TÁSSIA SANTOS RODRIGUES DA COSTA

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO NAS ALTERAÇÕES SEQUENCIAIS DO
MIOCÁRDIO DE SHR JOVENS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA**

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
2014

TÁSSIA SANTOS RODRIGUES DA COSTA

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO NAS ALTERAÇÕES SEQUENCIAIS DO
MIOCÁRDIO DE SHR JOVENS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA**

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
Michelini

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Tássia Santos Rodrigues da.

Efeito do treinamento aeróbio nas alterações cardíacas sequenciais de SHR jovens: participação do sistema renina-angiotensina / Tássia Santos Rodrigues da Costa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Effects of aerobic training on the time-course of cardiac changes in young SHR: involvement of renin-angiotensin system.

1. Hipertensão 2. Treinamento aeróbio 3. Sistema renina-angiotensina 4. Remodelamento cardíaco 5. SHR jovens I. Michelini, Profa. Dra. Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0103/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tássia Santos Rodrigues da Costa.

Título da Dissertação: Efeito do treinamento aeróbico nas alterações cardíacas sequenciais de SHR jovens: participação do sistema renina-angiotensina.

Orientador(a): Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

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 **010** nas fls. **124** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Lisete Campagno Michelin**i, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O treinamento aeróbio no desenvolvimento da hipertensão espontânea: Participação do sistema renina-angiotensina (SRA) cardíaco*" do qual participam o(s) aluno(s) **Tássia Costa**, 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 **14.02.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

***Dedico aos meus amigos e à minha família,
principalmente à minha mãe.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por cada dia nesta luta. Pela força que obtive para assim me manter longe dos meus amigos e familiares e assim continuar. Obrigada por aqui trilhar o meu caminho e pelos grandes amigos que aqui conquistei.

À professora e orientadora Dra Lisete Compagno Michelini, por me dar a oportunidade de iniciar nesta longa jornada, me recebendo em seu grupo e passando seus conhecimentos. Muito obrigada pelos ensinamentos.

Ao técnico e colega de trabalho Alexandre Ceroni pela grande aprendizagem que obtive e também pelos bons momentos de uma boa conversa.

À Rosangela (sobrenome), brilhante, sempre disposta a ajudar, não só profissionalmente, mas uma grande amiga nesta empreitada.

Aos amigos que conquistei no laboratório de anatomia: Kelly, Martinha, Soninha e Boleta. Além de seus ensinamentos, fazendo dos meus dias muito melhores.

À minha banca de qualificação: Edilamar, Vagner e Silvia, pelas observações totalmente pertinentes sobre o meu trabalho. Principalmente à professora Silvia, sempre se colocando disponível para minhas dúvidas e para a resolução de problemas pertinentes ao projeto.

Ao meu grande amigo hoje e colega de trabalho Gustavo, pelo incentivo durante todo o processo, me apoiando, me ensinando e pela paciência também nos dias mais difíceis. Foram muitos. Além dos grandes momentos de descontração...

Aos meus colegas de trabalho: Te, Carlota, Leiloca, Júnior, Raul, Piero, Marcelo, Adriana e Afonso pela ótima convivência, alegria, ensinamentos e paciência também, afinal conviver todos os dias nem sempre é tão fácil.

A minha amiga, minha irmazinha, Katherine, por todo o apoio, conselhos, carinho, companhia. Você fez toda a diferença nos meus dias, tornando-os muito mais próximos de uma vida normal, mais segura. Obrigada por sempre me escutar, tarefa difícil...rsrs

Obrigada ao meu grande amigo Neto, por estar comigo em todos os momentos. De escutar desde as bobagens do dia-a-dia às lamentações.

Pri, obrigada por todo carinho e amizade.

À minha grande amiga Carlita, sempre presente em minha vida mesmo com a distância Rio-São Paulo.

À minha família por aceitar e me incentivar mesmo privando-os da minha presença em tantos momentos importantes em que não estive por perto. Mãe, seu carinho foi fundamental para que eu persistisse. Te amo.

RESUMO

COSTA, T. S. Efeito do treinamento aeróbio nas alterações sequenciais do miocárdio de SHR jovens: participação do sistema renina-angiotensina. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Trabalhos anteriores, relativos aos efeitos do treinamento na modulação do sistema renina-angiotensina (SRA) tecidual, avaliaram seus efeitos no hipertenso crônico, com prejuízos cardiovasculares já bem estabelecidos, e, apenas ao final dos protocolos experimentais. Nesta dissertação buscou-se identificar uma possível relação causa-efeito entre exercício, SRA e remodelamento cardíaco, e, função autonômica na redução da pressão arterial (PA) induzida pelo treinamento aeróbio (T) iniciado na fase pré-hipertensiva. SHR, com 4 semanas de idade, foram submetidos ao T (55% da capacidade física, 1h/dia, 5x/semana) ou mantidos sedentários (S) por 8 semanas. WKY serviram como controle temporal. Nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8, os ratos foram canulados para medida da PA e frequência cardíaca (FC) basais, suas variabilidades e componente espectrais e análise do barorreflexo espontâneo (BrS). O ventrículo esquerdo (VE) foi coletado e utilizado para análise da expressão gênica e proteica dos diferentes componentes do SRA (RT-PCR em tempo real e Western Blotting), da presença/ausência de hipertrofia cardíaca e a medida do diâmetro dos cardiomiócitos. Houve durante o desenvolvimento dos SHR-S alterações idade-dependente da PA e sua variabilidade (elevação progressiva e intensa, com importante aumento do componente simpático), da FC (redução, com inalteração de sua variabilidade), ligeira redução do BrS, que foram acompanhadas por grande aumento da expressão proteica de receptores AT1 em S₈, pequena elevação de receptores Mas, determinando grande elevação da razão AT1R/MasR (S₈=10,36), e, redução inicial (T₀-T₄) seguida de expressivo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos no VE entre T₄ e T₈ (de 4,8 para 12,2 µm). O T foi efetivo em: 1) retardar (T₄) e reduzir (-14 mmHg) o aumento da PA, com intensa redução de sua variabilidade e do componente simpático vascular; 2) reduzir adicionalmente, com normalização da FC basal e instalação da bradicardia de repouso a partir de T₄; 3) aumentar a variabilidade da FC (T₄) por aumentar o controle vagal ao coração (redução da razão LF/HF); 4) reduzir a expressão gênica e normalizar (T₈) a expressão proteica de receptores AT1 no VE; 5) reduzir transitoriamente (T₄) a expressão proteica de receptores Mas, não a alterando em T₈, mas reduzindo a razão AT1R/MasR (T₈=4,23); 6) bloquear o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos observado entre T₄ e T₈. Nossos dados indicam que o treinamento aeróbio de SHR iniciado ainda na fase pré-hipertensiva, protege o coração reduzindo a expressão relativa de receptores AT1 e a hipertrofia cardíaca, reduz a FC basal e aumenta sua variabilidade por facilitar o componente vagal alterando o balanço simpato-vagal ao coração. Estas adaptações ao treinamento contribuem para retardar a instalação, reduzindo substancialmente os níveis pressóricos atingidos na fase crônica da hipertensão arterial. A oposição precoce aos efeitos deletérios da hipertensão pelo treinamento aeróbio é de fundamental importância para minimizar seus prejuízos estruturais e funcionais.

Palavras-chave: Treinamento físico. Hipertensão. Remodelamento cardíaco. SHR jovens. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

COSTA, T. S. **Effect of aerobic training on the time-course of cardiac changes in young SHR: involvement of the renin-angiotensin system.** 2014. 74 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Previous data demonstrated that 8-12 weeks of exercise training modified autonomic function, tissue renin-angiotensin system (SRA) and cardiac structure in adult SHR. In the present dissertation, we identified a possible cause-effect relation between exercise training, SRA, cardiac remodeling and autonomic function during the development of essential hypertension. 4 weeks-old SHR were submitted to aerobic training (5x/week; 1hour/day; 55% of maximal exercise capacity). On weeks 0, 1, 2, 4, 8, rats were cannulated to measure arterial pressure (AP), heart rate (HR), spontaneous baroreflex sensitivity (BrS), AP and HR variance and its components. Left ventricle (LV) was collected and used to measure SRA gene and protein expression (RT-real time PCR and western blotting) or cardiomyocytes diameters. During development of hypertension sedentary SHR exhibited progressive increase of AP, AP variance, vascular sympathetic activity, AT1 protein expression and cardiomyocyte diameters, as well as decrease of heart rate. Exercise training was able to attenuate increase AP, vascular sympathetic activity, cardiac remodeling and cardiac AT₁ protein expression; to intensify decrease HR; to increase HR variance and cardiac vagal activity. Our data indicate that aerobic training, during pre-hypertensive phases, attenuates cardiac remodeling associated with decrease of AP, cardiac AT₁ protein expression and autonomic dysfunction in SHR. Premature modulation of maladaptative effects of hypertension induced by aerobic training seem to be crucial to minimize long-term deleterious effects in cardiac structure and function.

Keywords: Exercise training. Hypertension. Cardiac Remodeling. Young SHR. Renin Angiotensin System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) desenvolvidos nos grupos SHR e WKY.	27
Figura 2 - Ilustração de medida do diâmetro do miócito (em μm).....	31
Figura 3 – Alterações sequenciais do peso corporal durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY	36
Figura 4 – Alterações sequenciais do desempenho em esteira durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY.	37
Figura 5 – Alterações sequenciais nos valores basais de PAM (painel A) e FC (painel B) durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) em SHR e WKY.	39
Figura 6 - Alterações sequenciais da variabilidade da PAS induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY.	40
Figura 7 - Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) nos componente LF (painel A), HF (painel B) e VLF (painel C) da variabilidade da PAS em SHR e WKY.....	42
Figura 8 - Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade do IP em SHR e WKY.	44
Figura 9 – Alterações sequenciais nos componentes LF (painel A), HF (painel B) e VLF (painel C) induzidas pelo treinamento aeróbio (T), ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.	45
Figura 10 – Alterações sequenciais na razão LF/HF induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na razão LF/HF em SHR e WKY.	46
Figura 11 – Alterações sequenciais na atividade barorreflexa espontânea (índice αLF e αHF) induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.	47
Figura 12 – Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a expressão gênica de Aogen (painel A), ECA (painel B), AT_1R (painel C), ECA2 (painel D) e MasR (painel E).	50
Figura 13 – Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a expressão proteica de AT_1R (painel A) e MasR (painel B) em SHR e WKY.....	52
Figura 14 – Alterações induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a razão da expressão proteica de AT_1R / MasR.....	52
Figura 15 – Alterações sequenciais na razão VE/PC induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.	54

Figura 16 – Fotos ilustrativas dos miócitos nos diferentes grupos experimentais.55

Figura 17– Alterações sequenciais no diâmetro médio dos miócitos induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Especificações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	32
Tabela 1 - Evolução do peso corporal (g) em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	35
Tabela 2 – Valores médios da velocidade máxima atingida durante teste de esforço máximo em esteira nos diferentes grupos experimentais.....	36
Tabela 3 - Valores da PAM e FC basal obtidos nos hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	38
Tabela 4 - Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	39
Tabela 5 - Valores dos componentes de baixa (LF), alta (HF) e muito baixa frequência (VLF) da pressão arterial sistólica (PAS), em ms^2 , de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	41
Tabela 6 - Variabilidade da frequência cardíaca (FC em ms^2) de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	43
Tabela 7 - Valores dos componentes de baixa (LF), alta (HF) e muito baixa frequência (VLF) da frequência cardíaca (FC), em ms^2 , de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	44
Tabela 8 - Valores da razão LF / HF em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	46
Tabela 9 - Valores do índice αLF e αHF em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	47
Tabela 10 - Valores da expressão de RNAm de Aogen no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	49
Tabela 11 - Valores da expressão de RNAm da ECA, AT ₁ R, ECA2 e MasR no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	49
Tabela 12 - Valores da expressão proteica de AT ₁ R e MasR no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	51

Tabela 13 - Valores da razão ventrículo esquerdo/ peso corporal (VE/ PC) em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....53

Tabela 14 - Valores médios do diâmetro dos miócitos em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Também conhecida como proteína quinase B (PKB)

ANG 1-7 – Angiotensina 1 a 7

AngI – Angiotensina I

AngII – Angiotensina II

Aogen – Angiotensinogênio

AP-1 – Proteína ativadora 1

AT₁R – Receptor de angiotensina tipo 1

AT₂R – Receptor de angiotensina tipo 2

ECA – Enzima conversora de angiotensinogênio

ECA2 - Enzima conversora de angiotensinogênio 2

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERK1/2 - Proteínas quinases de regulação extracelular-1/2

EROs – Espécie reativa de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HF – Componente de alta frequência

IκB – Proteína inibitória do NF-kappa B

IP – Intervalo de pulso

LF – Componente de baixa frequência

MAPK – Mitógeno ativado por proteína quinase

Mas R – Receptor Mas

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NFAT – Fator de transcrição nuclear

NF-kappa-B – Fator de transcrição kappa-B

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PC – Peso corporal

PI3 – Fosfoinosítídeo 3 quinase

PVE – Peso do ventrículo esquerdo

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

S – Sedentários

SAPK - quinases ativadas por estresse

SHR – Ratos espontaneamente Hipertensos

SRA – Sistema renina-angiotensia

T – Treinados

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa

varFC – Variabilidade da FC

varPAS – Variabilidade da PAS

VLF – Componente de muito baixa frequência

WKY – Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais Experimentais	26
3.2 Protocolo de Treinamento	26
3.2.1 Período de adaptação	26
3.2.2 Teste de esforço máximo	26
3.2.3 Protocolo de treinamento (T) ou sedentarismo (S)	27
3.2.4 Avaliações sequenciais durante os protocolos T e S	27
3.3 Registro direto de PA e FC	28
3.3.1 Confecção das Cânulas	28
3.3.2 Cateterização arterial	28
3.3.3 Registro Simultâneo da PA e FC basais	28
3.4 Análise dos dados funcionais	29
3.5 Coleta dos Tecidos	29
3.5.1 para Histologia cardíaca	29
3.5.2 para RT-PCR em Tempo Real e Western Blotting	30
3.6 Mensurações de Hipertrofia Cardíaca	30
3.7 Análise Histológica do Ventrículo Esquerdo	30
3.7.1 Análise de diâmetro do cardiomiócito	31
3.8 RT-PCR em tempo real	31
3.9 Western Blotting	33
3.10 Análise de Resultados e Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Evolução do peso corporal	35
4.2 Eficácia do Treinamento	36
4.3 Efeitos do treinamento sobre valores basais de PAM, FC e sobre da Variabilidade da PAS e da IP	37
4.4 Efeitos do treinamento aeróbio sobre a expressão gênica de Aogen, ECA, AT₁R, ECA2 e MasR no ventrículo esquerdo	48

4.5 Efeitos do treinamento aeróbio sobre a expressão proteica de receptores AT_1 e Mas no ventrículo esquerdo.....	50
4.6 Efeitos do treinamento aeróbio sobre o peso do ventrículo esquerdo e diâmetro do miócito	53
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), uma síndrome crônica e multifatorial, é caracterizada pela elevação da pressão arterial (PA) para valores acima de 140/90 mmHg, considerados como os índices superiores de normalidade da PA sistólica/diastólica, respectivamente (CHOBANIAN et al., 2003). É um dos problemas de saúde pública de maior prevalência na população mundial, atingindo 1 em cada 5 indivíduos com idade superior a 18 anos (20% da população adulta) e aproximadamente 50% dos indivíduos idosos (CHOBANIAN et al., 2003). No Brasil, a situação não é diferente. Estudos populacionais realizados em algumas cidades brasileiras mostram alta prevalência de HAS em adultos, variando entre 22% a 44% (FREITAS et al., 2001; GUS et al., 2004).

São extensos os estudos na literatura que buscam identificar os mecanismos condicionantes da HAS e principalmente formas de revertê-los a fim de propiciar uma melhor qualidade de vida aos portadores desta patologia. Dentre os vários modelos experimentais de HAS utilizados, destacam-se os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que foram desenvolvidos por Okamoto (1973). Os SHRs são considerados o melhor modelo para estudo da hipertensão primária ou essencial no homem, que é a etiologia de maior incidência mundial, correspondendo a cerca de 90% dos casos registrados de hipertensão (ZANCHETTI, 2010). Ratos SHR, assim como os homens não nascem hipertensos, mas desenvolvem a hipertensão a partir da puberdade (cerca de 4 semanas nos ratos), atingindo níveis pressóricos bastante elevados na idade adulta (cerca de 12 a 14 semanas nos ratos), os quais se mantêm até o envelhecimento (OKAMOTO, 1973).

Embora a elevação crônica dos valores pressóricos não causa por si própria o óbito, os mecanismos relacionados com o surgimento e a manutenção da HAS, como a hiperatividade simpática e a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) entre outros fatores, favorecem o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo, como o acidente vascular cerebral, a fibrose renal e o remodelamento cardíaco. O aumento da atividade simpática associada à redução da sensibilidade barorreflexa induz ao aumento da variabilidade da PA, permitindo oscilações intensas na pressão de perfusão nos capilares, o que favorece a apoptose e, conseqüentemente, a rarefação capilar. A hiperatividade simpática relaciona-se também com a ativação do SRA através de mecanismo endócrino de retroalimentação positiva, uma vez que o

aumento da descarga simpática é um dos fatores a promover liberação de renina pelas células justaglomerulares, a etapa-chave para a síntese e, portanto, para a elevação da concentração plasmática de angiotensina II (AngII). Adicionalmente aos efeitos vasomotores, tróficos, pró-inflamatórios e de retenção de sódio, a Ang II, ativa o simpático periférico e via órgãos subforniciais estimula o núcleo paraventricular do hipotálamo, um importante núcleo pré-autonômico, contribuindo para a hiperatividade simpática (ZIMMERMAN et al., 2004). Tem sido também proposto interações entre a descarga simpática, a estimulação do SRA e a hipertrofia cardíaca. Kudo et al. (2009) demonstraram na HAS que o aumento da variabilidade da PA, a qual é desencadeada pela redução da função barorreflexa associada à hiperatividade simpática, intensifica a hipertrofia cardíaca, a fibrose, a infiltração de macrófagos e a expressão gênica do angiotensinogênio (Aogen), o peptídeo precursor do SRA. Corroborando a importância da atividade hiperatividade simpática em adição aos efeitos do SRA para o desenvolvimento do remodelamento cardíaco, Mukaddam-Daher et al. (2009) demonstraram que apenas a associação entre moxonidina (inibidor central do sistema simpático) e losartan (bloqueador de receptores AT₁) foi capaz de reduzir a razão colágeno 1 / colágeno 3 em modelo experimental de hipertensão maligna, evidenciando a importância da hiperatividade simpática para o remodelamento cardíaco. De forma similar, nos modelos experimentais e em pacientes hipertensos, a ativação do SRA consiste em uma das principais características fisiopatológicas da HAS, relacionando-se com adaptações periféricas, como a vasoconstrição sistêmica e o aumento da hiperatividade simpática, que desencadeiam respostas crônicas locais como a fibrose renal e a hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo. A cinética de ativação do SRA plasmático inicia-se a partir da liberação do Aogen pelo fígado. Embora não apresente atividade biológica, este peptídeo é o precursor da síntese dos diferentes componentes do SRA. Na circulação, o Aogen é clivado pela renina, uma enzima proteolítica produzida e armazenada nas células justaglomerulares da arteríola aferente renal (PEARL, 1991). Diversos fatores, como a estimulação simpática, hipoperfusão da arteríola aferente renal e redução da carga filtrada de sódio, favorecem a liberação da renina, a qual cliva o Aogen, resultando na formação da angiotensina I (AngI, decapeptídeo). A enzima conversora da angiotensina (ECA), densamente presente no endotélio venular, remove 2 aminoácidos terminais da Ang I formando a Ang II (octapeptídeo). A AngII liga-se a receptores AT₁ ou AT₂ para

desencadear seus efeitos vasoconstritores, tróficos, proliferativos ou vasodilatadores, anti-proliferativos respectivamente (SKEGGS et al., 1956; TUNER; HOOPER, 2002), fisiológicos. Como a densidade do receptor AT_1 é muito maior que a do receptor AT_2 , os primeiros efeitos predominam e determinam a maioria das ações da Ang II.

Os efeitos celulares da Ang II envolvem o aumento na produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase: a Ang II interage com os receptores AT_1 , os quais, via proteína G, ativam a fosfolipase C, proporcionando o aumento da concentração citosólica de diaclicerol e IP3 e a liberação de cálcio. O incremento da concentração de cálcio induz a ativação da proteína quinase C que fosforila a subunidade $p47^{phox}$ da NADPH oxidase. Após fosforilação, esta subunidade se une na membrana plasmática com as subunidades 22^{phox} e a $gp91^{phox}$ (catalítica), liberando o ânion superóxido (CHAN et al., 2007). Devido à interação das espécies reativas de oxigênio (EROs) com as cisteínas catalíticas presentes em fosfatases, o incremento da síntese de EROs implica na inibição de fosfatases, prolongando a fosforilação e contribuindo para ativação de quinases (MORGAN; LIU, 2011), como as proteínas quinases de regulação extracelular-1/2 (ERK1/2) e as quinases ativadas por estresse (SAPK). Estas quinases intensificam a atividade transcriptase dos fatores de transcrição NF- κ B (mediada pelo desacoplamento da proteína inibitória I κ B via IKK), e AP-1, os quais possibilitam a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, EROs e aumento na expressão de diferentes componentes do SRA, uma vez que o NF- κ B regula a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e Interleucina-1 β), fontes de EROs (a subunidade da NADPH oxidase $gp91^{phox}$) e do precursor do SRA (Aogen). Além disso, o AP-1 também controla a expressão gênica do receptor AT_1 .

Além de constituírem um mecanismo de retroalimentação positiva entre o SRA tecidual, a inflamação e o estresse oxidativo, estes efeitos também favorecem o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo. No coração, a Ang II através de receptores AT_1 age como potente fator de crescimento em miócitos cardíacos, para induzir, via ativação da proteína Gq e proteína quinase C (PKC), hipertrofia do ventrículo esquerdo (YAMAZAKI; YAZAKI, 1999). Desta maneira, o remodelamento cardíaco desencadeado pela HAS, caracterizado pela hipertrofia do cardiomiócito e aumento na síntese de colágeno e fibrose, contribuem para a disfunção ventricular. Diversos estudos identificaram a relação entre a expressão do SRA tecidual,

estresse oxidativo, inflamação e o remodelamento cardíaco em diferentes modelos de hipertensão arterial (TOKUDA et al., 2004; XU et al., 2010, 2011), diabetes (TSUTSUI et al., 2007; WESTERMANN et al., 2007) e miocardite autoimune (SUKUMARAM et al., 2010). Estes estudos experimentais corroboram observações de vários estudos clínicos demonstrando que o tratamento com bloqueador do receptor AT₁ reduziu a hipertrofia do ventrículo esquerdo em hipertensos (DAHLOF et al., 2002; MATSUZAKI et al., 1997; MITSUNAMI et al., 1998; THÜRMANN et al., 1998).

Tradicionalmente, a via ECA/Ang II/receptor AT₁ do SRA tem sido associado a efeitos vasoconstritores, proliferativos, oxidativos e inflamatórios. Mais recentemente, a caracterização da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e do receptor Mas evidenciaram também a presença de vasodilatador, anti-proliferativo e anti-inflamatório, ou seja, um eixo cardioprotetor do SRA (CLARK et al., 2012). Esta via alternativa do SRA caracteriza-se pela síntese do peptídeo angiotensina 1-7 (Ang 1-7), a partir da Ang II, pela ECA2. Embora com menor eficiência, a ECA2 ainda pode gerar o peptídeo angiotensina 1-9, o qual pode ser convertido em Ang 1-7 através da ECA ou da neprilisina. No que diz respeito ao papel da via ECA2/Ang1-7/receptor Mas no remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão, diversos estudos demonstraram que os efeitos cardioprotetores desta via estavam associados à maior recaptção de cálcio durante a diástole (DIAS-PEIXOTO et al., 2008; GOMES et al., 2010), redução da expressão de colágeno (GIANI et al., 2010; SANTIAGO et al., 2010) e plasticidade do cardiomiócito (TRASK et al., 2010). Sob perspectiva celular, a sinalização ECA2/Ang1-7/receptor Mas estimula a via PI3 quinase/Akt/eNOS e reduz a localização do fator de transcrição NFAT no núcleo dos cardiomiócitos (DIAS-PEIXOTO et al., 2008; GOMES et al., 2010). Demonstrou-se também que o aumento da síntese de Ang 1-7 minimiza a ativação das MAPK em modelo de experimental de resistência insulínica induzida por frutose (MERCURE et al., 2008) e pela HAS (GIANI et al., 2010).

No tratamento da HAS, abordagens farmacológicas e não farmacológicas têm sido utilizadas com relativo sucesso. O tratamento medicamentoso envolve a utilização de diuréticos, vasodilatadores, atenuadores do sistema simpático, bloqueadores de canais de cálcio e os inibidores do SRA, como os inibidores da própria renina e da ECA, além de antagonistas dos receptores de Ang II (CHOBANIAN et al., 2003). Tem também sido bastante utilizado uma abordagem

não farmacológica que envolve modificações no estilo de vida, dentre as quais se destaca a prática regular de exercício aeróbio de baixa a moderada intensidade. De fato, o treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade tem sido indicado como um importante coadjuvante no tratamento da HAS e outras doenças cardiovasculares (BARRETTI et al., 2012; CHOBANIAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009; PESCATELLO et al., 2004; ZAMO et al., 2010;).

No que diz respeito aos mecanismos fisiológicos que desencadeiam as adaptações cardioprotetoras induzidas pelo treinamento físico, a redução da atividade simpática e a menor ativação do SRA tem sido demonstradas. Estudos clínicos têm comprovado, que o treinamento físico reduz a atividade simpática em pacientes com coronariopatias (MARTINEZ et al., 2011), com insuficiência cardíaca (ANTUNES-CORREA et al., 2011; ROVEDA et al., 2003) e HAS (LATERZA et al., 2007), bem como reduz a concentração plasmática de Ang II em portadores de insuficiência cardíaca (BRAITH et al., 1999). Estudos recentes indicaram ainda uma correlação inversa entre nível de treinamento e a incidência de HAS (BARENGO et al., 2005; WILLIAMS et al., 2008), revelando a importância preventiva da prática regular e sistematizada de exercícios físicos.

Diretamente associado com a redução da atividade simpática e da atividade do SRA plasmático, alguns estudos identificaram a redução da expressão dos componentes do SRA em diferentes tecidos, como núcleos autonômicos regulatórios (AGARWAL et al., 2011; CHAAR; MICHELINI, 2011; FELIX; MICHELINI, 2007;) e córtex renal (AGARWAL et al., 2012) após exercício crônico em modelos experimentais de HAS. Adicionalmente, Kar et al. (2010) identificaram o aumento da expressão gênica e protéica da ECA2 em núcleos regulatórios autonômicos em coelhos com insuficiência cardíaca. Além disso, dados recentes do nosso laboratório (SILVA JR, Mestrado, ICB/USP, 2011) indicaram que o treinamento aeróbio promovia, já ao final da primeira semana de protocolo, diminuição significativa no conteúdo de Ang II nas artérias renais, carótidas e aorta torácica de ratos SHR e WKY. O protocolo de exercícios aeróbios também foi capaz de reduzir o conteúdo de Ang (1-7), mas a análise da razão de Ang II/Ang (1-7) mostrou que o efeito inibitório do treinamento físico foi predominante na redução do conteúdo de Ang II nas artérias renais (SILVA JR, 2014). Por outro lado, não foram constatadas modificações significativas no balanço Ang II/Ang (1-7) nos demais leitos arteriais. De maneira interessante, observou-se que as alterações no conteúdo vascular de

Ang II e Ang (1-7) induzidas pelo treinamento aeróbio em SHR antecederam a queda parcial da PA, a qual somente foi estatisticamente significativa a partir da 8ª semana de protocolo, sugerindo uma possível relação de causa-efeito, ou seja, que a redução da atividade do SRA vascular possa contribuir, ao lado de outros efeitos, para a redução da PA subsequente ao treinamento aeróbio.

Com relação às adaptações cardíacas desencadeadas pelo treinamento físico, estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que o treinamento físico, em SHR idosos, reduziu a hipertrofia cardíaca, o volume de colágeno, a razão parede/ luz de arteríolas do miocárdio e causou queda parcial da PA, demonstrando ainda que estes benefícios estavam relacionados com a menor atividade do fator de transcrição NF-kappaB, pois foi observada uma maior expressão protéica do I κ B, uma proteína inibidora do NF-KappaB (ROSSONI et al., 2011). Alguns estudos sugeriram ainda que a reversão do remodelamento cardíaco associava-se à diminuição da expressão do SRA em SHRs (FILHO et al., 2008; ZAMO et al., 2011). Adicionalmente à redução do eixo ECA/AngII/receptor AT1 no coração, outros achados identificaram o aumento da expressão da atividade da via ECA2/Ang 1-7/receptor Mas, em modelos experimentais de HAS (FILHO et al., 2008) e de insuficiência cardíaca, após treinamento aeróbio (PEREIRA et al., 2009).

No entanto todos os trabalhos relativos aos efeitos do treinamento na modulação do SRA cardíaco avaliaram seus efeitos no hipertenso crônico, em que os déficits da hipertensão já se encontravam estabelecidos, indicando uma modesta redução da PA. Sabendo-se que a HAS é uma doença crônica e que uma vez estabelecida não há cura, torna-se importante a busca de condutas terapêuticas que reduzam os déficits da hipertensão, propiciem uma queda mais acentuada dos níveis pressóricos ou pelo menos atrasem o estabelecimento da hipertensão. Torna-se, portanto, importante avaliar-se os possíveis efeitos terapêuticos do treinamento aeróbio iniciado antes do estabelecimento da hipertensão, ou seja, na fase pré-hipertensiva. Ainda havia, quando iniciamos este trabalho, estudos que tivessem avaliado os efeitos do treinamento prévio sobre vias ECA/Ang II/receptor AT₁ e ECA2/Ang 1-7/receptor Mas no coração de SHR durante a estabilização da HAS, nem sobre a possível proteção de lesões cardíacas. Com exceção do estudo de Silva Jr e colaboradores, também não há informações se os efeitos do treinamento só aparecem após longo período de tempo ou precocemente e, se seus efeitos sobre os diferentes componentes do SRA se fazem todos ao mesmo tempo ou se há

escalonamento temporal dos mesmos. Foi portanto nossa hipótese de trabalho inicial, que o treinamento aeróbio iniciado na fase pré-hipertensiva e continuado durante a fase em que a hipertensão se estabelece, poderia alterar sequencialmente a expressão/ atividade do SRA no coração, contribuindo para a redução de efeitos deletérios na estrutura e função cardíaca, propiciando assim uma redução mais efetiva da PA.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é avaliar em SHR na fase pré-hipertensiva os efeitos do treinamento aeróbio de baixa/ moderada intensidade sobre alterações temporais na expressão gênica e proteica dos diferentes componentes do SRA cardíaco, e, em especial o balanço entre os eixos vasoconstritor e vasodilatador do SRA, correlacionando-as a modificações morfológicas e funcionais do coração durante o estabelecimento da hipertensão. São nossos objetivos específicos analisar em SHR nas diferentes etapas do desenvolvimento, os efeitos do treinamento aeróbio, utilizando como controles temporais SHR e ratos normotensos (WKY) sedentários:

- os valores basais da PA, FC, função barorreflexa espontânea, variabilidade da PA e FC e seus componentes de alta e baixa frequência, indicativos da variabilidade da atividade simpática e parassimpática;
- a hipertrofia e a análise do diâmetro dos miócitos cardíacos;
- a expressão gênica e proteica dos diversos componentes do SRA (angiotensinogênio, ECA, receptor AT₁, ECA2 e receptor Mas) no ventrículo esquerdo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados SHR e WKY machos recém-desmamados (21-22 dias de idade) provenientes do Biotério Central do ICB/USP e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica em ambiente com temperatura (22-23 °C) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Durante todo o período experimental os ratos tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB, registrado sob nº 10, fls 124 do livro 02.

3.2 Protocolo de Treinamento

O treinamento aeróbio foi realizado em esteira ergométrica (Inbramed, Millennium) adaptada para ratos. À esteira foram acopladas 10 raia de alumínio, para o treinamento individualizado dos ratos. Cada raia contém tampa de acrílico transparente, pintada em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente escuro para o qual o rato é atraído durante as sessões diárias, facilitando o treino, sem a necessidade de choques elétricos.

3.2.1 Período de adaptação

A adaptação à esteira teve a duração de 1 semana (10 sessões de 0,4-0,6 km/h, 0% inclinação, 5-10 minutos/sessão). Ratos inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos dos protocolos experimentais.

3.2.2 Teste de esforço máximo

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada, individualmente, através do teste esforço máximo escalonado em esteira (estágios sucessivos com duração de 3 minutos cada, iniciando-se à velocidade de 0,3km/h, e com incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos), a fim de determinar a velocidade

máxima de corrida na esteira, a qual foi utilizada como parâmetro para a prescrição individualizada do treinamento. Foram realizados 3 testes, nas semanas 0, 4 e 8. O 1º. Teste foi utilizado para se alocar ratos com igual desempenho aos grupos T ou sedentários (S) e determinar a intensidade de T (50-60% da capacidade máxima do exercício); o 2º. teste foi utilizado para se readequar a intensidade do T mantendo-a em 50-60%, enquanto que; o 3º teste prestou-se a avaliação comparativa dos efeitos do T ou S entre os grupos.

3.2.3 Protocolo de treinamento (T) ou sedentarismo (S)

O treinamento realizado foi do tipo aeróbio, com duração de 8 semanas e sessões diárias de exercício (1 h/dia, 5 vezes/semana), de intensidade baixa a moderada (50-60% da intensidade máxima alcançada nos testes de esforço). Os grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo.

3.2.4 Avaliações sequenciais durante os protocolos T e S

Os SHR treinados e sedentários foram analisados nos seguintes tempos experimentais: semanas 0 ($S_0=T_0$), 1 (S_1 e T_1), 2 (S_2 e T_2), 4 (S_4 e T_4) e 8 (T_8 e S_8), formando portanto 9 grupos experimentais. Adicionalmente, analisamos também WKY sedentários, os quais foram mantidos sedentários e avaliados nos tempos experimentais S_0 e S_8 (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) desenvolvidos nos grupos SHR e WKY.

S: ratos sedentários e T: ratos treinados. Numeração correspondente às semanas do protocolo experimental.

3.3 Registro direto de PA e FC

3.3.1 Confeção das Cânulas

As cânulas foram confeccionadas com tubos de Tygon sendo a parte distal, mais fina (diâmetro interno:externo = 0.28:0.61 mm) com 3 à 5 cm de extensão, a ser introduzida na luz vascular, a qual foi soldada, por aquecimento, à parte proximal de maior calibre (diâmetro interno:externo = 0.50:1.50 mm) variando de 9 à 17 cm de comprimento em função do tamanho dos ratos. As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica heparinizada (20 UI/ml) e ocluídas com pino de metal.

3.3.2 Cateterização arterial

Para a implantação da cânula nos tempos pré-determinados (semanas 0, 1, 2, 4 e 8), os ratos foram anestesiados com 100 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina. Uma incisão foi realizada na região ventral na altura da articulação coxo-femoral, para localização do tronco vâsculo-nervoso e isolamento da artéria femoral onde foi introduzida e fixada a parte mais fina da cânula de Tygon. A extremidade mais grossa foi introduzida através do espaço subcutâneo até a região cervical dorsal onde foi exteriorizada e fixada com fio de algodão. Após a cirurgia os ratos receberam dose profilática de antibiótico (24.000 UI/Kg Pentabiótico Veterinário, s.c.) e analgésico (2 mg/Kg ketoprofeno, s.c.) e permaneceram em repouso até a realização dos experimentos no dia seguinte.

3.3.3 Registro Simultâneo da PA e FC basais

Todos os registros dos parâmetros funcionais foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação e obtidos 24-30 horas após a cateterização arterial. A PA (pulsátil e média) foi registrada diretamente da artéria femoral, conectada a um transdutor de pressão (Deltran® II, Utah Medical Products, USA), acoplado ao pré-amplificador e ao computador (PowerLab AD Instruments, Austrália) frequência de amostragem de 2000 Hz/canal; a FC foi obtida a partir do intervalo dos pulsos de PA. Para obtenção dos valores basais, registramos um período de 30-40 minutos após o cessar da atividade exploratória do animal.

3.4 Análise dos dados funcionais

Registros sequenciais da PA e FC basal (20-30 minutos) obtidos no computador (software Powerlab, ADInstruments), foram utilizados para a análise espectral e obtenção da variabilidade de PA sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) no domínio da frequência. Foram avaliados os componentes de muito baixa frequência (VLF, 0,01 a 0,2 Hz, indicativo de variações hormonais e circadianas), de baixa frequência (LF, de 0,02 a 0,75 Hz, indicativo de oscilações do componente simpático) e de alta frequência (HF >0,075 Hz, indicativo de oscilações do tônus parassimpático). Avaliou-se também a sensibilidade barorreflexa espontânea, através da razão entre a raiz quadrada de LF do IP/ raiz quadrada do LF da PA (índice α LF) e da raiz quadrada do HF do IP/HF da PAS (índice α HF).

3.5 Coleta dos Tecidos

Após os registros funcionais, os animais foram sacrificados para remoção do coração destinado à análise histológica (n=3 por sub-grupo) e fixados, ou removido à fresco para a análise de expressão gênica pelo RT-PCR em tempo real e quantificação proteica por Western Blotting (n=5-6 por sub-grupo). Todos os corações foram cuidadosamente dissecados para isolamento do ventrículo esquerdo que foi seco e pesado para mensuração da hipertrofia cardíaca (n=5-10 por sub-grupo).

3.5.1 para Histologia cardíaca

Para realização das análises morfométricas, os animais foram profundamente anestesiados (300 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 60 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina) e imediatamente após a parada respiratória, o tórax foi aberto e o coração parado em diástole através da infusão de 14 mM de KCl, como descrito por Zamo et al. (2011), seguida da infusão de paraformaldeído 4%. A perfusão foi realizada sob pressão semelhante à PAM registrada nos animais acordados (SHR: de 110±8 a 172±3 mmHg; WKY: 104±5 a 119±3 mmHg em função da idade). O coração foi rapidamente removido, seco e pesado e então o ventrículo esquerdo

cuidadosamente dissecado, pesado e pós-fixado em paraformaldeído 4%, como sugerido por Zamo et al. (2010), por 24 horas e armazenado em álcool 70% sob temperatura de 4°C. A região do ápice, lesionada pela perfusão, foi descartada.

3.5.2 para RT-PCR em Tempo Real e Western Blotting

Após os registros funcionais, os animais foram profundamente anestesiados, como citado no item anterior, o tórax foi aberto e o coração exposto para a perfusão transcardíaca, via ventrículo esquerdo, com solução salina estéril e tamponada por aproximadamente 5 minutos. Após o ventrículo esquerdo dissecado e pesado e em 2 partes, o ápice foi utilizado para quantificação proteica por Western Blotting e a área média para análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real. O tecido foi armazenado à fresco em temperatura de - 80 °C até seu processamento.

3.6 Mensurações de Hipertrofia Cardíaca

Para determinação da hipertrofia cardíaca, o peso do ventrículo esquerdo (PVE) foi normalizado pelo peso corporal (PC) para se avaliar a massa cardíaca relativa (PVE/PC em mg/g), (ZAMO et al., 2010).

3.7 Análise Histológica do Ventrículo Esquerdo

Após o armazenamento do VE em álcool 70% por, no mínimo 24 horas, o tecido passou por diferentes processos para a análise morfológica.

Primeiramente a amostra foi submetida a processo de desidratação (passagens desde álcool 70% até álcool absoluto seguido de Xilol). Em seguida, a peça passou por banhos de parafina e foi emblocada. Cortes sequenciais do VE foram obtidos (secções de 10 µm) de maneira semi-seriada à nível do músculo papilar, os quais foram montados em lâminas/lamínulas e corados por hematoxilina e eosina para visualização das estruturas celulares e análise do diâmetro do miócito.

3.7.1 Análise de diâmetro do cardiomiócito

Os cortes foram fotografados em microscópio de campo claro com magnitude de 400X. Miócitos com núcleo visível e membrana celular intacta foram escolhidos para a determinação de seu diâmetro, realizada exatamente na porção central do núcleo, conforme ilustrado na figura 2. A largura dos cardiomiócitos isolados foi determinada através do *software* Image J; cerca de 22 campos visuais foram analisados por animal, obtidos a partir de 4 a 6 campos/corte, em 4 a 5 cortes por animal.

Figura 2 - Ilustração de medida do diâmetro do miócito (em μm).

A barra horizontal ilustra a magnitude e o local da medida.

3.8 RT-PCR em tempo real

A expressão de RNAm de Aogen, das isoformas ECA e ECA2 e dos receptores AT1 e Mas do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada utilizando-se a técnica de reação da polimerase em tempo real (Real-time PCR). Para tal, o tecido foi rapidamente removido e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento. O RNA total foi obtido através do reagente Trizol (Invitrogen-EUA) de acordo com recomendações do fabricante. As amostras foram então submetidas à digestão pela DNase I (Invitrogen) para purificação do RNA. Para obtenção do cDNA, 2 μg de RNA total foram aquecidos à temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos juntamente com 146 ng/ μl de random primers, 10 uM dNTPs e água livre de RNases, seguido de resfriamento no gelo. Foram adicionados então, 4 μL de Buffer (5x concentrado), 0,1 M de DTT e 40 U de RNaseout e levados para um novo aquecimento de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos. A enzima transcriptase reversa (MLV) foi acrescentada à reação (200 U), deixando agir à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos. Ao final, a reação foi aquecida em temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, para inativação da enzima.

A reação de PCR em tempo real foi realizada em um volume final de 25 μ l contendo oligonucleotídeos específicos (Quadro 1), que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A especificidade da reação com SYBR[®] green (Life Technologies, São Paulo – SP, Brasil) foi confirmada por curvas de dissociação. As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando o *software* 7500 *software* v2.0.6 (Applied Biosystems). A expressão de RNA foi quantificada utilizando o cálculo do $\Delta\Delta CT$ (“cycle threshold”). A normalização das amostras foi realizada utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNAm de GAPDH (controle interno padronizado). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias normalizadas pela expressão de RNAm do GAPDH (DUSSAULT; POULIOT, 2006; PFAFFL, 2001;).

Quadro 1- Especificações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.

GENE	SEQUÊNCIA (5'-3')	COMPRIMENTO a)	Nº DE ACESSO b)
GAPDH	S: GGG CAG CCC AGA ACA TCA T	76	NM 017008.4
	A: CCG TTC AGC TCT GGG ATG AC		
AOGEN	S: CAC GGA CAG CAC CCT ATT TT	100	NM 134432.2
	A: TGT TGT CCA CCC AGA ACT CA		
ECA	S: GGG CGC ACG ACA CCA ACA TCA	69	NM 012544.1
	A: TCC TGG TTG ATC AGG GCC GCT T		
ECA 2	S: ACC CTT CTT ACA TCA GCC CTA CTG	73	NM 001012006.1
	A: TGT CCA AAA CCT ACC CCA CAT AT		
AT1	S: CAC TTT CCT GGA TGT GCT GA	140	NM 030985.4
	A: CCC AGA AAG CCG TAG AAC AG		
Mas	S: TCC ACC AAG ACC TGC TAG GA	208	NM 012757.2
	A: TCT TGT GCT GGA CCA CTT CA		

a) Tamanho do Amplicon em pares de base; b) Sequência de identificação para acesso no site [ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.9 Western Blotting

Foram quantificadas a expressão proteica dos receptores AT₁ e Mas no ventrículo esquerdo. Para tanto, os tecidos foram macerados manualmente e homogeneizados em tampão de extração, preparado através de solução de Ripa 100 mM (inibidor fenil metil sufonil fluoreto -PMSF 100 mM, coquetel inibidor de protease 2 µl/ml de tampão – NaVO₄ 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM e pirofosfato de sódio 10 mM) e centrifugado a 10.000 rpm por ±30 min a 4°C.

Para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria utilizou-se 200 µl do sobrenadante adicionado a reagentes do kit de quantificação (BCA protein assay – Pierce Protein Research Prod); 1:40 de água da amostra foi utilizada em duplicata, adicionando-se tampão Laemmli (25% do volume da amostra) contendo ditioneitol 100 mM, incubados por 40 min na estufa a 37 °C. Após a leitura, as amostras foram colocadas 10 min em banho “seco” a 100 °C para desnaturar as proteínas. Em seguida, ocorreu separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio (SDSPAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, CA, USA).

As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA) em cuba para transferência elétrica (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado a 5% por 2h (MasR) e 4h (AT₁R) em temperatura ambiente. A seguir foram adicionados os anticorpos primários específicos para receptor AT₁ (anticorpo policlonal produzido em coelho, anti-AT₁ AB 15552-50 UI – Millipore; Temecula, CA, USA – 0,8 mg/ml - 1:1000) e para o receptor Mas (anticorpo com afinidade isolada, produzido em coelho, anti-Mas1 AV51197-50 UG – Sigma-Aldrich 3050 Spruce Street, Sant Louis, MO 63103 USA – 1 mg/ml – 1:1000) e incubados *overnight* a 4 °C (*shaker*), que foi seguida pela incubação com anticorpos secundários (Amersham ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody –from donkey- GEHealthcare, UK – AT₁ 1:5000 e MasR 1:8000). Após essa etapa, foram adicionados às membranas, reagentes para detecção da quimiluminescência (ECL, Amersham Pharmacia, UK). As membranas foram expostas em filmes de raios-X durante tempos variados, os quais foram revelados e submetidos à análise de densitometria óptica utilizando o *software* Image J. A banda da proteína de interesse foi selecionada de acordo com os pesos moleculares

presentes no *datasheet* (AT₁R: 41 KD e MasR: 37 KD). Os valores obtidos em unidades arbitrárias de suas correspondentes bandas foram normalizados pelos valores obtidos das proteínas totais através de marcação por Ponceau. As análises foram feitas em duplicata.

3.10 Análise de Resultados e Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. Os efeitos do treinamento e do sedentarismo foram analisados pela análise de variância (ANOVA) fatorial de 2 vias comparando-se os efeitos da condição (T vs S) nos diferentes tempos experimentais (semanas 0, 1, 2, 4 e 8). A comparação entre grupos hipertensos e normotensos foi avaliada pela ANOVA fatorial de 2 vias comparando os efeitos dos grupos (SHR-S, SHR-T e WKY-S) nos diferentes tempos experimentais (semanas 0 e 8). O teste *post hoc* foi o de Fisher LSD. Utilizou-se o software STATISTIC 7.0 (Stat Soft Inc.). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução do peso corporal

Na Tabela 1, estão indicados os valores do peso corporal obtidos durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo em SHR e WKY. Na Figura 3, são comparadas as variações do peso corporal observadas durante os protocolos experimentais. Comparando-se as linhagens, não observamos diferença de peso corporal analisados no início (SHR-S0=63,86±2,67;WKY-S0=67,13±3,00 g) e no final do período experimental (SHR-S8=235,83±6,86; SHR-T8=243,47±4,81 vs WKY-S8=233,69±5,17 g). De acordo com o crescimento e o desenvolvimento dos animais, houve ganho progressivo do peso corporal já da partir da 1ª semana experimental em ambos os grupos, que no entanto foi ligeiramente menor nos SHR-T1 vs SHR-S1 (Tabela 1, Figura 3). Por outro lado, a partir da 2ª semana experimental, houve equivalência do ganho de peso corporal entre SHR-T e SHR-S, os quais atingiram na 8ª semana experimental valores equivalentes aos observados no WKY-S pareados por idade (Tabela 1, Figura 3).

Tabela 1. Evolução do peso corporal (g) em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	63,86 ± 2,67 (7)		67,13 ± 3,00 (14)
Sem 1	105,84 ± 5,69 (10) #	80,75 ± 7,82 (6) # †	
Sem 2	139,00 ± 4,12 (10) #	136 ± 5,51 (8) #	
Sem 4	191,14 ± 7,50 (7) #	181,22 ± 4,40 (10) #	
Sem 8	235,83 ± 6,86 (10) #	243,47 ± 4,81 (9) #	233,69 ± 5,17 (8) #

Valores são médias±EPM (no. ratos/grupo). Significâncias (P<0,05) # vs. Semana 0; † vs S.

Figura 3 – Alterações sequenciais do peso corporal durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY.

Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; † vs S.

4.2 Eficácia do Treinamento

Desde o início dos experimentos e durante todo o protocolo os SHR exibiam melhor desempenho na esteira, como evidenciado pela maior velocidade atingida nos testes de esforço máximo quando comparado aos WKY pareados por idade (1.67 ± 0.05 vs 0.63 ± 0.05 Km/h, $p < 0,001$, Tabela 2 e Figura 4). Nos SHR, o treinamento aeróbio em SHR promoveu aumento significativo na velocidade atingida na 4ª. e 8ª. semanas experimentais ($+0,86 \pm 0,05$ e $+1,60 \pm 0,09$ Km/h vs semana 0, correspondendo 52% e 96%, respectivamente, $p < 0,001$). Por outro lado, os grupos sedentários (WKY e SHR) não apresentaram alterações significativas na capacidade aeróbia ao longo das 8 semanas experimentais (Tabela 2, Figura 4).

Tabela 2. Valores médios da velocidade máxima atingida durante teste de esforço máximo em esteira nos diferentes grupos experimentais.

Testes de Esforço	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Semana 0	1.67 ± 0.05 (87) *		0.63 ± 0.05 (22)
Semana 4	1.78 ± 0.12 (14) *	2.53 ± 0.06 (23) * #	0.90 ± 0.00 (5)
Semana 8	1.92 ± 0.15 (5) *	3.27 ± 0.13 (10) * # †	0.60 ± 0.00 (5)

Valores são médias $\pm$ EPM (no. ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 4 – Alterações sequenciais do desempenho em esteira durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY.

Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs WKY; † vs S.

4.3 Efeitos do treinamento sobre valores basais de PAM, FC e sobre da Variabilidade da PAS e da IP

Com 28-30 dias de idade, SHR e WKY apresentaram níveis similares da PAM (110 ± 8 e 104 ± 5 mmHg, respectivamente), porém os SHR já apresentavam elevada FC basal quando comparados aos WKY (437 ± 31 vs 371 ± 8 b/min, $p < 0,001$, Tabela 3 e Figura 5). A partir da 1ª. semana experimental, ou seja, com 5 semanas de idade, SHR sedentários apresentaram aumentos graduais e significativos da PAM (+15%, $p < 0,001$) que se intensificaram nas semanas subsequentes (+20%, +33% e +56% na 2ª., 4ª. e 8ª. semanas experimentais, respectivamente, $p < 0,001$, Tabela 3 e Figura 5A). O aumento idade dependente da PAM induzido nos SHR foi significativamente retardado e atenuado pelo treinamento, uma vez que só observamos aumento significativo da PAM na 4ª. semana experimental, quando os ratos tinham 2 meses de idade (+26% vs semana 0). Entre a 4ª. e 8ª. semana, houve elevação adicional da PAM, mas os SHR treinados sempre apresentaram valores pressóricos médios inferiores ao dos SHR sedentários pareados por idade (+26% e +43%, respectivamente, $p < 0,05$). Ao final dos protocolos, quando os SHR tinham 3 meses de idade, ambos os grupos eram hipertensos, mas os SHR-T vs SHR-S, exibiam redução significativa de 14mmHg na PAM (Figura 5A e Tabela 3). Aumento da PAM induzido pelo crescimento foi também observado nos WKY, mas com menor magnitude que o apresentado pelos SHR (+14% entre as semanas 0 e 8, $p < 0,05$). Portanto, embora SHR e WKY apresentassem PAM similar aos 28-30 dias de idade, os SHR, tanto dos sedentários quanto dos treinados, atingem a fase

de hipertensão crônica aos 3 meses de vida, embora com menor gravidade no grupo treinado (Figura 5A).

Quanto à FC basal, no início dos protocolos experimentais SHR com 1 mês de idade exibiam FC mais elevada do que WKY (437 ± 31 vs. 371 ± 8 b/min, Tabela 3 e Figura 5B). Durante o crescimento todos os grupos experimentais apresentaram redução idade-dependente da FC basal (significativa a partir da 2ª semana nos SHR – valores absolutos na Tabela 3), contudo, entre a 4ª. e 8ª. semanas, a redução da FC basal foi significativamente maior nos SHR treinados, condizente com a instalação da bradicardia de repouso induzida pelo treinamento (331 ± 8 vs. 369 ± 8 e 341 ± 6 vs. 381 ± 9 b/min, para SHR-T vs. SHR-S nas 4ª. e 8ª. semanas respectivamente, Figura 5B). Importante observar-se que a FC basal dos SHR treinados nas semanas 4 e 8, não diferia daquela observada nos animais WKY, ou seja a FC dos SHR foi normalizada pelo treinamento aeróbio (Tabela 3 - Figura 5B).

Tabela 3. Valores da PAM e FC basal obtidos nos hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

PAM			FC			
Tempo	Grupos					
	SHR S	SHR T	WKY S	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	110±8(7)		104±5(11)	437±31(7) *		371±8(11)
Sem 1	127±4(7) #	103±5(6) †		401±12(6)	443±15(6)	
Sem 2	132±3(10)#	122±3(6)		387±7(10) #	393±7(6)#	
Sem 4	146±4(7) #	139±3(9) #		369±8(7) #	331±8(9) # †	
Sem 8	172±3(9) # *	158±3(10)#*†	119±3(9) #	381±9(9) # *	341±6(10)#†	322±7(9)

Valores são médias $\pm$ EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 5 – Alterações sequenciais nos valores basais de PAM (painel A) e FC (painel B) durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S.

Analizamos também os efeitos do crescimento associado ao treinamento sobre a variabilidade da PA sistólica (varPAS) e a sensibilidade barorreflexa espontânea (aferida pelos índices alfa LF e alfa HF) durante os protocolos experimentais. Assim como a PAM, os SHR e WKY apresentaram valores similares da varPAS aos 28-30 dias de idade. No decorrer dos protocolos, houve aumento da varPAS nos SHR-S e SHR-T, que se mostravam significativamente mais elevados que WKY na 8ª semana (Tabela 4, Figura 6).

Tabela 4. Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS em mmHg²) de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	36,01 ± 8,85 (7)		26,50 ± 3,21 (11)
Sem 1	33,44 ± 6,18 (7)	22,02 ± 6,75 (6)	
Sem 2	61,61 ± 8,87 (10)	35,55 ± 8,64 (6)	
Sem 4	64,63 ± 8,02 (7)	47,72 ± 5,49 (9)	
Sem 8	134,85 ± 25,14 (9) #*	94,72 ± 17,47 (8) #†*	38,48 ± 6,83 (8)

Valores são médias ± EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 6 - Alterações sequenciais da variabilidade da PAS induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S.

Analizamos também os efeitos do treinamento sobre os componentes de baixa e alta frequência (LF e HF) da varPAS, assim como o componente de muito baixa frequência (VLF), os quais são apresentados na Tabela 5 e Figura 7. No início dos experimentos, quando os ratos tinham 28-30 dias de idade e apresentavam valores similares de PAM, os valores de LF, HF e VLF eram semelhantes entre os grupos SHR e WKY. Durante as 8 semanas experimentais houve nos SHR-S e SHR-T elevação dos 3 componentes espectrais quando comparados ao grupo WKY (Tabela 5, Figura 7). O LF, indicativo da variabilidade do simpático, aumentou de maneira significativa nos SHR-S a partir da 4ª. semana ($12,78 \pm 2$ vs. $3,95 \pm 0,7$ mmHg² na semana 0, $p < 0,001$) elevando-se ainda mais na 8ª. semana ($23,43 \pm 4$ mmHg², Tabela 5 e Figura 7). Nos SHR-T, observou-se aumento do LF somente na 8ª semana que foi, no entanto, de menor magnitude que o observado nos SHR-S (SHR-T8 = $14,43 \pm 4$ mmHg²). Ao final dos protocolos, frente a elevação da PAM basal, ambos SHR-S e SHR-T apresentavam valores elevados de LF quando comparados aos WKY-S de mesma idade. Nos grupos SHR, também houve aumento dos componentes HF e VLF ao final das 8 semanas experimentais quando comparados aos WKY e a seus valores na semana 0; por sua vez, o treinamento não modificou mais parâmetros e apesar do VLF apresentar aumento ligeiramente menor nos SHR-T, não encontramos diferenças entre eles (valores na Tabela 5 e Figura 7).

Tabela 5. Valores dos componentes de baixa (LF), alta (HF) e muito baixa frequência (VLF) da pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg², de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Comp. Espectr.	Grupos	Tempo experimental				
		Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8
LF	SHR-S	3,95±0,68(7)	5,81±1,20(7)	10,82±1,40(10)	12,78±2,28(7)#	23,43±4,98(9)#
	SHR-T		2,87±0,38(6)	5,14±1,17(6)	6,43±0,65(9)	14,43±4,82(8)#†*
	WKY-S	2,02±0,23(11)				2,96±0,45(8)
HF	SHR-S	2,54±0,44(7)	2,33±0,34(7)	3,09±0,48(10)	3,56±0,70(7)	7,46±1,51(9) #*
	SHR-T		1,92±0,22(6)	2,61±0,73(6)	2,95±0,82(9)	9,16±2,57(8) #*
	WKY-S	2,52±0,33(11)				2,72±0,54(8)
VLF	SHR-S	13,32±3,27(7)	17,74±3,26(7)	23,55±2,91(10)	29,65± 5,36(7)	59,31±12,48(9)#*
	SHR-T		6,52±1,44(6)	13,07±3,22(6)	21,89±2,71(9)	43,59±8,23(8) #*
	WKY-S	12,71±2,47(11)				15,72±1,76(8)

Valores são médias±EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias (P<0,05) # vs. Semana 0; * vs. WKY; †vs.S.

Figura 7- Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) nos componente LF (painel A), HF (painel B) e VLF (painel C) da variabilidade da PAS em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S.

Analizamos também a variabilidade da FC (indicada pela variabilidade do IP) e seus componentes espectrais LF, HF e VLF. Ao início dos protocolos, os grupos SHR apresentavam valores menores da varIP, quando comparados aos WKY ($p < 0,05$, Tabela 6 e Figura 8), a qual foi acompanhado de redução significativa do

componente HF da varIP (Tabela 7 e Figura 9B), sem alteração dos demais componentes nesta etapa experimental. Houve ligeiro aumento da varIP na 2ª semana, com alterações significativas na 4ª e 8ª semanas do treinamento. Nos SHR-T essas alterações foram acompanhadas por aumento progressivo do componente HF da varIP até a 4ª semana ($p < 0,05$ vs SHR-S0, Tabela 7 e Figura 9B), com ligeira redução entre as semanas 4 e 8, acompanhando a redução idade-dependente do HF observado em todos os grupos experimentais. Observamos no entanto, que o aumento do componente HF nos SHR-T igualou seus valores aos observados nos WKY, determinando entre a 4ª e 8ª semanas, normalização da variabilidade do IP (conforme Figuras 8 e 9B). Por outro lado, os SHR mantidos sedentários, continuavam a apresentar ao final dos protocolos, componente HF reduzido e menor variabilidade do IP quando comparados aos WKY. Com exceção do bloqueio do aumento transitório de LF do IP na semana 4 (Figura 9A) e de evitar o aumento do VLF do IP na 8ª semana (Figura 9C), o treinamento não alterou os demais componentes espectrais dos SHR durante o período experimental.

Tabela 6. Variabilidade da frequência cardíaca (IP em ms^2) de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	33,37 $\pm$ 2,97 (7)		57,96 $\pm$ 8,61 (11)
Sem 1	38,48 $\pm$ 4,81 (7)	33,48 $\pm$ 1,99 (6)	
Sem 2	31,85 $\pm$ 2,71 (10)	42,72 $\pm$ 2,89 (6) †	
Sem 4	44,46 $\pm$ 1,94 (7)	47,52 $\pm$ 4,21 (9) #	
Sem 8	39,81 $\pm$ 4,24 (9)	52,67 $\pm$ 2,80 (8) #†	57,59 $\pm$ 11,79 (8)

Valores são médias $\pm$ EPM (no. ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 8 - Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade do IP em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S.

Tabela 7. Valores dos componentes de baixa (LF), alta (HF) e muito baixa frequência (VLF) da frequência cardíaca (FC), em ms^2 , de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Comp. Espectr.	Grupos	Tempo experimental				
		Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8
LF	SHR-S	$0,81 \pm 0,11(7)$	$0,82 \pm 0,22(7)$	$0,80 \pm 0,10(10)$	$1,59 \pm 0,28(7)$ #	$1,29 \pm 0,28(9)$
	SHR-T		$0,83 \pm 0,24(6)$	$0,84 \pm 0,16(6)$	$0,85 \pm 0,10(9)$ †	$0,94 \pm 0,17(8)$
	WKY-S	$1,17 \pm 0,14(11)$				$1,04 \pm 0,21(8)$
HF	SHR-S	$3,40 \pm 0,81(7)^*$	$4,03 \pm 0,80(7)$	$4,44 \pm 0,38(10)$	$4,85 \pm 0,62(7)$	$4,23 \pm 0,35(9)$
	SHR-T		$5,55 \pm 0,93(6)$	$5,97 \pm 1,88(6)$	$7,07 \pm 0,79(9)$ #	$5,97 \pm 0,61(8)$
	WKY-S	$8,33 \pm 1,00(11)$				$6,56 \pm 1,08(8)$
VLF	SHR-S	$14,67 \pm 2,22(7)$	$22,12 \pm 4,81(7)$	$21,78 \pm 4,75(10)$	$21,58 \pm 1,55(7)$	$29,03 \pm 4,22(9)$ #
	SHR-T		$14,99 \pm 2,90(6)$	$20,59 \pm 3,15(6)$	$23,33 \pm 3,33(9)$	$21,55 \pm 2,21(8)$
	WKY-S	$19,58 \pm 3,61(11)$				$21,56 \pm 3,38(8)$

Valores são médias $\pm$ EPM (no. ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 9 – Alterações sequenciais nos componentes LF (painel A), HF (painel B) e VLF (painel C) induzidas pelo treinamento aeróbico (T), ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # $p < 0,05$ vs Semana 0; * $p < 0,05$ vs WKY; † $p < 0,05$ vs S.

Estas observações foram confirmadas pelo cálculo da razão LF/HF sobre o coração, conforme apresentado na Tabela 8 e Figura 10. Apesar de todos os grupos apresentarem valores similares aos 28-30 dias de idade, SHR mantidos sedentários, aumentaram esta razão de maneira progressiva e, ao final das 8 semanas, exibiam

elevado LF/HF, indicativo do desbalanço autonômico ao coração, com predomínio da atividade simpática. Por outro lado, o treinamento bloqueou o desequilíbrio autonômico, mantendo LF/HF em valores similares aos dos WKY (Tabela 8 e Figura 10). Ou seja, o treinamento aeróbio conservou inalterado o balanço simpático / vagal dos SHR-T, impedindo o aumento da razão LF / HF que caracteriza a instalação da hipertensão nos SHR-S.

Tabela 8. Valores da razão LF / HF em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	0,17±0,04(5)		0,17±0,03(9)
Sem 1	0,16±0,01(5)	0,13±0,02(6)	
Sem 2	0,16±0,02(8)	0,14±0,01(5)	
Sem 4	0,21±0,03(7)	0,14±0,02(9)	
Sem 8	0,27±0,05(8) #*	0,16±0,02(7) †	0,15±0,02(7)

Valores são médias±EPM (no. ratos/grupo). Significâncias (P<0,05): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 10 – Alterações sequenciais na razão LF/HF induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na razão LF/HF em SHR e WKY.

Significâncias (p<0,05): # vs. S0; * vs. WKY; † vs. S.

A função barorreflexa espontânea foi também analisada pelos índices α LF e α HF nos 3 grupos experimentais durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo. Como indicado na Tabela 9 e Figura 11, SHR apresentavam na semana 0, menores índices α LF e α HF quando comparados aos WKY de mesma idade ($0,45 \pm 0,09$ vs $0,83 \pm 0,06$ e $1,05 \pm 0,08$ vs $2,11 \pm 0,28$ b/min/mmHg, para α LF e

α HF respectivamente, $p < 0,001$). Durante o período experimental houve reduções ainda maiores do α LF e α HF. Exceto pela melhora do barorreflexo espontâneo (α HF na semana 4, representativo da elevada atividade parassimpática sobre o coração), o treinamento não foi eficaz em corrigir o barorreflexo espontâneo e ao final dos protocolos, α LF e α HF dos SHR-S e SHR-T mostravam-se significativamente reduzidos quando comparados aos dos WKY (Tabela 9 e Figura 11).

Tabela 9. Valores do índice α LF e α HF em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

α LF			α HF		
SHR S	SHR T	WKY S	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	0,45 $\pm$ 0,09(7) *	0,83 $\pm$ 0,06(11)	1,05 $\pm$ 0,08(7) *		2,11 $\pm$ 0,28(11)
Sem 1	0,35 $\pm$ 0,05(7)	0,49 $\pm$ 0,10(6)	1,31 $\pm$ 0,16(7)	1,59 $\pm$ 0,30(6)	
Sem 2	0,30 $\pm$ 0,02(10)	0,43 $\pm$ 0,05(6)	1,39 $\pm$ 0,16(10)	1,52 $\pm$ 0,23(6)	
Sem 4	0,37 $\pm$ 0,04(7)	0,39 $\pm$ 0,02(9)	1,33 $\pm$ 0,13(7)	1,76 $\pm$ 0,23(9) #	
Sem 8	0,24 $\pm$ 0,03(9) #*	0,35 $\pm$ 0,01(8) *	0,76 $\pm$ 0,08(9) *	1,24 $\pm$ 0,19(8) *	2,03 $\pm$ 0,30(8)

Valores são médias $\pm$ EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias ($P < 0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs vs

Figura 11 – Alterações sequenciais na atividade barorreflexa espontânea (índice α LF e α HF) induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

4.4 Efeitos do treinamento aeróbio sobre a expressão gênica de Aogen, ECA, AT₁R, ECA2 e MasR no ventrículo esquerdo

Os valores médios da expressão gênica dos diferentes componentes das alças vasoconstritora e vasodilatadora do sistema renina-angiotensina no coração durante as 8 semanas experimentais são apresentados nas Tabelas 10 e 11 e Figura 12. Aos 28-30 dias de idade, os SHR quando comparados a seus controles normotensos, apresentavam menor expressão gênica de Aogen e ECA cardíaco ($0,37 \pm 0,06$ vs. $1,05 \pm 0,16$ UA e $0,20 \pm 0,02$ vs. $1,11 \pm 0,34$ UA, respectivamente, $p < 0,001$); por outro lado a elevação da expressão de RNAm de AT₁R não atingiu níveis de significância (Figura 12). Entre a 1^a. e a 2^a. semana observamos nos SHR sedentários elevação transitória da expressão de Aogen ($0,84 \pm 0,29$ UA em T₁) e da ECA ($0,54 \pm 0,13$ UA em T₂), com retorno aos valores iniciais entre a 4^a. e 8^a. semana. Observamos também que o treinamento reduziu significativamente a expressão de RNAm de Aogen e ECA entre a 2^a. e 4^a. semana (Aogen= $0,13 \pm 0,04$ a $0,16 \pm 0,01$ UA; ECA= $0,15 \pm 0,04$ a $0,12 \pm 0,04$ UA, $p < 0,05$ quando comparados aos SHR-S, Tabelas 10 e 11 e Figura 12A e B), mantendo-se nestes níveis até a 8^a. semana de treinamento. Ao final dos protocolos experimentais, com a redução idade-dependente dos níveis de Aogen e ECA nos SHR-S, a expressão de ambos, precursor e ECA, não mais diferiam entre os grupos T e S. Por outro lado o crescimento não alterou a expressão gênica do receptor AT₁ no VE dos SHR, mas o treinamento a reduziu significativamente nos SHR-T entre a 4^a e 8^a semanas (de -70% a -80% vs valores na semana 0, Figura 12C, $p < 0,05$). Nos WKY não observamos alterações significativas na expressão de RNAm de Aogen, ECA e AT₁R ao longo das 8 semanas experimentais.

Analisando o eixo ECA2-ANG(1-7)-receptor Mas cardíaco, observamos ao início dos experimentos que a expressão de ECA2 era similar entre SHR e WKY, enquanto a expressão de RNAm do MasR já se apresentava diminuída nos ratos pré-hipertensos ($0,35 \pm 0,02$ vs $1,04 \pm 0,14$ UA, $p < 0,001$, Tabela 11 e Figuras 15- D e E). Durante o crescimento e desenvolvimento dos SHR-S, houve elevação dos níveis de ECA2 entre a 2^a e 4^a semanas experimentais (+60% vs semana 0), que foi de maior magnitude nos SHR-T (+80% a +113% vs semana 0), com diferenças significativas entre T e S nas semanas 4 e 8 (Tabela 11 e Figura 12D). Nos SHR-S, a expressão de RNAm do receptor Mas não foi alterada durante as 8 semanas

experimentais, enquanto que o treinamento determinou aumento significativo da sua expressão gênica da 1ª à 8ª semana de observação (aumento médio de 2 a 4 vezes, Tabela 11, Figura 12E).

Ao final dos protocolos, SHR-S vs WKY, não apresentavam alterações significativas na expressão gênica de ECA2 e continuavam a apresentar redução marcante da expressão de receptor Mas. Por outro lado, os SHR-T apresentavam aumento significativo da expressão gênica dos componentes do eixo vasodilatador, anti-proliferativo e anti-inflamatório do SRA (Tabelas 10 e 11 e Figuras 12- D e E).

Tabela 10. Valores da expressão de RNAm de Aogen no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S)

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	0.37 ± 0.06 (3) *		1.05 ± 0.16 (5)
Sem 1	0.84 ± 0.29 (5) #	0.56 ± 0.21 (4)	
Sem 2	0.76 ± 0.15 (5)	0.16 ± 0.01 (4) # †	
Sem 4	0.26 ± 0.07 (4)	0.13 ± 0.04 (4) #	
Sem 8	0.30 ± 0.04 (5) *	0.25 ± 0.03 (5) *	0.74 ± 0.03 (3)

Valores são médias±EPM (no. ratos/grupo). Significâncias (P<0,05) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs.S

Tabela 11. Valores da expressão de RNAm da ECA, AT1R, ECA2 e MasR no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

ECA			AT1R		
SHR S	SHR T	WKY S	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	0,20±0,02(3) *	1,11±0,34(5)	1,99±0,55(4)		1,12±0,26(5)
Sem 1	0,44±0,14(5)	0,57±0,11(4)#	1,69±0,45(5)	1,43±0,28(4)	
Sem 2	0,54±0,13(5) #	0,15±0,04(4)†	2,05±0,49(5)	1,06±0,17(4)	
Sem 4	0,29±0,08(4)	0,12±0,04(4)	1,60±0,47(4)	0,39±0,02(4)# †	
Sem 8	0,33±0,04(5) *	0,19±0,04(5)*	0,93±0,14(3)	0,58±0,03(5)# †	0,95±0,15(5)

ECA2			MasR		
SHR S	SHR T	WKY S	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	0,68±0,07(8) *	1,04±0,16(5)	0,35±0,02(8) *		1,04±0,14(5)
Sem 1	0,60±0,09(5)	0,90±0,12(4)	0,52±0,06(5)	0,80±0,18(5) #	
Sem 2	1,11±0,11(4) #	1,23±0,18(5) #	0,64±0,21(5)	0,77±0,12(5)	
Sem 4	1,07±0,06(5) #	1,45±0,14(5)#†	0,43±0,19(5)	1,40±0,19(5)# †	
Sem 8	0,99±0,22(5)	1,45±0,14(5) #*†	0,66±0,07(7)*	0,96±0,09(5)#	1,30±0,24(5)

Valores são médias±EPM (no. ratos/grupo). Significâncias (P<0,05) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs S.

Figura 12 – Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a expressão gênica de Aogen (painel A), ECA (painel B), AT_1R (painel C), ECA2 (painel D) e MasR (painel E).

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. S0; * vs. WKY; † vs. S.

4.5 Efeitos do treinamento aeróbio sobre a expressão proteica de receptores AT_1 e Mas no ventrículo esquerdo

Avaliamos também a expressão proteica dos receptores AT_1 e Mas nos seguintes tempos experimentais: semanas 0, 4 e 8. Ao início dos protocolos, a quantificação proteica tanto de AT_1R quanto Mas R não diferia entre os grupos SHR e WKY (Tabela 12 e Figura 13). O sedentarismo induziu aumento significativo da expressão de AT_1R na 8ª semana experimental, quando os SHR-S tinham 3 meses de idade e elevada PAM (Figura 13^a, $p < 0,05$ vs semana 0 e vs WKY de

mesma idade). Interessantemente, observa-se que o treinamento bloqueou completamente este aumento, mantendo a expressão de receptores AT_1 no VE em níveis similares aos dos WKY apesar de presença de hipertensão nos SHR-T (Figura 13A e Tabela 12). Ao final dos protocolos, a expressão proteica de AT_1R encontrava-se significativamente reduzida nos SHR-T vs SHR-S. Não houve alteração nos WKY-S. A expressão proteica do receptor Mas dos SHR-S, foi transitoriamente elevada na 4ª semana de sedentarismo, mantendo-se em patamar inferior, mas ainda elevado, na 8ª semana experimental (+ 136% e + 64% respectivamente vs semana 0, Figura 13B e Tabela 12). O treinamento reduziu o aumento observado na 4ª semana (SHR-T=1,20±0,07; SHR-S=1,89±0,27, $p<0,05$), apresentando na 8ª semana valores similares aos dos SHR-S (Figura 13B, Tabela 12). Em concordância com a elevação idade-dependente da expressão do receptor Mas, também os WKY sedentários apresentavam elevação significativa da sua expressão ao longo das 8 semanas experimentais.

Tabela 12. Valores da expressão proteica de AT_1R e MasR no ventrículo esquerdo de hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

EXPRESSÃO PROTEICA						
	AT ₁ R			MASR		
	SHR S	SHR T	WKY S	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	3,99± 1,45(8)		1,00±0,00(8)	0,80±0,08(5)		1,00±0,00(5)
Sem 4	5,16±1,60(8)	4,27±1,79(8)		1,89±0,27(5)	1,20±0,07(5)	
Sem 8	13,57±3,59(8)	5,96±3,41(8)	3,81±1,72(8)	1,31±0,16(5)	1,41±0,19(5)	1,7-±0,15(5)

Valores são médias±EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias ($P<0,05$) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S

Figura 13 – Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a expressão proteica de AT₁R (painel A) e MasR (painel B) em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. S0; * vs. WKY; † vs. S.

Os valores da expressão proteica dos receptores AT1 e Mas nas semanas experimentais 0 e 8 permitiu o cálculo da razão AT1R/MasR ao início e final dos protocolos (Figura 14). Observou-se durante estes pontos experimentais, marcante aumento da razão AT1R/MasR nos SHR-S que foi bloqueado pelo treinamento: nos SHR-T a razão AT1R/MasR manteve-se inalterada nos períodos analisados. Mesmo bloqueada pelo treinamento a razão AT1R/MasR era aproximadamente o dobro da observada nos WKY-S, que apenas apresentaram uma pequena oscilação destes valores (Figura 14). Estes resultados sugerem a predominância do eixo vasoconstritor, proliferativo e pró-inflamatório nos ratos SHR e que o treinamento aeróbio atua no sentido de evitar o aumento adicional deste eixo do SRA, o qual é determinado pelo crescimento/ envelhecimento nos SHR.

Figura 14 – Alterações induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a razão da expressão proteica de AT₁R/ MasR.

4.6 Efeitos do treinamento aeróbio sobre o peso do ventrículo esquerdo e diâmetro do miócito

Na semana 0 dos protocolos experimentais, os valores da razão ventrículo esquerdo/ peso corporal (VE/ PC) eram similares entres os 3 grupos ($p=0,585$ para o fator grupo, Tabela 13 e Figura 15). Com o crescimento houve redução idade-dependente da razão VE/PC em todos os grupos experimentais com redução média de 15% nos SHR-T ($p<0,05$ nas semanas 1,4 e 8), e de 24% nos SHR-S ($p<0,05$ nas semanas 4 e 8) e nos WKY-S ($p<0,05$ na semana 8). O treinamento não determinou nenhuma alteração significativa na razão VE/PC (Tabela 13 e Figura 15).

Tabela 13. Valores da razão ventrículo esquerdo/ peso corporal (VE/ PC) em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	3.55 ± 0.29 (5)		3.22 ± 0.07 (10)
Sem 1	3.42 ± 0.07 (5)	3.04 ± 0.03 (6) #	
Sem 2	3.15 ± 0.11 (5)	3.13 ± 0.13 (9)	
Sem 4	2.70 ± 0.08 (4) #	3.12 ± 0.13 (9) #	
Sem 8	2.75 ± 0.02 (5) #	2.96 ± 0.13 (10) # *	2.41 ± 0.08 (9) #

Valores são médias±EPM (no. de ratos/grupo). Significâncias ($P<0,05$) # vs. Semanas 0; * vs. WKY.

Figura 15 – Alterações sequenciais na razão VE/PC induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. Semana 0; * vs. WKY.

Analizamos também nos mesmos grupos e tempos experimentais, os valores de diâmetro dos miócitos cardíacos, conforme ilustrado na Figura 16. Ao início dos protocolos, os SHR apresentavam valores superiores de diâmetro quando comparados aos WKY de mesma idade ($8,58 \pm 0,1$ vs $4,52 \pm 0,1$ μm , $p < 0,001$, Tabela 14 e Figura 17). Interessante observar-se que, sob efeito do crescimento, houve até a 4ª semana experimental, redução do diâmetro dos miócitos nos grupos SHR (queda média de 38% na semana 4 vs semana 0). No entanto, a partir da 4ª semana, quando há elevação da PAM em ambos os grupos, o diâmetro dos miócitos aumentou acentuadamente, atingindo na semana 8 $12,19 \pm 0,12$ μm nos SHR-S e $8,48 \pm 1,00$ μm nos SHR-T. O treinamento determinou portanto, elevação significativamente menor do diâmetro dos miócitos ao final dos protocolos ($p < 0,05$ para SHR-T8 vs SHR-S8, Figura 17 e Tabela 14). Não houve alteração no diâmetro de miócitos dos WKY entre as semanas inicial e final dos protocolos.

Figura 16 – Fotos ilustrativas dos miócitos nos diferentes grupos experimentais.

S: ratos sedentários e T: ratos treinados nas respectivas semanas de protocolo experimental.

Tabela 14. Valores médios do diâmetro dos miócitos em hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S)

Tempo	Grupos		
	SHR S	SHR T	WKY S
Sem 0	8.58 ± 0.18 (2) *		4.52 ± 0.10 (3)
Sem 1	8.04 ± 0.15 (3)	-	
Sem 2	7.76 ± 0.24 (3)	7.05 ± 0.36 (3) #	
Sem 4	4,80 ± 0,09 (3) #	5,84 ± 0,29 (3) #	
Sem 8	12.19 ± 0.12 (3) * #	8.48 ± 1.00 (3) * †	4.01 ± 0.07 (3) #

Valores são médias±EPM (no. ratos/grupo). Significâncias (P<0,05) # vs. Semana 0; * vs. WKY; † vs. S.

Figura 17– Alterações sequenciais no diâmetro médio dos miócitos induzidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S), em SHR e WKY.

Significâncias ($p < 0,05$): # vs. S0; *vs. WKY; † vs. S.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam importantes efeitos benéficos do treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade e iniciado ainda na fase pré-hipertensiva sobre a hemodinâmica basal, sobre o sistema renina-angiotensina intra cardíaco e sobre o remodelamento do coração de SHR durante o estabelecimento da hipertensão arterial. Observamos que:

- o treinamento retarda em 3 semanas a elevação inicial da pressão arterial média, que nos SHR-T só apresenta aumento significativo aos 2 meses de vida, enquanto que nos SHR-S esta elevação já se faz presente quando os ratos apresentam 1 mês e 1 semana;

- além de retardar a instalação da hipertensão, os níveis pressóricos atingidos pelos SHR-T foram em média cerca de 14 mmHg inferiores aos apresentados pelos SHR-S durante todo o período experimental;

- a queda da pressão induzida pelo treinamento foi acompanhada de menor aumento idade-dependente do simpático periférico e intensa redução da variabilidade da pressão, o que representa um importante ganho na redução de lesões de órgão-alvo;

- o treinamento não só reduziu a frequência cardíaca basal, com a normalizou a partir da 4ª semana experimental, período em que seus valores não mais diferiam daqueles apresentados pelo WKY de mesma idade;

- a instalação da bradicardia de repouso nos SHR-T foi acompanhada de aumento da modulação vagal ao coração na semana 4 e normalização da variabilidade da FC (outro bom prognóstico) que ao final dos protocolos era maior que a apresentada pelos SHR-S e não diferia da observada nos WKY-S. Além disto, o treinamento bloqueou nos SHR o aumento idade-dependente da razão LF/HF, evitando o desequilíbrio simpato-vagal;

- no coração dos SHR o treinamento determinou redução mais intensa, porém transitória (T2 – T4) da expressão gênica de Aogen, ECA e AT1R, que foi acompanhada de normalização da expressão proteica de receptor AT1 ao final das 8 semanas experimentais;

- houve também, entre as semanas 4 e 8 do treinamento, aumento significativo da expressão gênica de ECA2 e normalização do RNAm do receptor Mas, a qual no entanto, não se refletiu no conteúdo proteico deste receptor no

ventrículo esquerdo dos SHR-T, determinando ao final dos protocolos marcante redução da razão AT1/Mas quando comparados aos SHR-S;

- Apesar do maior diâmetro do miócito cardíaco nos SHR-S, analisado através da avaliação do corte histológico, não identificamos hipertrofia do ventrículo esquerdo medida pela razão peso do ventrículo/ peso corporal. O treinamento foi eficaz em bloquear o aumento idade-dependente dos cardiomiócitos apresentado pelos SHR-S entre as semanas 4 e 8 dos protocolos experimentais. Estes efeitos, proporcionalmente mais intenso do que aqueles observados nos SHR adultos treinados, confirmam a eficácia do treinamento aeróbio iniciado ainda na fase pré-hipertensiva em corrigir/ reverter muitos dos prejuízos cardiovasculares induzidos pela hipertensão.

Os SHR constituem um dos principais modelos experimentais da hipertensão primária ou essencial no homem. Estes animais ao nascer têm a pressão arterial similar à dos ratos normotensos, mas já apresentam elevada FC basal (HERRING et al., 2011; SHANKS et al., 2013). Nossos resultados, mostraram também que ao início dos protocolos experimentais, a elevada frequência cardíaca dos SHR, é condicionada por reduzida modulação vagal ao coração e disfunção barorreflexa, o que determina importante redução na variabilidade da frequência cardíaca quando comparada à dos ratos normotensos. Tratam-se de dados originais que justificam a taquicardia basal exibidas pelos SHR. Contudo, os SHR não demonstravam, na semana 0, elevada pressão arterial ou expressão do sistema renina-angiotensina cardíaco, mas exibiram aumentado diâmetro do cardiomiócito, caracterizando o remodelamento cardíaco precoce. Desta forma, a partir destes resultados, podemos sugerir que a disfunção autonômica, e não a elevação da pressão arterial per se ou a atividade do sistema renina-angiotensina cardíaco, determina a instalação da lesão de órgão-alvo, evidenciada pelo remodelamento cardíaco.

Ao longo das 8 semanas de protocolo, identificamos redução progressiva da frequência cardíaca basal, presente nos 3 grupos experimentais. Constatamos adicionalmente que esta redução não se encontra associada à variabilidade da FC e seus componentes espectrais, uma vez que os mesmos não se alteram nos SHR-S e WKY-S durante todo o período analisado. Demonstramos ainda, que a elevação da pressão arterial nos SHR-S é acompanhada de redução progressiva do barorreflexo espontâneo (conforme indicado pelo índice α LF) e pelo aumento da razão LF/ HF, indicativa do aumento da modulação simpática ao coração. Estas

alterações confirmam achados anteriores de Zamo et al. (2010) e Kristek & Koprdoval (2011 MINAMI et al., 1988;), que mostraram aumento da pressão, e de seu componente LF no SHR adulto, mostrando adicionalmente a sequência temporal com que elas se realizam. Assim, podemos afirmar que a elevação da pressão arterial está associada a disfunção autonômica, enquanto a redução da FC parece estar relacionada às modificações no tamanho do rato.

Sabe-se também que a hipertensão espontânea é acompanhada de ativação do eixo vasoconstritor/ trófico/ pró-inflamatório do SRA, por hipertrofia cardíaca e aumento da espessura dos cardiomiócitos (ROSSONI et al., 2011; VOLPE, 2012). De fato, nossos SHR de 3 meses de idade, apresentavam elevada expressão de receptores AT_1 no ventrículo esquerdo e marcante aumento na espessura dos cardiomiócitos ($12,19 \pm 0,12$ vs $4,01 \pm 0,07$ μ m nos WKY pareados por idade). A originalidade deste trabalho foi a de descrever a sequência temporal com que estas características se desenvolvem. Observamos nos 3 grupos, ao longo das 8 semanas experimentais tendência à redução da razão peso do ventrículo esquerdo/ peso corporal, que foi acompanhado nos SHR por redução significativa do diâmetro dos miócitos entre o 1º e 2º mês de idade. No entanto, entre o 2º e o 3º mês, ou seja, entre a 4ª e 8ª semanas experimentais, quando a pressão dos SHR-S já atingira níveis severos de hipertensão, houve um marcante aumento na espessura dos miócitos que se hipertrofiaram em cerca de 2,5 vezes (de $4,80 \pm 0,09$ para $12,19 \pm 0,12$ μ m, Tabela 14). Considerando-se que neste mesmo período, a expressão proteica dos receptores AT_1 aumentou em 2,6 vezes (de $5,16 \pm 1,60$ para $13,57 \pm 3,59$ UA, Tabela 12) é plausível supor-se uma relação casual entre ambos, ou seja, que a maior expressão do eixo vasoconstritor/ trófico/ pró-inflamatório do SRA cardíaco possa ter contribuído para o aumento da espessura dos cardiomiócitos. A interação entre a estrutura do cardiomiócito – atividade do SRA pode ainda ter sido potencializada pelo aumento da atividade simpática ao coração (elevada razão LF/HF nos SHR-S) observada ao final das 8 semanas experimentais. De fato, é bastante conhecida a relação entre o aumento da descarga simpática, atividade do sistema renina-angiotensina, hipertrofia cardíaca e lesões de órgãos-alvo em diferentes doenças cardiovasculares (BARRETTI et al., 2012; ROSSONI et al., 2011; SUKUMARAM et al., 2010; TOKUDA et al., 2004; TSUTSUI et al., 2007; VOLPE, 2012; WESTERMANN et al., 2007; XU et al., 2010, 2011). No estudo realizado por Akers et al. (2000), foi analisada a sequência temporal de ativação do sistema

renina-angiotensina, hipertrofia cardíaca e sistema nervoso simpático na hipertensão arterial induzida por constrição aórtica. Observou-se que a sobrecarga de pressão determinou ativação do sistema renina-angiotensina, que coincidia com aumento da hipertrofia do ventrículo esquerdo e era seguida por aumento da resposta simpática. Apesar do diferente modelo experimental, este estudo ressalta a importância da elevação da pressão na atividade do sistema renina-angiotensina e do simpático.

Outra observação original do nosso estudo foi a de que a expressão proteica do receptor Mas nos SHR-S, exceto pelo aumento transitório aos 2 meses de idade, não diferia da apresentada pelos WKY-S durante a instalação da hipertensão arterial. Esta resposta, frente à elevada expressão de AT₁R, determinava nos SHR-S de 3 meses de idade, nítido desequilíbrio entre os eixos vasoconstritor/ trófico/ pró-inflamatório e vasodilatador/ anti-trófico e anti-inflamatório do SRA, com predomínio do primeiro.

Além de identificar as alterações temporais sobre as variáveis cardiovasculares e autonômicas ao coração e vasos, SRA cardíaco e remodelamento ventricular durante o estabelecimento da hipertensão, foram analisados os efeitos do treinamento aeróbio sobre estes parâmetros.

Vários trabalhos têm indicado a potencialidade do treinamento aeróbio em reduzir parcialmente os níveis pressóricos na hipertensão humana e em modelos experimentais de hipertensão (AMARAL et al., 2000, 2001; CAVALLERI et al., 2011; CERONI et al., 2009; CHOBANIAN et al., 2003; FELIX; MICHELINI, 2007; HIGA TANIGUCHI et al., 2009; LATERZA et al., 2007; MARTINS et al., 2005; MASSON et al., 2014; MELO et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004). Coerente com estas observações, nossos dados confirmaram a redução parcial dos níveis pressóricos de SHR submetidos ao treinamento aeróbio de baixa/ moderada intensidade. Mostrando adicionalmente, que o treinamento iniciado na fase pré-hipertensiva induz queda pouca mais acentuada da pressão arterial média quando comparado a outros estudos em que o treinamento de igual intensidade iniciava-se na fase crônica da hipertensão (redução de 14 mmHg em média vs reduções de 6 a 10 mmHg, respectivamente) (CERONI et al., 2009; FELIX; MICHELINI, 2009; HIGA TANIGUCHI et al., 2009). O estudo sequencial das alterações pressoras, mostrou ainda outro benefício do treinamento aeróbio em SHR jovens, qual seja o de atrasar em cerca 3 semanas a instalação da hipertensão arterial, uma vez que os SHR-T só

apresentaram elevação significativa da pressão na 4ª semana experimental, quando atingiram 2 meses de idade.

Os benefícios do treinamento no retardo e menor magnitude da resposta pressora nos SHR, pôde ser gerado pelas adaptações autonômicas, como a redução da atividade simpática vascular. Este benefício, propicia uma menor vasoconstrição arteriolar, contribuindo para menor resistência vascular periférica e, conseqüentemente, menor pressão arterial. Corroborando este achado, Blanco-Rivero et al. (2013), demonstraram que o treinamento aeróbio reduz a liberação de noradrenalina na artéria mesentérica em SHR adultos.

Outra adaptação autonômica ao treinamento aeróbio na hipertensão é a redução da variabilidade da PAS (CERONI et al. 2009; MASSON et al. 2014; MORAES-SILVA et al. 2010) que está intimamente relacionada com o remodelamento cardíaco. No presente estudo, nós verificamos que o treinamento na pré-hipertensão, atenuou o aumento da variabilidade da PAS através da inibição da disfunção barorreflexa identificada nos SHR-S. Além destes benefícios autonômicos, o treinamento físico gerou expressiva redução no tamanho do diâmetro do miócito cardíaco observado na 8ª semana experimental. Sabe-se que ambas, a redução da carga pressórica e da variabilidade da pressão, encontram-se positivamente relacionadas com a redução de lesões em órgãos-alvo em hipertensos (DAHLOF et al., 2002; KAI et al., 2009; MATSUZAKI et al., 1997; THURMANN et al., 1998; XIE et al., 2007). Em conjunto, o treinamento físico preveniu o aumento da atividade simpática vascular (4ª e 8ª semanas) que colaborou para o retardo da elevação da pressão arterial, ocorrido nas semanas 4 e 8 experimentais. Além disso, o treinamento aeróbio diminuiu a variabilidade da PAS através da prevenção da disfunção barorreflexa. Esta adaptação estrutural é de suma importância para se opor ao remodelamento hipertrófico do coração determinado pela sobrecarga pressórica. Estas observações apontam para outro efeito benéfico do treinamento aeróbio iniciado ainda na fase pré-hipertensiva.

Nossos resultados também indicam que o treinamento aeróbio na redução idade-dependente da FC basal, aumentou a variabilidade da FC, determinando a instalação da bradicardia de repouso e a simultânea normalização da FC basal entre a 4ª e 8ª semana de treinamento. Estas observações confirmam observações anteriores da literatura (CAVALLERI et al., 2011; CERONI et al., 2009; CLAUSEN, 1977; CRUZ et al., 2013; MASSON et al., 2014; MELO et al., 2003; SCHEUER;

TIPTON, 1977). Realmente a bradicardia de repouso tem sido indicada como um marcador de treinabilidade. Em concordância com um estudo anterior em ratos adultos (MASSON et al., 2014), nossos resultados indicaram a mesma sequência temporal para instalação da bradicardia de repouso e que o aumento da variabilidade da FC era devido a aumento da modulação vagal ao coração (HF do IP) induzido pelo treinamento. Em concordância com um estudo anterior em ratos adultos (MASSON et al., 2014), nossos resultados indicaram a mesma sequência temporal para instalação da bradicardia de repouso e que o aumento da variabilidade da FC era devido a aumento da modulação vagal ao coração (HF do IP) induzido pelo treinamento. De maneira similar aos resultados de Masson et al. (2014), observamos nos SHR jovens inibição da redução do barorreflexo espontâneo após treinamento, colaborando então para as alterações sobre o remodelamento cardíaco observadas em mesmo período.

Nossos resultados indicaram claramente a potencialidade do treinamento aeróbio iniciado na fase pré-hipertensiva em corrigir/ evitar o desequilíbrio autonômico ao coração induzido pela hipertensão, uma vez que ao final dos protocolos, o balanço autonômico (indicado pela razão LF/HF) era similar ao exibido pelos controles normotensos mesmo na presença de hipertensão arterial (158 ± 3 mmHg nos SHR-T8). Trabalhos anteriores na hipertensão induzida por coarctação subdiafragmática da aorta, na presença e na ausência de antagonistas de receptores AT_1 , já haviam demonstrado a dissociação entre melhoria do controle autonômico da circulação e níveis de pressão arterial, assim como indicada a ANGII como um importante modulador do tônus autonômico ao coração (BEZERRA et al., 2001; MICHELINI; BONAGAMBA, 1990;). Coerentemente, nossos resultados mostraram que a normalização do balanço autonômico ao coração de SHR (na 8ª semana de treinamento) ocorre simultaneamente à intensa redução na expressão de receptores AT_1 e à redução da razão $AT_1R/MasR$ induzidas pelo treinamento (Figuras 13 e 14), sugerindo que o bloqueio das ações celulares da ANGII, independente dos níveis pressóricos, foi o principal determinante da redução do tônus simpático e normalização do controle autonômico ao coração nos SHR-T.

A redução da expressão de receptores AT_1 e, portanto, a “inativação” relativa do eixo vasoconstritor/ trófico/ pró-inflamatório do SRA induzida pelo treinamento, pode também explicar o bloqueio do marcante aumento de espessura dos cardiomiócitos observados nos SHR-S entre a 8ª e a 12ª semanas de idade

(correspondentes à 4ª e 8ª semanas experimentais). Encontra-se bem estabelecido na literatura que a AngII ligando-se a receptores AT₁ age como potente fator de crescimento em miócitos cardíaco, para induzir, via ativação da proteína Gq e proteína quinase C (PKC), hipertrofia do ventrículo esquerdo e que inibidores da ECA e antagonistas de receptores AT₁ determinam redução do diâmetro de cardiomiócitos e regressão da hipertrofia tanto em modelos animais de hipertensão quanto em humanos (BAKER; ACETO, 1990; DAHLOF et al., 2002; KATOH et al., 1989; KOJIMA et al., 1994; LE CORVOISIER et al., 2010; MORGAN et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2009; PFEFFER et al., 1983; SEM; TARAZI, 1983; THURMANN et al., 1998; YAMAZAKI; YAZAKI, 1999). A observação de que o treinamento aeróbio, iniciado na fase pré-hipertensiva também reduz o diâmetro dos cardiomiócitos, sugere ser este efeito mediado pela redução da disponibilidade da ANGII cardíaca induzida pelo treinamento. Além disto, a comparação na magnitude da redução no diâmetro transversal dos cardiomiócitos em SHR (- 30% no presente trabalho vs - 15% após tratamento com antagonistas de receptores AT₁) (KOJIMA et al., 1994) nos indica eficácia do treinamento iniciado precocemente, em bloquear a hiperativação do eixo trófico do SRA durante a instalação da hipertensão, mesmo na presença de níveis elevados de pressão arterial.

Deve-se ressaltar que o treinamento, em oposição ao observado no coração de SHR adultos submetidos ao treinamento por natação (GOMES FILHO et al., 2008), não induziu em SHR jovens alteração na expressão de receptores Mas, indicativa da atividade do eixo vasodilatador/ anti-proliferativo/ anti-inflamatório do SRA. Portanto, em SHR jovens a menor razão AT₁R/ MasR observada após o treinamento, deve-se à redução da expressão de receptores AT₁ uma vez que os receptores Mas não foram alterados pelo treinamento.

6 CONCLUSÕES

O treinamento aeróbio de SHR, iniciado ainda na fase pré-hipertensiva, protege o coração reduzindo a expressão relativa de receptores AT_1 , o diâmetro dos cardiomiócitos, a frequência cardíaca basal e aumentando a variabilidade da frequência cardíaca por facilitar a modulação vagal e corrigir o desequilíbrio simpático-vagal induzido pela hipertensão. Estas adaptações ao treinamento são mediadas pelo bloqueio dos efeitos locais da angiotensina II e contribuem para retardar a instalação e reduzir substancialmente a variabilidade e os níveis pressóricos atingidos na fase crônica da hipertensão arterial.

A oposição precoce aos efeitos deletérios da hipertensão pelo treinamento aeróbio é de fundamental importância para minimizar seus prejuízos estruturais e funcionais.

REFERÊNCIAS*

AGARWAL, D.; ELKS, C. M.; REED, S. D.; MARIAPPAN, N.; MAJID, D. S.; FRANCIS, J. Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. **Antioxid Redox. Signal**, v. 16, p. 139–152, 2012.

AGARWAL, D.; WELSCH, M. A.; KELLER, J. N.; FRANCIS, J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. **Basic Res. Cardiol**, v. 106, p. 1069-1085, 2011.

AKERS, W.; CROSS, A.; SPETH, R.; DWOSKIN, L. P.; CASSIS, L.A. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**, v. 279, p. 2797–2806, 2000.

AMARAL, S. L.; SILVEIRA, N. P.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 19, p. 931-940, 2001.

AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.**, v. 18, p. 1563-1572, 2000.

ANTUNES-CORREA, L. M.; KANAMURA, B. Y.; MELO, R. C.; NOBRE, T. S.; UENO, L. M.; FRANCO, F. G.; ROVEDA, F.; BRAGA, A. M.; RONDON, M. U.; BRUM, P. C.; BARRETTO, A. C.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRAO, C. E. Exercise training improves neurovascular control and functional capacity in heart failurepatients regardless of age. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.**, v. 22, 2011.

BAKER, K. M.; ACETO, J. F. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 610-618, 1990.

BARENGO, N. C.; HU, G.; LAKKA, T. A.; PEKKARINEN, H.; NISSINEN, A.; TUOMILEHTO, J. Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women in Finland. **Eur. Heart J.**, v. 25, p. 2204-2211, 2004.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARRETTI, D. L. M.; MAGALHÃES, F. C.; FERNANDES, T.; DO CARMO, E. C.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; NEGRÃO, C. E.; OLIVEIRA, E. M. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin- angiotensin system in an obese zucker rat strain. **PLoS One**, v. 7, p. e46114, 2012.

BEZERRA, S. M.; DOS SANTOS, C. M.; MOREIRA, E.; KRIEGER, E. M.; MICHELINI, L. C. Chronic AT(1) receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. **Hypertension**, v. 38, p. 569-575, 2001.

BLANCO-RIVERO, J. ROQUE, F. R.; SASTRE, E.; CARACUEL, L.; COUTO, G. K.; AVENDAÑO, M. S.; PAULA, S. M.; ROSSONI, L. V.; SALAICES, M.; BALFAGÓN, G. Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 31, p. 916-926, 2013.

BRAITH, R. W.; WELSCH, M. A.; FEIGENBAUM, M. S.; KLUSS, H. A.; PEPINE, C. J. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. **J Am. Coll. Cardiol.**, v. 34, p. 1170-1175, 1999.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, p. 958-966, 2011.

CERONI, A.; CHAAR, L. J.; BOMBEIN, R. L.; MICHELINI, L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp. Physiol.**, v. 94, p.630-640, 2009.

CHAAR, L. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina em núcleos autonômicos de ratos normotensos e hipertensos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHAN, S. H.; WANG, L. L.; TSENG, H. L.; CHAN, J. Y. Upregulation of AT1 receptor gene on activation of protein kinase Cbeta/nicotinamide adenine dinucleotide diphosphate oxidase/ERK1/2/c-fos signaling cascade mediates long-term pressor effect of angiotensin II in rostral ventrolateral medulla. **J. Hypertens.**, v. 25, p. 1845-1861, 2007.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T.; ROCCELLA, E. J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

CLARKE, N. E.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. **Int. J. Hypertens.**, v. 12, p. 307-315, 2012.

CLAUSEN, J. P. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. **Physiol. Rev.**, v. 57, p. 779-815, 1977.

CRUZ, J. C.; CAVALLERI, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Peripheral chemoreceptors mediate training-induced plasticity in paraventricular nucleus pre-autonomic oxytocinergic neurons. **Exp. Physiol.**, v. 98, p. 386-396, 2013.

DAHLOF, B.; ZANCHETTI, A.; DIEZ, J.; NICHOLLS, M. G.; YU, C. M.; BARRIOS, V.; AURUP, P.; SMITH, R. D.; JOHANSSON, M. REGAAL Study Investigators. Effects Of Losartan And Atenolol On Left Ventricular Mass And Neurohormonal profile in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. **J. Hypertens.**, v. 20, p. 1855-1864, 2002.

DIAS-PEIXOTO, M. F.; SANTOS, R. A.; GOMES, E. R.; ALVES, M. N.; ALMEIDA, P. W.; GRECO, L.; ROSA, M.; FAULER, B.; BADER, M.; ALENINA, N.; GUATIMOSIM, S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, p. 542-548, 2008.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biol. Proced. Online**, v. 8, p.1-10, 2006.

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 50, p. 780-785, 2007.

FILHO, A. G.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, S. H.; NEVES, S. R.; SILVA CAMARGOS, E. R.; BECKER, L. K.; BELCHIOR, H. A.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 589-598, 2008.

FILHO, A. G.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, S. H.; NEVES, S. R.; SILVA CAMARGOS, E. R.; BECKER, L. K.; BELCHIOR, H. A.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 589-598, 2008.

FREITAS, O. C.; CARVALHO, F.; NEVES, J.; VELUDO, P. K.; SILVA-PARREIRA, R.; GOLÇALVES, R. M.; DE LIMA, A. S.; BESTETTI, R. B. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo. Brazil. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, p. 9-21, 2001.

GIANI, J. F.; MUÑOZ, M. C.; MAYER, M. A.; VEIRAS, L. C.; ARRANZ, C.; TAIRA, C. A.; TURYN, D.; TOBLLI, J. E.; DOMINICI, F. P. Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 298, p. 1003-1013, 2010.

GOMES, E. R.; LARA, A. A.; ALMEIDA, P. W.; GUIMARÃES, D.; RESENDE, R. R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. **Hypertension**, v. 55, p. 153-160, 2010.

GUS, I.; HARZHEIM, E.; ZASLAVSKY, C.; MEDINA, C.; GUS, M. Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 83, p. 429-433 e 424-428, 2004.

HERRING, N.; LEE, C. W.; SUNDERLAND, N.; WRIGHT, K.; PATERSON, D. J. Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 50, p. 99-106, 2011.

KAI, H.; KUDO H.; TAKAYAMA N.; YASUOKA, S.; KAJIMOTO, H.; IMAIZUMI, T. Large Blood Pressure Variability and Hypertensive Cardiac Remodeling Role of Cardiac Inflammation. **Circ. J.**, v. 12, p. 2198-2203, 2009.

KAR, S.; GAO, L.; ZUCKER, I. H. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v. 108, p. 923-932, 2010.

KATOH, N.; SHERIFF, D. D.; SIU, C. O.; SAGAWA, K. Relative importance of four pressoregulatory mechanisms after 10% bleeding in rabbits. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. 291-296, 1989.

KOJIMA, M.; SHIOJIMA, I.; YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; ZOU, Z.; WANG, Y.; MIZUNO, T.; UEKI, K.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; et al. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. **Circulation**, v. 89, p. 2204-2211, 1994.

KONG, S.; LIU, J.; YU, X.; YI, L. U.; ZANG, W. Protection against Ischemia-Induced Oxidative Stress Conferred by Vagal Stimulation in the Rat Heart: Involvement of the AMPK-PKC Pathway. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 14311-14325, 2012.

KRISTEK, F.; KOPRDOVA, R. Long-term effect of prazosin administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 62, p. 295-301, 2011.

KUDO, H.; KAI, H.; KAJIMOTO, H.; KOGA, M.; TAKAYAMA, N.; MORI, T.; IKEDA, A.; YASUOKA, S.; ANEGAWA, T.; MIFUNE, H.; KATO, S.; HIROOKA, Y.; IMAIZUMI, T. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. **Hypertension**, v. 54, p. 832-838, 2009.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 47, p. 69-85, 1970.

LATERZA, M. C.; DE MATOS, L. D.; TROMBETTA, I. C.; BRAGA, A. M.; ROVEDA, F.; ALVES, M. J.; KRIEGER, E. M.; NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Hypertension**, v. 49, p. 1298-1306, 2007.

LE CORVOISIER, P.; ADAMY, C.; SAMBIN, L.; CROZATIER B.; BERDEAUX, A.; MICHEL, J.; HITTINGER, L. U. C.; SU, J. The cardiac renin–angiotensin system Left ventricular hypertrophy in mice. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, p. 1171–1178, 2010.

MARTINEZ, D. G.; NICOLAU, J. C.; LAGE, R. L.; TOSCHI-DIAS, E.; DE MATOS, L. D.; ALVES, M. J.; TROMBETTA, I. C.; DIAS DA SILVA, V. J.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRÃO, C.E.; RONDON, M.U. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. **Hypertension**, v. 58, p. 1049-1056, 2011.

MARTINS, A. S.; CRESCENZI, A.; STERN, J. E.; BORDIN, S.; MICHELINI, L. C. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. **Hypertension**, v. 46, p. 1004-1009, 2005.

MASSON, G. S.; COSTA, T. S.; YSHII, L.; FERNANDES, D. C.; SOARES, P. P.; LAURINDO, F. R.; SCAVONE, C.; MICHELINI, L. C. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One**, v. 9, p. e94927.

MATSUZAKI, K.; MUKAI, M.; SUMIMOTO, T.; MURAKAMI, E. Effects of ACE inhibitors versus calcium antagonists on left ventricular morphology and function in patients with essential hypertension. **Hypertens. Res.**, v. 20, p. 7-10, 1997.

MELO, R. M.; MARTINHO, E. JR.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, p. 851-857, 2003.

MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R.; WALTHER, T.; TOUYZ, R. M.; REUDELHUBER, T. L. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. **Circ. Res.**, v. 103, p. 1319-1326, 2008.

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. **Hypertension**, v. 15, p. 145-150, 1990.

MINAMI, N.; IMAI, Y.; MUNAKATA, M.; SASAKI, S.; SEKINO, H.; ABE, K.; YOSHINAGA, K. Reversed circadian rhythm of blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 6, p. 70-73, 1988.

MITSUNAMI, K.; INOUE, S.; MAEDA, K.; ENDOH, S.; TAKAHASHI, M.; OKADA, M.; SUGIHARA, H.; KINOSHITA, M. Three-month effects of candesartan cilexetil an angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist, on left ventricular mass and hemodynamics in patients with essential hypertension. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 12, p. 469-474, 1998.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Res.**, v. 21, p. 103-115, 2011.

MORGAN, T. O.; ANDERSON, A.; WILSON, D. Comparative efficacy of nicardipine hydrochloride and propranolol in the treatment of hypertension. **J. Int. Med. Res.**, v. 15, p. 189-197, 1987.

MUKADDAM-DAHER, S.; MENAOUAR, A.; PAQUETTE, P. A.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J.; GILLIS, M. A.; SHI, Y. F.; CALDERONE, A.; TARDIF, J. Hemodynamic and cardiac effects of chronic eprosartan and moxonidine therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 53, p. 775-781, 2009.

OKAMOTO, K.; TABEL, R.; YAMORI, Y.; OOSHIMA, A. Spontaneously hypertensive rat as a useful model for hypertension research. **Jikken Dobutsu**, v. 22, p. 289-298, 1973.

OLIVEIRA, E. M.; SASAKI, M. S.; CERÊNCIO, M.; BARAÚNA, V. G.; KRIEGER, J. E. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 10, p. 15-23, 2009.

PEART, W. S. Evolution of renin. **Hypertension**, v. 18, p. III100-III108, 1991.

PEREIRA, M. G.; FERREIRA, J. C.; BUENO, C. R.; JR MATTOS, K. C.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E.; BRUM, P. C. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 105, p. 843-850, 2009.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A. American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, p. 533-553, 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; MIRSKY, I.; BRAUNWALD, E. Prevention of the development of heart failure and the regression of cardiac hypertrophy by captopril in the spontaneously hypertensive rat. **Eur. Heart J.**, v. 4, p. 143-148, 1983.

ROSSONI, L. V.; OLIVEIRA, R. A.; CAFFARO, R. R.; MIANA, M.; SANZ-ROSA, D.; KOIKE, M. K.; DO AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 29, p. 2349-2358, 2011.

ROVEDA, F.; MIDDLEKAUFF, H. R.; RONDON, M. U.; REIS, S. F.; SOUZA, M.; NASTARI, L.; BARRETTO, A. C.; KRIEGER, E. M.; NEGRÃO, C. E. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, p. 854-860, 2003.

SANTIAGO, N. M.; GUIMARÃES, P. S.; SIRVENTE, R. A.; OLIVEIRA, L. A.; IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosteroneacetate-salt hypertension induced cardiac dysfunction and remodeling. **Hypertension**, v. 55, p. 889-896, 2010.

SCHEUER, J.; TIPTON, C. M. Cardiovascular adaptations to physical training. **Annu Rev. Physiol.**, v. 39, p. 221-251, 1977.

SEN, S.; TARAZI, R. C. Regression of myocardial hypertrophy and influence of adrenergic system. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 97-101, 1983.

SHANKS, J.; MANOU-STATHOPOULOU, S.; LU, C. J.; LI, D.; PATERSON, D. J.; HERRING, N. Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 305, p. 980-986, 2013.

SILVA JR, S. D. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em diferentes segmentos arteriais de ratos SHR e WKY.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVA JR, S. D. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina-angiotensina cardíaco em SHR e WKY.** Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SKEGGS, L. T.; LENTZ, K. E.; KAHN, J. R.; SHUMW, N. P.; WOODS, K. R. The amino acid sequence of hypertensin II. **J. Exp. Med.**, v. 104, p. 193-197, 1956.

SUKUMARAN, V.; WATANABE, K.; VEERAVEEDU, P. T.; THANDAVARAYAN, R. A.; GURUSAMY, N.; MA, M.; YAMAGUCHI, K.; SUZUKI, K.; KODAMA, M.; AIZAWA, Y. Telmisartan, an angiotensinII receptor blocker ameliorates cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. **Hypertens. Res.**, v. 33, p. 695-702, 2010.

TANIGUCHI, H. K. T.; FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. **Exp. Physiol.**, v. 94, p. 1103-1113, 2009.

THAYER, J. F.; FISCHER, J. E. Heart rate variability, overnight urinary norepinephrine and C-reactive protein: evidence for the cholinergic anti-inflammatory pathway in healthy human adults. **J. Intern. Med.**, v. 265, p. 439-447, 2009.

THÜRMANN, P. A.; KENEDI, P.; SCHMIDT, A.; HARDER, S.; RIETBROCK, N. Influence of the angiotensin II antagonist valsartan on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 98, p. 2037-2042, 1998.

TOKUDA, K.; KAI, H.; KUWAHARA, F.; YASUKAWA, H.; TAHARA, N.; KUDO, H.; TAKEMIYA, K.; KOGA, M.; YAMAMOTO, T.; IMAIZUMI, T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. **Hypertension**, v. 43, p. 499-503, 2004.

TRASK, A. J.; GROBAN, L.; WESTWOOD, B. M.; VARAGIC, J.; GANTEN, D.; GALLAGHER, P. E.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. Inhibition of angiotensin-converting enzyme 2 exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis in Ren-2 hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 23, p. 687-693, 2010.

TSUTSUI, H.; MATSUSHIMA, S.; KINUGAWA, S.; IDE, T.; INOUE, N.; OHTA, Y.; YOKOTA, T.; HAMAGUCHIS, S. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. **Hypertens. Res.**, v. 30, p. 439-449, 2007.

TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 177-183, 2002.

VOLPE, M. Preventing cardiovascular events with angiotensin II receptor blockers: a closer look at telmisartan and valsartan. **Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.**, v. 10, p. 1061-1072, 2012.

WESTERMANN, D.; RUTSCHOW, S.; JÄGER, S.; LINDERER, A.; ANKER, S.; RIAD, A.; UNGER, T.; SCHULTHEISS, H. P.; PAUSCHINGER, M.; TSCHÖPE, C. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. **Diabetes**, v. 56, p. 641-646, 2007.

WILLIAMS, P. T. A cohort study of incident hypertension in relation to changes in vigorous physical activity in men and women. **J. Hypertens.**, v. 26, p. 1085-1093, 2008.

XIE, G.; GUO, D.; LI, Y.; LIANG, S.; WU, Y. The impact of severity of hypertension on association of PGC-1alpha gene with blood pressure and risk of hypertension. **BMC Cardiovasc. Disord.**, v. 7, p. 1471-2261, 2007.

XU, J.; CARRETERO, O. A.; LIAO, T. D.; PENG, H.; SHESELY, E. G.; XU, J.; LIU, T. S.; YANG, J. J.; REUDELHUBER, T. L.; YANG, X. P. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 299, p. H1328-H1338, 2010.

XU, S.; ZHI, H.; HOU, X.; COHEN, R.; JIANG, B. I κ B β attenuates angiotensin II-induced cardiovascular inflammation and fibrosis in mice. **Hypertension**, v. 58, p. 310-316, 2011.

YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. Role of tissue angiotensin II in myocardial remodelling induced by mechanical stress. **J. Hum. Hypertens.**, v. 13, p. 43-47, 1999.

ZAMO, F. S.; LACCHINI, S.; MOSTARDA C.; CHIAVEGATTO, S.; SILVA, I. C. M.; OLIVEIRA, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats - renin-angiotensin system modulation. **Clinics**, v. 65, p. 85-92, 2010.

ZAMO, F. S.; BARAUNA, V. G.; CHIAVEGATTO, S.; IRIGOYEN, M. C.; OLIVEIRA, E. M. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 89, p. 93-99, 2011.

ZANCHETTI, A. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 95, p. 1-51, 2010.

ZIMMERMAN, M. C.; LAZARTIGUES, E.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circ. Res.**, v. 95, p. 210-216, 2004.