY T4 n = 4-5; SHR S0 n = 6-7; SHR S4 n = 5-6; SHR T4 n = 6-7.

Figura 15 – Treinamento induz redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 em SHR

Conteúdo proteico de citocinas (A) IL-18, (B) IL-1 β (C) TNF- α , (D) IL-10- no PVN de WKY e SHR T e S. Significâncias ($P < 0,05$) # vs semana 0; † vs sedentário.

5 DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho confirmaram observações anteriores do laboratório sobre os déficits autonômicos determinados pela instalação da hipertensão espontânea e sobre a sensível melhora do controle autonômico da circulação induzida pelo treinamento aeróbio, mostrando adicionalmente que:

- 1) a fase crônica da hipertensão, caracterizada por elevado perfil pró-inflamatório em áreas de integração do controle cardiovascular e disfunção autonômica é acompanhada por elevada expressão gênica de diferentes constituintes do inflamassoma NLRP3 no PVN;
- 2) o treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade reduz a disfunção autonômica e determina a instalação da bradicardia de repouso ao mesmo tempo em que reduz a expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e a expressão gênica/proteica de citocinas pró-inflamatórias;
- 3) a ativação da formação do inflamassoma, bem como sua desativação são mediados respectivamente pela maior ou menor ativação dos TLR-4, uma vez que sua expressão gênica é ativada pelo LPS, encontra-se aumentada nos SHR sedentários, mas é bastante reduzida nos SHR submetidos a 4 semanas de treinamento.

A hipertensão crônica caracteriza-se por uma série de alterações funcionais, sendo amplamente mostrado na literatura que o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), quando adultos, apresentam disfunções similares observadas em pacientes hipertensos. Dentre estas, é sabido que indivíduos hipertensos apresentam valores elevados de PA e FC de repouso (84,85), associados à disfunção autonômica, comprovada pela redução da sensibilidade barorreflexa, acompanhada de aumento da atividade simpática vasomotora (LF-PAS), de maior modulação hormonal (VLF-PAS), culminando com aumento da variabilidade da PAS, um importante fator casual para o aparecimento de lesões em órgãos-alvo (23,63,67,69). Sabe-se também que o aumento da variabilidade da pressão encontra-se positivamente correlacionado com o elevado risco de lesões em órgãos alvo como o encéfalo, coração e rins (86). Como ressaltado por Guyenet (2006) (2), os SHR também se caracterizam por alteração do balanço simpato-vagal ao coração. Nossos dados mostrando nos SHR sedentários (vs. controle normotensos)

elevada razão LF/HF ao coração, reduzida variabilidade da FC, aumento do simpático vasomotor e da modulação hormonal da pressão propiciaram aumento significativo da variabilidade da PAS nos hipertensos, a qual se constitui em importante fator prognóstico de morbidade e mortalidade, aumentando a probabilidade de morte súbita em pacientes portadores de doenças cardiovasculares (87,88).

Diversos trabalhos têm também demonstrado que os déficits funcionais de hipertensos são acompanhados de inflamação em áreas encefálicas de controle autonômico da circulação, como o PVN (38,83), o NTS (89) e o BVLr (79). Trabalhos recentes dos grupos dos professores Javier Stern e Joseph Francis suscitaram a importância dos receptores TLR-4 localizados em neurônios e micróglia do PVN, juntamente com receptores tipo 1 de angiotensina II (AT1aR) como importantes reguladores do perfil inflamatório característico de hipertensos, bem como determinantes da maior produção de espécies reativas de oxigênio e da oxidação do HMGB1 (42,43,83). O HMGB1 é uma proteína nuclear que normalmente interage com o DNA e histonas na regulação da transcrição gênica, mas que quando oxidada/reduzida é translocada ao citosol e/ou meio extracelular, onde interage com TLRs e NOD-like receptors, ativando a formação de citocinas pró-inflamatórias (53). Além disso, tem-se também demonstrado cada vez mais a importância da micróglia na produção de citocinas pró-inflamatórias (38) e que os TLR-4 teriam importante papel em sua ativação (42,83).

Sabendo-se que TLR-4, ROS e HMGB1 são ativadores de inflamassoma (59), investigamos a expressão gênica dos componentes clássicos e recentemente descritos do inflamassoma NLRP3, de receptor TLR-4 e das citocinas pró-inflamatórias no PVN de animais controle, estimulados com LPS e os comparamos à expressão dos mesmos nos SHR. Nossos resultados mostraram que o estímulo com LPS intraperitoneal foi eficaz em aumentar a expressão gênica de citocinas e genes de interesse na via do inflamassoma (NLRP3, ASC, Caspase1), sendo interessante ressaltar que este estímulo levou ao aumento não só do ativador clássico desta via, o TLR4, mas também determinou aumento significativo na expressão de caspase-11, via recentemente descrita de estímulo inflamatório pelo LPS intracitoplasmático, independente de TLR-4 (90–92). Chamou-nos atenção a observação de que os SHR apresentaram valores superiores ao grupo normotenso estimulado com LPS na expressão de TLR-4, o que corrobora com os resultados de Dange e colaboradores,

que descreveram que o bloqueio farmacológico do TLR-4 no PVN bilateral de SHR, causava redução significativa da pressão arterial após 4 dias de administração (42), mostrando que esses receptores tem importância para a patologia da hipertensão arterial.

É interessante notar que apesar de não significativos houve, em relação ao controle, aumentos na expressão gênica de todos os constituintes do inflamassoma NLRP3 nos SHR, sugerindo possíveis aumentos também na expressão proteica desta via. Além disso, SHR apresentaram aumento de IL-1 β e TNF- α no PVN, o que no entanto, não se refletiu em elevação significativa do conteúdo proteico de IL-1 β como era esperado, uma vez que trabalhos anteriores já haviam demonstrado aumento dessas citocinas no PVN de hipertensos (38,42). É possível que a técnica escolhida para detecção do conteúdo proteico (o Multiplex), não tenha sido a mais adequada, uma vez que exige a microdissecção de áreas cerebrais, o que além de resultar em quantidades mínimas de tecido (e, portanto, de proteína), pode incluir áreas circunvizinhas ao PVN e não envolvidas no controle cardiovascular, o que pode 'diluir' os resultados obtidos, uma vez que os mesmos são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Para a publicação final do trabalho estamos repetindo a quantificação proteica pela técnica da imunofluorescência, validada por Stern e colaboradores para a quantificação relativa de proteína em tecido cerebral (93). Esta técnica nos fornecerá uma avaliação semi-quantitativa do conteúdo proteico em fatias seriadas do PVN, mas com a vantagem de quantificarmos a densidade e a intensidade dos constituintes do inflamassoma apenas no núcleo de interesse, identificado ao microscópio.

Quanto à expressão da citocina IL-18 no PVN de hipertensos, embora ela tenha sido encontrada em grandes quantidades na circulação sistêmica de indivíduos hipertensos e relacionada a danos vasculares característicos da hipertensão (94), não observamos aumento de sua expressão. Também não é de nosso conhecimento que trabalhos recentes analisando o PVN tenham mostrado aumentos significativos de IL-18 neste núcleo. Trabalhos futuros deverão esclarecer este paradoxo.

Apesar de trabalhos terem demonstrado a importância de inflamassomas em patologias como diabetes tipo-2, Alzheimer e acidente vascular cerebral (95,96), o papel do inflamassoma na hipertensão ainda não está claro. Em trabalho recente foi demonstrado em camundongos hipertensos (hipertensão pelo modelo DOCA-sal)

uma maior expressão renal dos constituintes do inflamassoma, os quais encontravam-se reduzidos nos animais 'knock out' para ASC (97). Em outro trabalho com o modelo de hipertensão dois rins um clipe, observou-se que o inflamassoma NLRP3 era encontrado em grandes quantidades nos rins isquêmicos, e que camundongos 'knock out' para NLRP3 e ASC eram protegidos da hipertensão (98). Pelo nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que tenham investigado a expressão gênica e/ou proteica de inflamassomas no sistema nervoso central de hipertensos sendo, portanto, nosso trabalho pioneiro nessa investigação. Embora não tenhamos achado significâncias em muitas comparações, importantes alterações percentuais foram detectadas entre SHR e WKY, sugerindo que a instalação da hipertensão possa sim estar relacionada ao conteúdo aumentado de inflamassomas no PVN, o que deverá ser confirmado pela análise imuno-histoquímica em curso sobre a ativação de inflamassomas no PVN e a formação de 'punctas' de ASC nesta região do encéfalo de SHR.

O treinamento aeróbio de baixa intensidade vem sendo utilizado como ferramenta não farmacológica eficaz na reversão de déficits cardiovasculares em diferentes patologias, como hipertensão, diabetes, insuficiência cardíaca e síndrome metabólica (20,99). Nesta linha de pesquisa estudos do nosso grupo mostraram que os SHR apresentam melhor desempenho em esteira quando comparados aos WKY pareados por idade (63,69,75,100), o que foi comprovado pelos resultados do presente trabalho. Importante observar que 4 semanas de treinamento foi eficaz em aumentar o desempenho em esteira em relação ao grupo sedentário, com ganhos semelhantes em ambas as linhagens. Por outro lado, os SHR mantidos sedentários mostraram redução da velocidade alcançada no 2º teste realizado após 4 semanas experimentais em relação ao primeiro teste realizado no início dos protocolos, sugerindo ser a instalação da disfunção autonômica progressiva, o que foi realmente confirmado pela alteração de seus valores entre as semanas 0 e 4.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório com SHR treinados têm mostrado melhora significativa do controle autonômico da circulação com 2 semanas de treinamento, mesmo na ausência de redução da PA (63,64). Dados preliminares de nosso projeto, utilizando a linhagem SPF (não mostrados), haviam indicado que SHR treinados por 2 semanas não apresentaram os efeitos benéficos do treinamento sobre o controle autonômico da circulação, ou seja, não mostraram alterações significativas da variabilidade da PAS, do VLF-PAS, do barorreflexo

espontâneo e da variabilidade da FC. Houve apenas pequena redução do LF-PAS (o treinamento impediu o aumento progressivo da atividade do simpático vasomotor observado nos SHR sedentários) e aumento da modulação parassimpática ao coração (HF-IP), as quais haviam sido constatadas nos SHR não SPF após 2 semanas de treinamento (63,64). Estas observações nos sugeriram que os ratos SHR da linhagem SPF, com menor perfil inflamatório que os da linhagem convencional talvez precisassem de um tempo um pouco maior para a instalação dos efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema circulatório. Frente a estas observações e em continuidade ao nosso projeto, estabelecemos para ambas as linhagens SPF, SHR e WKY a duração do treinamento aeróbio em 4 semanas.

Os dados do presente trabalho mostraram que em animais normotensos, o treinamento não produziu grandes alterações nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos, sendo significativo apenas o aumento na variabilidade da frequência cardíaca e a instalação da bradicardia de repouso. Em contraste, o treinamento de 4 semanas nos SHR foi eficaz em se opor à elevada frequência cardíaca basal destes ratos, determinando a instalação da bradicardia de repouso, bem como ligeira redução do balanço simpato-vagal ao coração e do barorreflexo espontâneo. Mostraram também que a variabilidade da frequência cardíaca aumentou consideravelmente nos SHR treinados. Além disto, o treinamento aeróbio impediu o aumento da variabilidade da PAS, a elevação da atividade simpática vasomotora e da modulação hormonal da pressão observada nos SHR sedentários durante as 4 semanas experimentais. Estas observações nos sugerem que os efeitos benéficos do treinamento em linhagens SPF são similares às de linhagens convencionais (63,64,101), mas aparecem mais tardiamente.

A literatura recente tem mostrado o importante papel dos receptores TLR-4 em mediar a indução da inflamação no encéfalo de hipertensos (42,43,83), o que também observamos no PVN de SHR. Sabemos que estes receptores são importantes para a modulação da resposta inflamatória, mas ainda não está claro como participam na indução de inflamação no SNC e como esta inflamação localizada participa de mecanismos celulares que culminam com o aumento da pressão arterial nos hipertensos. Além disso, somos pioneiros em mostrar que o treinamento físico aeróbio de 4 semanas foi capaz de reduzir a expressão gênica de TLR-4 no PVN de SHR, o que sugere a importância desta ferramenta não farmacológica. Nosso trabalho é, portanto, o primeiro a sugerir que a ativação dos

TLR-4 no PVN de SHR assim como sua menor atividade subsequente ao treinamento modulam a produção local de IL-1 β via ativação/desativação do NLRP3 inflamassoma. Trata-se de uma proposição interessante em vias de ser validada pela expressão proteica do TLR4 pela imunofluorescência.

Nos ratos hipertensos observamos também que o treinamento (apesar de várias alterações não terem atingido níveis de significância), levou a reduções percentuais acentuadas nos níveis de RNAm de todos os componentes do inflamassoma e das caspases. Resultados similares foram descritos em trabalho recente com camundongos tratados com dieta rica em gorduras e treinados por 10 semanas (treinamento aeróbico ou de resistência): observou-se queda significativa de NLRP3 no tecido adiposo, apenas o grupo do treinamento de resistência, e, no grupo do treinamento aeróbico observou-se apenas redução das PICs (102). Nossos resultados, utilizando o treinamento aeróbio também identificaram redução de citocinas pró-inflamatórias no PVN, principalmente o TNF- α . Estas observações repetem dados anteriores do laboratório (61) e confirmam a potencialidade do treinamento aeróbio em reduzir o perfil pró-inflamatório no PVN de SHR, sugerindo adicionalmente que a linhagem SPF reduza o perfil inflamatório mais lentamente que a linhagem tradicional (63,64), uma vez que alterações significativas foram observadas apenas após 4 semanas de treinamento. A literatura relata informações sobre o papel do inflamassoma na atividade física apenas em indivíduos obesos, mostrando que o treinamento leva à redução dos constituintes do inflamassoma, principalmente no tecido adiposo (95,103). Não há trabalhos na literatura que tenham investigado os efeitos do treinamento sobre a expressão de inflamassomas no tecido cerebral. Nosso trabalho é, portanto, pioneiro em analisar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a expressão dos diferentes componentes dos inflamassomas em áreas centrais de controle cardiovascular em indivíduos hipertensos. Nossos resultados sugerem que o treinamento é bastante eficaz em reduzir a expressão dos constituintes desta via, o que deverá para a publicação final ser confirmado pela análise da expressão proteica dos diferentes componentes desta via pela imunofluorescência.

6 CONCLUSÃO

A comparação de animais hipertensos e normotensos confirmamos dados anteriores do nosso grupo (63,67,69), ou seja, evidenciamos que os hipertensos se caracterizam por valores aumentados de PA e FC de repouso, associados à disfunção autonômica ao coração e vasos. O estímulo com LPS foi eficaz em ativar as vias de sinalização e evidenciar que o perfil inflamatório de SHR é de menor intensidade em relação a este estímulo, o que foi evidenciado pelo elevado perfil de expressão dos constituintes da via do inflamassoma NLRP3 e citocinas pró-inflamatórias.

O treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade reduz a expressão gênica dos constituintes do inflamassoma e a expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, bem como a disfunção autonômica, além de determinar a instalação da bradicardia de repouso

A ativação do inflamassoma NLRP3 pode ser devido à ativação dos TLR-4, que se encontra aumentada nos SHR sedentários, mas é bastante reduzida nos SHR submetidos a 4 semanas de treinamento.

REFERÊNCIAS *

1. Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *News Physiol Sci*. 1994;9:243–6.
2. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2006;7(5):335–46. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn1902>
3. Chapleau MW, Li Z, Meyrelles SS, Ma X, Abboud FM. Mechanisms determining sensitivity of baroreceptor afferents in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2001;940(1):1–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03662.x> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458669>
4. Sved AF, Ito S, Madden CJ. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain Res Bull*. 2000;51(2):129–33.
5. Schreihofer AM, Guyenet PG. The baroreflex and beyond: Control of sympathetic vasomotor tone by gabaergic neurons in the ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(5–6):514–21.
6. Chan RK, Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci* [Internet]. 1998;18(1):371–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9412514>
7. Michelini LC, O’Leary DS, Raven PB, Nobrega ACL. Neural control of circulation and exercise: translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex and muscle metaboreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;(108):ajpheart.00077.2015.
8. Dampney RAL, Coleman MJ, Fontes MAP, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, et al. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2002. p. 261–8.
9. MICHELINI LC, MORRIS M. Endogenous Vasopressin Modulates the Cardiovascular Responses to Exercise. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1999;897(1 NEUROPEPTIDES):198–211. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07892.x>
10. Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol*. 1988;73(6):811–72.

---

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. sample references. [updated 2016 Nov 16]. Available from: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, van Leeuwen FW. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* 1978;186(3):423–33.
12. Nilaver G, Zimmerman E a, Wilkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman a J. Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology.* 1980. p. 150–8.
13. Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1982;205(3):260–72.
14. Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S, Michelini LC. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension.* 2005;46(4):1004–9.
15. Dufloth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol [Internet].* 1997;273(4 Pt 2):R1271-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362290>
16. Michelini LC, Bonagamba LG. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension.* 1988;11:175–9.
17. Higa-Taniguchi KT, Felix JVC, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Exp Physiol [Internet].* 2009;94(11):1103–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638362>
18. WHO | The top 10 causes of death. World Health Organization; [cited 2016 Jan 12]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/#.VpUDZGRVgl4.mendele>
y
19. Day WH. World Health Day 2013. *A Glob Br Hypertens.* 2013;9.
20. Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, et al. CLINICIAN ' S CORNER The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention , Detection , Evaluation , and Treatment. 2015;289(19).
21. Li JJ, Fang CH, Hui RT. Is hypertension an inflammatory disease? *Med Hypotheses.* 2005;64(2):236–40.
22. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ [Internet].* 2000;321(7255):199–204. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27435&tool=pmcentr ez&rendertype=abstract>
23. Zubcevic J, Waki H, Raizada MK, Paton JFR. Autonomic-Immune-Vascular Interaction: An Emerging Concept for Neurogenic Hypertension. *Hypertension [Internet].* 2011;57(6):1026–33. Available from:

- <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.169748>
24. Singh M V., Abboud FM. Toll-like receptors and hypertension. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2014;307(5):R501–4. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00194.2014>
  25. Kvakan H, Luft FC, Muller DN. Role of the Immune System in Hypertensive Target Organ Damage. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2009. p. 242–6.
  26. Simpson JB. The circumventricular organs and the central actions of angiotensin. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1981;32(4):248–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012657>
  27. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma R V., Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res*. 2004;95(2):210–6.
  28. Ganta CK, Lu N, Helwig BG, Blecha F, Ganta RR, Zheng L, et al. Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(4):H1683–91.
  29. Zhu G-Q, Patel KP, Zucker IH, Wang W. Microinjection of ANG II into paraventricular nucleus enhances cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2002;282(6):H2039-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003809>
  30. Tagawa T, Dampney R a. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension* [Internet]. 1999;34(6):1301–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601134>
  31. Chen A-D, Zhang S-J, Yuan N, Xu Y, De W, Gao X-Y, et al. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol* [Internet]. 2011;96(2):94–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21097645>
  32. Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, Sved AF. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;40(4):552–9.
  33. Matsumura K, Averill DB, Ferrario CM. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. *Am J Physiol*. 1998;275(5 Pt 2):R1611–9.
  34. Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension* [Internet]. 2014;63(3):572–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4080808&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
  35. Colombari E, Colombari DS a, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, et al. Macrophage

- migration inhibitory factor in the paraventricular nucleus plays a major role in the sympathoexcitatory response to salt. *Hypertension* [Internet]. 2010;56(5):956–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3130992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Waki H, Gouraud SS, Maeda M, Paton JFR. Evidence of specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2010;95:595–600.
  37. Kang Y-M, Ma Y, Zheng J-P, Elks C, Sriramula S, Yang Z-M, et al. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2009;82(3):503–12. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvp073>
  38. Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, Qi Y, Katovich MJ, Li Q, et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension* [Internet]. 2010;56(2):297–303. Available from: papers2://publication/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150409
  39. Kannan H, Tanaka Y, Kunitake T, Ueta Y, Hayashida Y, Yamashita H. Activation of sympathetic outflow by recombinant human interleukin-1 beta in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 1996;270(2):R479-485. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/content/270/2/R479>
  40. Ando H, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2004;35(7):1726–31.
  41. Waki H, Liu B, Miyake M, Katahira K, Murphy D, Kasparov S, et al. Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: Evidence for a prohypertensive role within the brain stem. *Hypertension*. 2007;49(6):1321–7.
  42. Dange RB, Agarwal D, Teruyama R, Francis J. Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and infl. 2015;
  43. Biancardi VC, Stranahan AM, Krause EG, de Kloet AD, Stern JE. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(3):H404-15.
  44. Akira S, Akira S, Uematsu S, Uematsu S, Takeuchi O, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* [Internet]. 2006;124:783–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588>
  45. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:353–89.

46. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
47. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;10(12):826–37. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2873>
48. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective [Internet]. *Annual Review of Immunology*. 2015. 257-290 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
49. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in Immunology*. 2007. p. 24–32.
50. Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;
51. Ting JPY, Lovering RC, Alnemri ESPD, Bertin J, Boss JM, Davis B, et al. The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity*. 2008;28(3):285–7.
52. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell*. 2002;10(2):417–26.
53. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* [Internet]. 2014;8(October):1–13. Available from: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fnins.2014.00315/full>
54. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*. 2016;165(4):792–800.
55. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* [Internet]. 2007;14(1):10–22. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=23421179&site=ehost-live>
56. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–65.
57. Lechtenberg BC, Mace PD, Riedl SJ. Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;29:17–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X14001043>
58. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol* [Internet]. 2014;5(September):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00352/abstract>
59. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(7):677–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3893>

60. Man SM, Tzourlomos P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald K a, Bryant CE. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 β production. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(10):5239–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123685>
61. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle L Vande, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;479(7371):117–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10558>
62. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;157(5):1013–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
63. Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PPS, Laurindo FR, et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: Role for Brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One*. 2014;9(5):1–9.
64. Masson GS, Nair AR, Silva Soares PP, Michelini LC, Francis J. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2015;309(7):H1115–22. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00349.2015>
65. Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, Mansell a, Drummond GR. IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol* [Internet]. 2014;171(24):5589–602. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12876>
66. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Heart Association*. 2013.
67. Amaral SL, Michelini LC. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2011;44(9):814–26. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2011000900001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
68. Brum PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrão CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36(6):1018–22.
69. Ceroni A, Charr LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* [Internet]. 2009;94(6):630–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2008.046128>
70. Melo RM, Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003;42(4 II):851–7.
71. Cruz JC, Cavalleri MT, Ceroni A, Michelini LC. Peripheral chemoreceptors mediate training-induced plasticity in paraventricular nucleus pre-autonomic

- oxytocinergic neurons. *Exp Physiol* [Internet]. 2013;98(2):386–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22872656>
72. Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R264–71.
  73. Stern JE, Sonner PM, Son SJ, Silva FCP, Jackson K, Michelini LC. Exercise training normalizes an increased neuronal excitability of NTS-projecting neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in hypertensive rats. *J Neurophysiol* [Internet]. 2012;107(10):2912–21. Available from: <http://jn.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jn.00884.2011>
  74. Braga DC, Mori E, Higa KT, Morris M, Michelini LC. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2000;278(6):R1474-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848513>
  75. Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordao MT, Ceroni a., Michelini LC. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(4):R958–66.
  76. Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(2):R537–45.
  77. Michelini LC. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. *Current Hypertension Reports*. 2007. p. 214–21.
  78. Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*. 2009;94(9):947–60.
  79. Agarwal D, Welsch MA, Keller JN, Francis J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(6):1069–85.
  80. Jia LL, Kang YM, Wang FX, Li HB, Zhang Y, Yu XJ, et al. Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS One*. 2014;9(1):2–9.
  81. Kishi T, Hirooka Y, Katsuki M, Ogawa K, Shinohara K, Isegawa K, et al. Exercise training causes sympathoinhibition through antioxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* [Internet]. 2012;34(4):278–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578069>
  82. Felix JVC, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. In: *Hypertension*. 2007. p. 780–5.

83. Masson GS, Nair AR, Dange RB, Silva-soares PP. Toll-Like Receptor 4 Promotes Autonomic Dysfunction , Inflammation and Microglia Activation in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus : Role of Endoplasmic Reticulum Stress. 2015;1–15.
84. Reule S, PE D. Heart rate and blood pressure: any possible implications for management of hypertension? *Curr Hypertens Rep* [Internet]. 2012;14(6):478–84. Available from: <http://doi.org/10.1007/s11906-012-0306-3>
85. Palatini P. Role of elevated heart rate in the development of cardiovascular disease in hypertension. *Hypertension*. 2011;58(5):745–50.
86. Tatasciore A, Renda G, Zimarino M, Soccio M, Bilo G, Parati G, et al. Awake systolic blood pressure variability correlates with target-organ damage in hypertensive subjects. *Hypertension*. 2007;50(2):325–32.
87. La Rovere MT, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* [Internet]. 1998;351(9101):478–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482439>
88. Villareal RP, Liu BC, Massumi A. Heart rate variability and cardiovascular mortality. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2002;4(2):120–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167108>
89. Waki H, Gouraud SS, Maeda M, Paton JFR. Specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of the SHR: Novel insight for neurogenic hypertension? *Auton Neurosci Basic Clin*. 2008;142(1–2):25–31.
90. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *Science* (80-) [Internet]. 2013;341(6151):1250–3. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/341/6151/1250.abstract>
91. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science* (80-) [Internet]. 2013;341(6151):1246–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/341/6151/1246.abstract>
92. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;514(7521):187–92. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature13683>
93. Higa-Taniguchi KT, Silva FCP, Silva HM V, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(4):R1717–27.
94. Rabkin SW. The role of interleukin 18 in the pathogenesis of hypertension-induced vascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* [Internet]. 2009;6(3):192–9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234499>

95. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;17(2):179–88. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2279>
96. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821–32.
97. Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, Diep H, Chan CT, Ferens D, et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):752–65.
98. Wang A, So A, Nussberger J, Ives A, Bagnoud N, Shaefer S, et al. Renin-Dependent Hypertension in Mice Requires the NLRP3- Inflammasome. *J Hypertens* [Internet]. 2013;3(6):6–11. Available from: <http://omicsgroup.org/journals/renindependent-hypertension-in-mice-requires-the-nlrp-inflammasome-2167-1095-3-187.php?aid=35739>
99. Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, et al. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. *PLoS One*. 2012;7(12).
100. Amaral SL, Silveira NP, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19(5):931–40.
101. Chaar LJ, Alves TP, Junior AMB, Michelini LC. Early training-induced reduction of Angiotensinogen in autonomic areas-the main effect of exercise on brain Renin-Angiotensin system in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10(9):1–16.
102. Mardare C, Krüger K, Liebisch G, Seimetz M, Couturier A, Ringseis R, et al. Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. *J Diabetes Res*. 2016;2016.
103. Ringseis R, Eder K, Mooren FC, Krüger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exercise Immunology Review*. 2015. p. 58–68.