GUSTAVO SANTOS MASSON

**TREINAMENTO AERÓBIO x DISFUNÇÃO
AUTÔNOMICA NA HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR EM NÚCLEOS
CENTRAIS DE REGULAÇÃO**

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

São Paulo
2014

GUSTAVO SANTOS MASSON

**TREINAMENTO AERÓBIO x DISFUNÇÃO
AUTONÔMICA NA HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR EM NÚCLEOS
CENTRAIS DE REGULAÇÃO**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelin

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Masson, Gustavo Santos.

Treinamento aeróbio x disfunção autonômica na hipertensão espontânea: uma abordagem molecular em núcleos centrais de regulação / Gustavo Santos Masson. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle central da pressão arterial no exercício e na hipertensão.

Versão do título para o inglês: Aerobic training x autonomic dysfunction in spontaneous hypertension: a molecular approach in the regulatory central nucleus.

1. Hipertensão 2. Treinamento aeróbio 3. Controle barorreflexo 4. Estresse oxidativo 5. Inflamação 6. Microglia ativada 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/SBIB0102/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gustavo Santos Masson.

Título da Tese: Treinamento aeróbio x disfunção autonômica na hipertensão espontânea: uma abordagem molecular em núcleos centrais de regulação.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **137** nas fls. **94** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Lisete Compagno Michelini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Treinamento aeróbio x disfunção autonômica na hipertensão espontânea: Uma abordagem molecular em núcleos centrais de regulação** do qual participam o(s) alunos **Gustavo Santos Masson, Sebastião Donato Silva Junior, Thais Tessari Zampieri, Adriana Ruggeri, Laiali Chaar**, 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 **07.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

**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

Of.CEUA. 024.13

São Paulo, 11 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 137/10.

*"Treinamento aeróbio x disfunção autonômica na hipertensão espontânea:
Uma abordagem molecular em núcleos centrais de regulação"*

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 07.12.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilma.Sra.
Profa Dra. Lisete Compagno Michelini
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

**Don't worry about a thing
because every little thing is gonna be alright**

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Lisete Michelinini pela oportunidade de realizar o doutorado em seu laboratório, pelos inúmeros conhecimentos ensinados e pelas várias oportunidades acadêmicas criadas.

Ao meu supervisor de “doutorado-sanduíche” Prof. Joseph Francis pela oportunidade de participar de seu grupo na Louisiana State University, pelos valiosos conselhos, pelo incentivo durante os experimentos e por todo o conhecimento transmitido.

Ao Prof. Cristóforo Scavone pela oportunidade de colaborar com seu grupo; pela oportunidade de aprender novas técnicas; por estar sempre alegre, disposto a ajudar; por ser um exemplo importantíssimo de pesquisador e professor para minha formação e, principalmente, pelos debates futebolísticos.

Ao Prof. Francisco Laurindo pela oportunidade de colaborar com seu laboratório, pela carta de recomendação para o pos-doutorado que me deixou imensamente orgulhoso; pelos muitos conhecimentos transmitidos; por ser um grande exemplo de pesquisador e professor para a minha formação.

Ao Prof. Luiz Roberto Britto pela disciplina Neurofisiologia, por ser extremamente atencioso e solícito com todos os alunos; por ser um exemplo de pesquisador e professor importantíssimo para minha formação.

Ao Prof. Pedro Paulo Silva Soares pelo grande conhecimento transmitido e pela rotina para análise que foi fundamental para o sucesso deste projeto.

À Tássia que compartilhou todos os momentos desta jornada; pelo apoio e pelo incentivo nas horas mais complicadas; por preparar o melhor strognoff do mundo e o pavê de chocolate também; pelas várias e várias gargalhadas e pelos incontáveis momentos inesquecíveis; por não ter me matado (pelo menos até agora...); por conversar sobre o projeto e auxiliar na elaboração e execução de vários experimentos.

Aos meus colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Alexandre, Carla, Leila, Raul, Junior e Maria Teresa, pelas inúmeras risadas e pelas conversas nem sempre tão científicas assim.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia Molecular, em especial a Lidia, Diana, Paula, Larissa, Ana e Andréia, que foram determinantes para o sucesso dos experimentos e pela alegria que foi trabalhar com vocês.

A todo o laboratório do Prof. Joseph Francis, em especial ao meu querido amigo Anand Nair, que tornou meu período na LSU muito divertido, me apresentou a culinária indiana e me ensinou um pouco de Malaialam.

A todo o laboratório do Prof. Francisco Laurindo, em especial à Denise Fernandes, pelos muitos conhecimentos transmitidos, pela paciência e atenção que foram cruciais para o sucesso dos experimentos.

À Rosângela por ser um grande exemplo para minha formação; por toda a atenção, pelas muitas e muitas dúvidas esclarecidas, por todo o conhecimento transmitido.

À Ana pela alegria contagiante; por ser extremamente solícita e atenciosa com todos os alunos; pelo protocolo de imuno que foi tão importante para este projeto.

Aos meus grandes amigos, Leandro, Victor e Thiago, pelo incentivo, por constituírem exemplos importantíssimos e, principalmente, por sempre perderem na sinuca.

Aos amigos do ICB, em especial ao João Esteves, sempre dispostos a ajudar e colaborar.

Ao José Maria e a Paloma que salvaram minha vida tantas e tantas vezes durante o doutorado.

Aos funcionários do Biotério do ICB e do Departamento de Fisiologia.

A todos os funcionarios do ICB pela cordialidade e amizade.

A minha mãe e ao Zé pelo apoio e incentivo irrestritos, cruciais para o sucesso desta caminhada.

Ao meu pai e à Teresa pelo apoio e incentivo, pelas inúmeras conversas fundamentais para o sucesso desta jornada.

A meus tios, em especial Fátima e César, pela torcida, pelo incentivo e, principalmente, pelas aulas de matemática e física que evitaram que eu fosse reprovado no colégio.

Ao Dominginhos, Zé Ramalho, Bob Marley, Cássia Eller, Tom Jobim, Vinícius, Bezerra da Silva, SOJA, Amy Winehouse, Luis Gonzaga, e tantos outros artistas que formaram a trilha sonora dos experimentos.

Ao Seedorf e ao Loco Abreu por terem jogado no Botafogo.

Aos ratos que literalmente se sacrificaram pelo sucesso do projeto.

RESUMO

MASSON, G. S. **Treinamento aeróbio x disfunção autonômica na hipertensão espontânea**: uma abordagem molecular em núcleos centrais de regulação. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Disfunção autonômica, inflamação e estresse oxidativo no sistema nervoso central são características importantes na hipertensão arterial. Na presente tese de doutoramento, no estudo I, investigamos a cronologia das adaptações fisiológicas e celulares, nas áreas autonômicas de regulação cardiovascular, induzidas pelo treinamento aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Segue-se o estudo II, realizado em duas etapas. Na primeira etapa, avaliamos o efeito agudo da infusão intracerebroventricular de HMGB1 nas variáveis cardiovasculares, autonômicas, celulares e moleculares em ratos normotensos. Na segunda etapa do estudo II, analisamos o efeito do treinamento aeróbio, em SHR e Wistar-Kyoto (WKY) normotensos, nestas variáveis e no conteúdo de *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) no núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN), no líquido cérebro-espinhal e no plasma. No início dos protocolos experimentais, SHR, quando comparados a WKY, apresentavam elevada PA média, FC, resistência vascular periférica, atividade simpática vascular e variabilidade da PA e do fluxo sanguíneo. SHR também exibiram valores reduzidos da BrS cardíaca e vascular, da atividade vagal cardíaca e da variabilidade da FC. No PVN, identificamos elevada produção de espécies reativas de oxigênio, atividade do NF- κ B e expressão gênica do TNF- α , da Interleucina-6 (IL6) e da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase. A expressão gênica destas citocinas pró-inflamatórias também estava aumentada na região dorsal (DBS) e ventral do tronco encefálico (VBS). Duas semanas de treinamento aeróbio promoveram, além da redução da FC, normalização da função barorreflexa cardíaca, da atividade vagal cardíaca, do estresse oxidativo, da expressão gênica da p47^{phox}, TNF- α e da IL6 e da atividade do NF- κ B. Ao longo das 8 semanas de sedentarismo, SHR demonstraram elevação da concentração dos indicadores de espécies reativas de oxigênio e da atividade do NF- κ B, no DBS e no VBS, que foram prevenidas pelo treinamento aeróbio. Após 8 semanas dos protocolos experimentais, SHR treinados apresentaram menor PA média e resistência vascular periférica. A redução do conteúdo de HMGB1 pode ser um mecanismo para explicar estas adaptações benéficas induzidas pelo treinamento aeróbio, uma vez que a infusão aguda intracerebroventricular de HMGB1 produziu elevação da PA, da FC, da variabilidade da PA sistólica e da atividade simpática cardíaca e vascular, bem como diminuição da BrS cardíaca, da atividade vagal cardíaca e da variabilidade da FC. Além das variáveis cardiovasculares, o tratamento agudo com HMGB1 promoveu ativação da microglia e estimulou a via de sinalização CxCr4, MAPK p42/p44, NF- κ B e expressão de TNF- α e da IL6 no PVN. Adicionalmente, duas semanas de treinamento aeróbio reduziram, além do conteúdo de HMGB1 no PVN, no líquido cérebro-espinhal e no plasma, a FC, a atividade simpática vascular, a atividade do NF- κ B e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e, aumentaram a BrS cardíaca, a atividade vagal cardíaca e a variabilidade da FC. A partir destes resultados podemos concluir que a redução do estresse oxidativo e da inflamação no PVN induzidas pelo treinamento aeróbio contribui para a reversão da disfunção autonômica na hipertensão espontânea, e que a redução da liberação local de HMGB1 se constitui em um dos mecanismos para explicar este benefício.

Palavras-chave: Sistema nervoso central. Barorreflexo. Estresse oxidativo. Inflamação. Núcleo paraventricular do hipotálamo. Treinamento aeróbio. Hipertensão Arterial. Microglia ativada. HMGB1.

ABSTRACT

MASSON, G. S. **Aerobic training vs autonomic dysfunction in spontaneous hypertension**: a molecular approach in the autonomic control areas. 2014. 140 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Autonomic dysfunction, oxidative stress and inflammation, in the central nervous system, are hallmarks of essential hypertension. In the present study, we analyzed the time-course of physiologic and cellular adaptations induced by exercise training in spontaneous hypertensive rats (SHR). We also evaluated in SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) the acute effects of intracerebroventricular infusion of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) on cardiovascular, cellular and molecular parameters, the effects of aerobic training in these parameters as well as HMGB1 concentration in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), cerebrospinal fluid and plasma. In the beginning of experimental protocols, SHR showed higher arterial pressure, heart rate, peripheral vascular resistance, vascular sympathetic activity and systolic arterial pressure and blood flow variability. SHR exhibited decreased gain of cardiac and vascular baroreflex, reduced vagal cardiac activity and decreased heart rate variability. In the PVN, we identified higher content of reactive oxygen species, NF- κ B activity, TNF- α and Interleukine-6 (IL6) and increased p47^{phox} NADPH oxidase subunit gene expression. These pro-inflammatory cytokines were also increased in the dorsal (DBS) and ventral brain stem (VBS). Twoweeks of training decreased heart rate, normalized cardiac baroreflex function and cardiac vagal activity, reduced reactive oxygen species and NF- κ B activity and decreased TNF- α , IL6 and p47^{phox} gene expression. During the 8-weeks experimental protocols, sedentary SHR exhibited increased reactive oxygen species concentration and NF- κ B activity into the DBS and VBS, which were prevented by aerobic training. After 8-weeks of training SHR exhibited lower arterial pressure and peripheral vascular resistance. HMGB1 reduction could be a mechanism to explain autonomic and cardiovascular benefits induced by exercise training, since intracerebroventricular infusion of HMGB1 increased arterial pressure, heart rate, decreased cardiac baroreflex control, cardiac vagal activity as well as heart rate variability. Acute treatment with HMGB1 also caused microglia activation, stimulated CxCr4, MAPK p42/p44 and NF- κ B and increased TNF- α and IL6 expression in the PVN. Additionally, 2-weeks of aerobic training decreased HMGB1 concentration into the PVN, cerebrospinal fluid and plasma, reduced heart rate, vascular sympathetic activity, NF- κ B activity and TNF- α and IL6 gene expression into the PVN. Trained SHR also showed elevated cardiac baroreflex sensitivity, vagal cardiac activity and heart rate variability. From all these data, we conclude that aerobic training decreases oxidative stress and inflammation into the PVN and contributes to autonomic and cardiovascular benefits observed in the trained SHR. HMGB1 reduction could be an important mechanism to mediate all these benefits.

Keywords: Central Nervous System. Baroreflex. Oxidative stress. Inflammation. Hypothalamic Paraventricular Nucleus. Aerobic training. Hypertension. Activated microglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental Estudo I	pag. 46
Figura 2 – Desenho experimental Estudo II	pag. 47
Figura 3 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na PA média e na FC basais em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 57
Figura 4 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no fluxo sanguíneo vascular relativo e na resistência vascular relativa em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 58
Figura 5 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no controle barorreflexo cardíaco, no intervalo de funcionamento do reflexo e no platô inferior da FC de SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 60
Figura 6 – Respostas hemodinâmicas à infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio e alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no controle barorreflexo da resistência vascular periférica e no platô inferior de SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 63
Figura 7 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na variabilidade do intervalo de pulso e do seu componente de alta frequência em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 65
Figura 8 - Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na variabilidade da PA sistólica e do seu componente de baixa frequência em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 66
Figura 9 - Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na variabilidade do fluxo sanguíneo vascular em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 67
Figura 10 – Alterações sequenciais geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no conteúdo de EOH e E em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN	pag. 69
Figura 11 – Alterações sequenciais geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no conteúdo de EOH e E em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no DBS	pag. 70
Figura 12 – Alterações sequenciais geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo no conteúdo de EOH e E em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no VB	pag. 71
Figura 13 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na expressão gênica das subunidades p47 ^{phox} e gp91 ^{phox} da NADPH oxidase em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN	pag. 72
Figura 14 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na fosforilação da MAPK p42/p44 e MAPK p38 em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN	pag. 73
Figura 15 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na atividade do NF-κB em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN	pag. 75

Figura 16 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na atividade do NF-κB em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no DBS	pag. 76
Figura 17 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo sobre a expressão de RNAm de TNF-α no DBS, VBS e PVN em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 77
Figura 18 - Redução da imunofluorescência para o TNF-α no subnúcleo ventromedial do PVN em SHR-T na 2 ^a . semana experimental quando a imunofluorescência se iguala aquela apresentada pelos WKY-S0	pag. 78
Figura 19 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo sobre a expressão de RNAm de IL6 no DBS, VBS e PVN em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 79
Figura 20 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo sobre a expressão de RNAm de IL10 no DBS e VBS em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 80
Figura 21 – Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 na PA média e na frequência cardíaca e a participação do receptor CXCR4	pag. 81
Figura 22 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na variabilidade da FC, no componente de alta frequência da variabilidade da FC e no componente de baixa frequência da variabilidade da FC, na variabilidade da PA sistólica e no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica	pag. 83
Figura 23 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na BrS e no platô inferior da curva sigmoidal do controle barorreflexo cardíaco	pag. 88
Figura 24 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na expressão protéica do SDF1 e CXCR4	pag. 90
Figura 25 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na fosforilação da MAPK p42/p44 e IκB-α	pag. 91
Figura 26 – Figuras representativa da marcação para Ib1a no PVN de ratos tratados com HMGB1 e o efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na expressão protéica de Ib1A no PVN	pag.93
Figura 27 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 na expressão protéica da IL6 e TNF-α	pag. 94
Figura 28 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na PA média e na FC em SHR e WKY	pag. 96
Figura 29 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na variabilidade da FC, no componente de alta frequência da variabilidade da FC, no componente de baixa frequência da variabilidade da FC, na variabilidade da PA sistólica e no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica em SHR e WKY durante os protocolos experimentais	pag. 97
Figura 30 – Fotos de microscopia de fluorescência ilustrando a marcação para HMGB1 no PVN em SHR e ratos WKY submetidos ao treinamento aeróbio ou mantidos sedentários. Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na expressão protéica do HMGB1 no PVN em SHR e WKY	pag. 98
Figura 31 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na concentração de HMGB1 no líquido cérebro-espinhal e no plasma em SHR e WKY	pag. 99

Figura 32 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na expressão protéica do SDF1 e do CXCR4, bem como na fosforilação da MAPK p42/p44 e do I κ B- α em SHR e WKY pag. 100

Figura 33 – Fotos de microscopia de fluorescência ilustrando a marcação para Ib1a no PVN em SHR e ratos WKY submetidos ao treinamento aeróbio ou mantidos sedentários. Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na expressão protéica do Ib1a no PVN em SHR e WKY durante os protocolos experimentais pag. 102

Figura 34 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio ou sedentarismo na expressão protéica da IL6 e do TNF- α em SHR e WKY pag. 103

Figura 35 – Sequência das adaptações fisiológicas e celulares ao treinamento aeróbio em SHR pag. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Classificação da hipertensão arterial de acordo com o 7th JNC (2003)	pag. 18
Tabela 02. Anticorpos utilizados nos diferentes estudos	pag. 54
Tabela 03. Análise estatística empregada nos diferentes estudos	pag. 55
Tabela 04. Valores basais de PA sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais	pag.57
Tabela 05. Valores basais de fluxo sanguíneo relativo e resistência vascular relativa em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais	pag. 59
Tabela 06. Valores da BrS cardíaca (BrS), da amplitude de funcionamento do barorreflexo, do platô inferior e do ponto médio da barocurva sigmoidal	pag. 61
Tabela 07. Valores basais de variabilidade da FC (VarPI) e da PA sistólica (VarPAS) e seu componente de baixa frequência (LF) e alta frequência (HF) em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais	pag. 66
Tabela 08. Valores basais de variabilidade do fluxo sanguíneo periférico em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais	pag. 68
Tabela 09. Produção de espécies reativas de oxigênio no PVN, no DBS e no VBS em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais	pag. 71
Tabela 10. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na PA média (Δ PA média)	pag. 81
Tabela 11. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na FC (Δ FC)	pag. 82
Tabela 12. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na variabilidade da FC	pag. 84
Tabela 13. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no component de alta frequência da variabilidade da FC	pag. 85
Tabela 14. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no componente de baixa frequência da variabilidade da FC	pag. 85
Tabela 15. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na variabilidade da PA sistólica	pag. 86
Tabela 16. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica	pag. 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II - angiotensina II
BH2 - 7,8-dihidrobiopterina
BH4 - tetrahidrobiopterina
BrS – sensibilidade barorreflexa
CAMKII - proteína cálcio-camoldulina quinase II
CVLM - região caudal da medula ventrolateral
CX₃CL1 - quimiocina ligante-CX₃C
DAMPs - moléculas associadas ao dano tecidual
DBS – bulbo dorsal
DEG/ENAC - canais epiteliais para sódio do tipo degerina
E – etídio
ECA2 – enzima conversora da Angiotensina II
eNOS – isoforma endotelial da NOS
EOH – 2-hidroxietídio
FC – frequência cardíaca
HF – componente de alta frequência
HMGB1- *high mobility group box-1*
Iba1 – molécula adaptadora ligada ao cálcio ionizado-1
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-6 - Interleucina-6
iNOS- isoforma induzível da NOS
IP – intervalo de pulso
JAM-1 - molécula de adesão juncional-1
JNK - Janus quinase
LF – componente de baixa frequência
LPS - lipopolissacarídeo
MAPK - quinases ativadas por mitógeno
NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
nNOS – isoforma neural da NOS
NOS – óxido nítrico sintase
NTS - núcleo do trato solitário
PA – pressão arterial
PKC - proteína quinase dependente de cálcio
PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM - região rostral da medula ventrolateral
SAPK - MAPK ativada por estresse
SDF-1 - *stromal derived factor-1*
SFO – órgão sub-fornicial
SHR - ratos espontaneamente hipertensos
SRA - sistema renina-angiotensina
TNF- α - fator de necrose tumoral- α
VBS – bulbo ventral
WKY – ratos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	Pag. 18
1.1 Epidemiologia da Hipertensão Arterial	Pag. 18
1.2 Fisiologia do Controle Cardiovascular pelo Sistema Nervoso Central	Pag. 19
1.3 Disfunção Autonômica na Hipertensão Arterial	Pag. 20
<i>1.3.1 Remodelamento das arteríolas cerebrais</i>	Pag. 23
<i>1.3.2 Ativação das fibras quimiossensíveis periféricas do corpúsculo carotídeo</i>	Pag. 23
<i>1.3.3 Atividade do SRA encefálico</i>	Pag. 25
<i>1.3.4 Alterações patológicas na barreira hematoencefálica</i>	Pag. 26
1.4 Mecanismos de retroalimentação positiva desencadeados pela hiperatividade simpática	Pag. 28
1.5 Treinamento aeróbio na hipertensão arterial	Pag. 29
1.6 Mecanismos celulares ativados em áreas autonômicas de controle cardiovascular	Pag. 31
<i>1.6.1 Vias de sinalização em áreas autonômicas: a relação entre estresse oxidativo, inflamação e SRA</i>	Pag. 31
<i>1.6.2 A relevância fisiopatológica das espécies reativas de oxigênio em áreas autonômicas de controle cardiovascular</i>	Pag. 33
<i>1.6.3 A relevância fisiopatológica das citocinas pró-inflamatórias em áreas autonômicas de controle cardiovascular</i>	Pag. 38
<i>1.6.4 Microglia: uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias</i>	Pag. 40
<i>1.6.5 HMGB1: um novo agente ativador da microglia e da inflamação neural</i>	Pag. 41
2 OBJETIVOS	Pag. 44
2.1 Objetivo geral	Pag. 44
<i>2.1.1 Objetivos específicos – Estudo I</i>	Pag. 44
<i>2.1.2 Objetivos específicos – Estudos II</i>	Pag. 44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	Pag. 45
3.1 Desenho Experimental – Estudo I	Pag. 45
3.2 Desenho Experimental – Estudo II	Pag. 46
3.3 Avaliação da capacidade aeróbia máxima	Pag. 47
3.4 Protocolo de treinamento físico ou sedentarismo	Pag. 48
3.5 Procedimento cirúrgico e registro da PA, do fluxo sanguíneo vascular e da FC	Pag. 48
3.6 Análise espectral da PA e da FC	Pag. 49
3.7 Medida do controle barorreflexo cardíaco e vascular	Pag. 50
3.8 Implantação da cânula intracerebroventricular	Pag. 50
3.9 RT-PCR em tempo real	Pag. 51
3.10 Oxidação do DHE	Pag. 52

3.11 Atividade do NF-kappaB	Pag. 52
3.12 Western Blotting	Pag. 53
3.13 Imunofluorescência	Pag. 54
3.14 Apresentação dos dados e análise estatística	Pag. 55
4 RESULTADOS	Pag. 56
4.1 Estudo I	Pag. 56
<i>4.1.1 Desempenho Físico</i>	Pag. 56
<i>4.1.2 Adaptações Cardiovasculares</i>	Pag. 56
<i>4.1.3 Adaptações Autônômicas cardíacas e periféricas</i>	Pag. 59
<i>4.1.3.1 Barorreflexo cardíaco e vascular</i>	Pag. 59
<i>4.1.3.2 Variabilidade da PA Sistólica, Intervalo de Pulso e Fluxo Sanguíneo periférico</i>	Pag. 65
<i>4.1.4 Estresse oxidativo nos núcleos regulatórios autonômicos</i>	Pag. 68
<i>4.1.5 Ativação das MAPKs</i>	Pag. 72
<i>4.1.6 Atividade do NF-κB</i>	Pag. 74
<i>4.1.7 Expressão gênica de Citocinas em áreas regulatórias autonômicas</i>	Pag. 76
4.2 Estudo II	Pag. 80
<i>4.2.1 Respostas cardiovasculares à infusão intracerebroventricular de HMGB1</i>	Pag. 80
<i>4.2.2 Respostas autonômicas à infusão intracerebroventricular de HMGB1</i>	Pag. 82
<i>4.2.3 Sinalização celular ativada pelo HMGB1 no PVN</i>	Pag. 89
<i>4.2.4 HMGB1 promove ativação de microglia e inflamação no PVN</i>	Pag. 92
<i>4.2.5 Efeitos do treinamento aeróbico nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos</i>	Pag. 95
<i>4.2.6 Efeito do treinamento aeróbico na concentração de HMGB1 no PVN</i>	Pag. 97
<i>4.2.7 Efeito do treinamento aeróbico na sinalização celular ativada pelo HMGB1 no PVN</i>	Pag. 99
<i>4.2.8 Efeito do treinamento aeróbico na ativação de microglia e inflamação no PVN</i>	Pag. 101
5 DISCUSSÃO	Pag. 105
6 CONCLUSÕES	Pag. 117
REFERENCIAS	Pag. 118
APENDICE I – Artigo publicado	Pag. 142

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial essencial ou primária consiste numa síndrome complexa, multifatorial e sem etiologia definida. Em 2003, o Comitê Nacional Americano de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Pressão Arterial (PA) Alta emitiu o sétimo guia de tratamento da hipertensão arterial (CHOBANIAN et al., 2003). Neste documento, foi revisada a classificação para diagnóstico da hipertensão arterial, conforme exibido na Tabela 01. Além desta classificação tradicional de diagnóstico da hipertensão arterial, estratificações adicionais são largamente encorajadas, uma vez que identificou-se o aumento progressivo da incidência de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e doença renal crônica nos indivíduos diagnosticados com pré-hipertensão alta (PA sistólica entre 139 e 130 mmHg/ PA diastólica entre 89 e 85 mmHg) e pré-hipertensão baixa (PA sistólica entre 129 e 120 mmHg/ PA diastólica entre 84 e 80 mmHg), quando comparado aos indivíduos com controle ótimo da PA (PA sistólica < 120 mmHg/ PA diastólica < 80 mmHg) (HUANG et al., 2013; HUANG et al., 2014).

Tabela 01 – Classificação da Hipertensão arterial de acordo com o 7th JNC (2003).

Estágio	PA Sistólica (mmHg)	PA Diastólica (mmHg)
Normal	<120	<80
Pré-hipertensão	120-139	80-89
Hipertensão Estágio I	140-159	90-99
Hipertensão Estágio II	>160	>100

A hipertensão arterial é considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes na população brasileira. De acordo com estudo conduzido pelo ministério da saúde, em 2010, através de entrevista telefônica, estima-se que em torno de 25% da população das capitais brasileiras apresente diagnóstico para hipertensão arterial. A hipertensão arterial está diretamente associada com o aumento da mortalidade cardiovascular, pois, entre os fatores de risco para mortalidade cardiovascular, a hipertensão é responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana, sendo que a mortalidade

por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da PA, a partir de 115/75 mmHg (CHOBANIAN et al., 2003). Além de sua relevância indireta através do aumento da ocorrência de eventos cardiovasculares, a hipertensão arterial apresenta um impacto direto no sistema público de saúde brasileiro, pois, de acordo com dados fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (DATASUS), apenas no segundo semestre de 2013, foram registradas 40.170 internações devido à hipertensão arterial primária, as quais geraram um gasto público superior a 13 bilhões de reais. Desta forma, se torna crucial o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para a hipertensão arterial.

1.2 Fisiologia do Controle Cardiovascular pelo Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central interage de maneira constante com o sistema cardiovascular, permitindo ajustes hemodinâmicos rápidos ou crônicos às diferentes demandas do ambiente. Para tanto, o sistema nervoso central possui sistemas de codificação das variáveis cardiovasculares e metabólicas em frequências de despolarização, o que permite o monitoramento constante da função cardiovascular e sua correção reflexa. São três mecanismos principais de monitoramento da função cardiovascular: barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares. Estes sistemas diferenciam-se pelas propriedades dos seus receptores que estimulam ou inibem o controle neural da circulação.

O reflexo do barorreceptor é tradicionalmente identificado com o principal mecanismo de regulação momento-a-momento da PA. Os barorreceptores consistem em terminações nervosas livres localizadas entre as camadas média e adventícia do arco aórtico e do seio carotídeo. Caracterizam-se pela presença dos canais epiteliais para sódio do tipo degerina (DEG/ENAC), os quais são estimulados pela deformação mecânica, uma vez que a elevação da PA distende os barorreceptores e favorece o influxo de cátions pelos canais DEG/ENAC, aumentando a frequência de despolarização destas terminações nervosas (DRUMMOND et al., 2004). Esta informação segue pelos nervos aórtico, vago e glossofaríngeo até o núcleo do trato solitário (NTS), onde ocorre a integração com as demais áreas de regulação autonômica.

A elevação da PA aumenta a ativação de neurônios secundários do NTS que estimulam a região caudal da medula ventrolateral (CVLM), a qual, através de suas projeções gabaérgicas, reduz a frequência de despolarização da região rostral da medula ventrolateral (RVLM). Na RVLM, estão localizados os neurônios pré-motores simpáticos que emitem projeções glutamatérgicas para os neurônios pós-ganglionares na coluna intermédio-lateral da medula espinhal e estes se conectam, através de projeções noradrenérgicas, ao coração e à

rede vascular. Adicionalmente, o aumento da frequência de despolarização no NTS estimula o núcleo ambíguo e o núcleo dorsal motor do vago, promovendo o aumento da atividade parassimpática ao coração. Esta rede de integração neuronal possibilita respostas reflexas à elevação da PA, como bradicardia, vasodilatação periférica e redução da contratilidade cardíaca, as quais favorecem a normalização dos valores pressóricos.

Por outro lado, a redução da PA implica na menor entrada de cátions pelo ENAC e, conseqüentemente, na redução da frequência de despolarização dos barorreceptores, possibilitando o aumento da atividade simpática, através da menor ativação da CVLM e menor inibição da RVLM. Há também menor ativação do sistema nervoso parassimpático, núcleo ambíguo e o núcleo dorsal motor do vago, pelo NTS. Assim a redução aguda da PA produz, reflexamente, taquicardia, vasoconstrição periféricas e aumento da contratilidade cardíaca.

Além da participação das áreas bulbares no controle do funcionamento do barorreflexo, diversos trabalhos do grupo liderado pela Dra. Lisete Michelini do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo identificaram o papel modulatório do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na regulação do funcionamento do barorreflexo através de suas projeções vasopressinérgicas (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI; BONAGAMBA, 1988) e ocitocinérgicas (HIGA-TANIGUCHI et al., 2009; MARTINS et al., 2005) ao bulbo dorsal. Desta forma, as respostas reflexas que corrigem as variações instantâneas da PA podem ser moduladas e adaptadas a diferentes situações comportamentais, bem como alterações patológicas, como é o caso da hipertensão arterial. (MICHELINI, 2009).

1.3 Disfunção Autonômica na Hipertensão Arterial

Apesar de a elevação dos valores pressóricos *per se* não levar ao óbito, os mecanismos fisiopatológicos relacionados com a gênese da hipertensão arterial primária ou essencial favorecem o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo, como o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, entre outros. Na medida em que a hipertensão arterial é uma síndrome complexa e multifatorial, diversos mecanismos se sobrepõem e constituem alças de retroalimentação positiva, contribuindo para a progressão da disfunção cardiovascular. Entre esses mecanismos, a disfunção do sistema nervoso central ou desequilíbrio autonômico ocupa um lugar de destaque na fisiopatologia da hipertensão arterial, contribuindo para a mortalidade cardiovascular (DE SOUZA et al., 2013; KIKUYA et al., 2000;

VIVEKANANTHAN et al., 2003) e sendo considerada um dos principais alvos terapêuticos nesta patologia (CHOBANIAN et al., 2003).

A disfunção autonômica é caracterizada pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático, pela redução da atividade do sistema nervoso parassimpático e pelo funcionamento anormal dos mecanismos de controle autonômico da função cardiovascular controlados pelos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares. A redução da sensibilidade barorreflexa (BrS), que é um marcador independente de prognóstico na coronariopatia (LA ROVERE et al., 1998) e na hipertensão arterial (ORMEZZANO et al., 2008), implica no aumento das oscilações da PA sistólica e gerando, conseqüentemente, maiores oscilações da pressão hidrostática no capilar, as quais expõem os diferentes tecidos a breves períodos de redução da pressão de perfusão acompanhados pela queda da pressão parcial de oxigênio. Por outro lado, o aumento da variabilidade da PA sistólica também expõe os diferentes tecidos a breves períodos de elevada pressão hidrostática no capilar, produzindo lesões na célula endotelial e rarefação capilar. Desta forma, o aumento da variabilidade da PA sistólica, induzido pela disfunção barorreflexa, favorece o desenvolvimento das lesões de órgão-alvo em função da hipóxia tecidual, lesão endotelial e/ou rarefação capilar (SHAN et al., 2001; SU; MIAO, 2002; XIE et al., 2003).

Em adição ao desenvolvimento de lesões de órgão-alvo induzido pela disfunção autonômica, o aumento da atividade simpática propicia ainda a hiperativação do sistema renina-angiotensina (SRA) plasmático, uma vez que a estimulação simpática renal induz a liberação de renina, pelas células justaglomerulares, a qual é responsável pela clivagem do Angiotensinogênio em angiotensina I. A enzima conversora da angiotensina, presente majoritariamente nas células endoteliais, catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II (ANG II), a qual, através do receptor AT_1 , induz respostas tróficas relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, favorecendo o remodelamento tecidual e o desenvolvimento de lesões de órgão-alvo, como a hipertrofia cardíaca, a glomeruloesclerose e a retinopatia. Além dos efeitos mediados pela ANG II, a interação da renina com receptores pró-renina presentes nos diferentes tecidos tem sido associada à ativação adicional de vias de sinalização oxidantes e inflamatórias e, conseqüentemente, ao agravamento de lesões em órgãos-alvo (HIGASHIKUNI et al., 2012; KAVVADAS et al., 2013; WHALEY-CONNELL et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2009).

Adicionalmente aos efeitos do SRA plasmático, a produção local de ANG II no tecido encefálico (CAO et al., 2012; CHAN et al., 2007; CHEN et al., 2011; CHEN et al., 2010; GAO et al., 2004; KANG et al., 2014; KANG et al., 2009; LOB et al., 2013; NORTHCOTT

et al., 2010; OLIVEIRA-SALES et al., 2010; POLSON et al., 2007; QI et al., 2013; SAKAI et al., 2007; SINNAYAH et al., 2006; SRIRAMULA et al., 2011; TAN et al., 2007; WANG et al., 2013; WANG et al., 2007; YAMAZATO et al., 2007; YOUNG et al., 2012; ZIMMERMAN et al., 2002), cardíaco (NAITO et al., 2002; SANO et al., 1998; VARAGIC, FROHLICH, 2002; XU et al., 2010; WHALEY-CONNELL et al., 2007; ZHUO, LI., 2011) e renal (HARTONO et al., 2014; LI; ZHUO, 2013; NI et al., 2013; ZHUO et al., 2013) contribui para agravar os efeitos deletérios da hipertensão arterial. Desta forma, a produção tecidual da ANG II intensifica a disfunção em diferentes órgãos, possibilitando a hiperatividade simpática, a hipertrofia cardíaca e a glomérulo esclerose.

A relação temporal entre a elevação da PA e a disfunção autonômica pode caracterizar uma relação de causa-efeito entre estes fenômenos. Ainda na década de 80, Minami et al. (1989) descreveram redução da bradicardia reflexa à infusão de fenilefrina em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) jovens. Nestes animais, descreveram-se ainda alterações plásticas no sistema nervoso simpático, indicadas pelo maior número de vesículas em terminações nervosas (ALBERT; CAMPBELL, 1990) e maior concentração de noradrenalina no tecido muscular liso e no tecido adiposo (CABASSI et al., 1998). Embora os SHR jovens apresentassem níveis pressóricos similares aos dos ratos normotensos. Outras anormalidades na atividade simpática, como a hiperatividade do quimiorreflexo periférico (SIMMS et al., 2009; TAN et al., 2010), alterações na liberação e recaptção de noradrenalina, maior liberação do co-neurotransmissor neuropeptídeo Y no músculo cardíaco (SHANKS et al., 2013) e modificações no transiente de cálcio em neurônios simpáticos das células gânglio cervical superior (LI et al., 2012), também foram descritas na fase pré-hipertensiva dos SHR. Coletivamente, esses estudos indicam que alterações na plasticidade do sistema nervoso central e periférico precedem a elevação da PA e podem desempenhar um papel causativo na hipertensão arterial.

Na medida em que a disfunção autonômica vem sendo identificada como uma das principais causas da hipertensão arterial, diferentes teorias (disfunção barorreflexa, ativação dos quimiorreceptores centrais induzida pelo remodelamento arteriolar, ativação das células globulares quimiossensíveis periféricas, aumento da atividade do SRA encefálico e alterações na barreira hematoencefálica) têm sido propostas para explicar o funcionamento anormal do sistema nervoso na hipertensão.

1.3.1 Remodelamento das arteríolas cerebrais

Uma explicação para a hiperatividade simpática na hipertensão arterial foi fornecida por estudos do grupo do Dr. Julian Paton na Universidade de Bristol (UK). Neste elegante trabalho, os autores evidenciaram que os SHR neonatos (10 a 96 dias de idade) apresentam aumento da espessura da parede e da razão parede/luz da artéria vertebral quando comparado com ratos normotensos. Através da perfusão encefálica *ex-vivo*, os autores verificaram que os SHR pré-hipertensos apresentaram maior pressão hidrostática do que os animais normotensos, quando ambos eram submetidos ao mesmo fluxo. Esses resultados caracterizaram a maior resistência vascular na artéria vertebro-basilar. A fim de se comprovar o efeito da redução da pressão hidrostática capilar na ativação simpática, esses autores demonstraram ainda, na preparação coração-cérebro, que a oclusão da artéria vertebral promovia aumento da modulação simpática dos nervos frênico e torácico (CATES et al., 2011) e que a oclusão de 60% do fluxo sanguíneo para o troncoencefálico determinava aumento da expressão do Hypoxyprobe-1, um marcador de hipóxia celular, no NTS, e, conseqüentemente, a elevação da PA em ratos Wistar (WAKI et al., 2011). Coletivamente, esses resultados indicam que o remodelamento arteriolar cerebral, nos SHR jovens, contribui para a elevação da atividade simpática e para o desenvolvimento da hipertensão arterial.

1.3.2 Ativação das fibras quimiossensíveis periféricas do corpúsculo carotídeo

Como o aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias encontra-se diretamente associado à elevação da PA (CHAE et al., 2001; CHAMARTHI et al., 2011; ELGHANNAM et al., 2000) e à disfunção autonômica (HAENSEL et al., 2008; KON et al., 2006), a ativação das células glomais do corpúsculo carotídeo, e subsequente estimulação do sistema nervoso simpático pelas citocinas pró-inflamatórias, foi recentemente identificada como um possível mecanismo para explicar a relação entre inflamação sistêmica crônica e disfunção autonômica. Este mecanismo para a gênese da atividade simpática foi sugerido a partir da identificação dos receptores para citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) nestas células (LAM et al., 2008). Reyes et al. (2012) já haviam observado que a administração aguda de lipopolissacarídeo (LPS) aumentava a expressão do c-fos, um marcador de atividade neuronal, no NTS, e que esta resposta era abolida pela neurotomia carotídea bilateral. Na medida em que a administração aguda de LPS induz a rápida liberação de citocinas pró-inflamatórias no plasma, o grupo liderado pelo Dr. Bai-Ren Wang do Instituto de Neurociências da 4^a. Universidade Medica Militar (China) conduziu dois estudos que

demonstraram que a administração intraperitoneal de IL-1 β ou IL-6 ativa o quimiorreflexo periférico, uma vez que observaram aumento da frequência de despolarização dependente de cálcio da célula do tipo I, bem como maior liberação de catecolaminas plasmáticas (FAN et al., 2009; SHU et al., 2007). Além do efeito da administração sistêmica destas citocinas, diversos estudos (DVORAKOVA et al., 2000; LIU et al., 2012; LIU et al., 2009) identificaram a presença de macrófagos no corpúsculo carotídeo em ratos saudáveis submetidos à hipóxia crônica, os quais são importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias neste tecido (LIU et al., 2009). Outros estudos observaram ainda a participação da endotelina-1 (PENG et al., 2013), das espécies reativas de oxigênio (PENG et al., 2003) e do SRA tecidual (LAM et al., 2014) na ativação das células glomais do corpúsculo carotídeo durante a hipóxia crônica. Reforçando o papel fisiopatológico da ativação do quimiorreflexo periférico induzida pela inflamação e estresse oxidativo, Mkrtchian et al. (2012) identificaram, em humanos, a presença de mediadores inflamatórios (toll-like receptor 1 e 4, HMGB1, receptores do TNF- α e IL-1 β e o fator de transcrição NF- κ B) no corpúsculo carotídeo, os quais atuariam em sinergismo com o SRA tecidual e o estresse oxidativo para promover a ativação das células glomais.

A disfunção quimiorreflexa na hipertensão arterial é classicamente descrita, desde a década de 80 do século XX, em modelos experimentais de hipertensão arterial essencial (PRZYBYLSKI et al., 1980). Corroborando a importância da ativação do quimiorreflexo periférico na gênese da hiperatividade simpática durante o desenvolvimento da hipertensão arterial, alguns estudos identificaram a hiperatividade das células glomais do corpúsculo carotídeo em SHR jovens (ABDALA et al., 2012; SIMMS et al., 2009; TAN et al., 2010). De maneira interessante, a desnervação seletiva do corpúsculo carotídeo promoveu redução da PA (ABDALA et al., 2012; MCBRYDE et al., 2013), da atividade simpática e da infiltração de macrófagos no tecido muscular liso (MCBRYDE et al., 2013) em SHR. Em conjunto estas observações sugerem que a ativação das células globulares do corpúsculo carotídeo pelas citocinas pró-inflamatórias, em sinergismo com a ativação do SRA e o estresse oxidativo, contribuem para o estabelecimento da disfunção autonômica e da hipertensão arterial.

1.3.3 Atividade do SRA Encefálico

Como descrito anteriormente, a expressão dos vários componentes do SRA nos diferentes tecidos contribui de maneira decisiva para o desenvolvimento das lesões de órgão-alvo na hipertensão arterial. No sistema nervoso central, a participação do SRA pode ser dividida em duas categorias, as quais possivelmente ocorrem simultaneamente, de acordo com a localização anatômica da área autonômica ativada: extra-barreira hematoencefálica e intra-barreira hematoencefálica.

Os efeitos cardiovasculares do SRA encefálico extra-barreira hematoencefálica ocorrem majoritariamente no órgão sub-fornicial (SFO), (HOFFMAN; PHILLIPS, 1976; MITRIUS; ROUTTENBERG, 1977; PHILLIPS; FELIX, 1976). Com o desenvolvimento dos animais transgênicos, das ferramentas de biologia molecular e da técnica para infusão crônica intracerebroventricular de ANG II, uma série de estudos conduzidos pelo grupo liderado pela Dra. Robin Davisson da Universidade de Cornell e pelo Dr. Curt Sigmund da Universidade de Iowa, ambos dos Estados Unidos, demonstraram que o silenciamento do SRA tecidual no SFO, através da ablação gênica do angiotensinogênio (SAKAI et al., 2007; SINNAYAH et al., 2006) ou da administração do bloqueador de receptores AT₁ (SAKAI et al., 2007), abolia a resposta pressora (SINNAYAH et al., 2006) e dipsogênica (SAKAI et al., 2007) em camundongos transgênicos que superexpressavam o angiotensinogênio e a renina no encéfalo. Foi ainda caracterizado que o estresse oxidativo (LOB et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2002), a ativação dos receptores de prostraglandinas (CAO et al., 2012; WANG et al., 2013) e o estresse do retículo endoplasmático (YOUNG et al., 2012) constituem mecanismos importantes para a desencadear a elevação da PA induzida pela administração subcutânea de ANG II. Estes mecanismos moleculares serão discutidos detalhadamente.

Já os efeitos cardiovasculares do SRA encefálico intra-barreira hematoencefálica, ou seja, em áreas autonômicas protegidas pela barreira hematoencefálica, como PVN, RVLM e NTS, também foram sugeridos (AVERILL et al., 1994; BARNES et al., 1991; MATSUMURA et al., 1998; MURATANI et al., 1991; TONEY; PORTER, 1993, 1993). Também o advento das técnicas de biologia molecular e da infusão crônica no sistema nervoso central permitiram que o grupo do Dr. Joseph Francis na Louisiana State University (Estados Unidos) demonstrasse que a administração crônica intracerebroventricular (KANG et al., 2009) ou no PVN (KANG et al., 2014; QI et al., 2013) do bloqueador do receptor AT₁ inibe efeitos fisiológicos (elevação da PA e da atividade simpática renal e, no PVN, além da redução do ácido gama aminobutírico, aumento da liberação de noradrenalina e glutamato) e

celulares (expressão de citocinas pró-inflamatórias, da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase e do receptor AT₁) induzidos pela administração subcutânea crônica de ANG II. Ainda, Sriramula et al. (2011) demonstraram que a superexpressão da enzima conversora da ANG II (ECA2), no PVN, a qual cliva a ANG II em ANG (1-7), atenua a elevação da PA, do receptor AT₁, da enzima conversora da angiotensina e das citocinas pró-inflamatórias em modelo de hipertensão arterial dependente de ANG II. Em estudo adicional, utilizando a transfecção viral no PVN, demonstrou-se que o silenciamento do receptor AT₁ inibe o efeito pressórico agudo produzido pela administração sistêmica de ANG II (NORTHCOTT et al., 2010). Além do PVN, diferentes estudos demonstraram que o antagonismo de receptores AT₁ na RVLM (CHAN et al., 2007; DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010) e a superexpressão da ECA2 (YAMAZATO et al., 2007) inibe a elevação da PA e da atividade simpática renal induzidas pelo tratamento intracerebroventricular com ANG II (CHAN et al., 2007) ou pela hipertensão renovascular (OLIVEIRA-SALES et al., 2010) e/ou essencial (YAMAZATO et al., 2007). Chen et al. (2010) também observaram que a infusão de adenovírus que expressa o receptor AT_{1A} na RVLM restabelece a resposta pressora e simpática induzida pela administração central de ANG II em camundongos *knockout* para o receptor AT₁. Cabe ainda ressaltar que Gao et al. (2004) já haviam identificado que o antagonismo de receptores AT₁, na RVLM, de SHR atenua a disfunção barorreflexa.

Além do PVN e da RVLM, que contem os neurônios pré-motores simpáticos, a atividade do SRA também tem sido extensamente investigada no NTS, devido a sua importância para a função barorreflexa e a ativação dos núcleos parassimpáticos. Nesse sentido, alguns estudos revelaram que a administração de ANG II no NTS promove redução da BrS cardíaca e da atividade simpática renal, sendo que o pré-tratamento com antagonista do receptor AT₁ inibe este efeito (POLSON et al., 2007; TAN et al., 2007; WANG et al., 2007). Na hipertensão arterial essencial, a redução da concentração de ANG II promovida pela superexpressão da ECA2, no NTS, normaliza a BrS (YAMAZATO et al., 2011). Portanto, podemos afirmar que o aumento da sinalização do receptor AT₁, no NTS, assim como em outras áreas autonômicas contribui para a instalação da disfunção autonômica e, consequentemente, da hipertensão arterial.

1.3.4 Alterações patológicas na barreira hematoencefálica

A disfunção na barreira hematoencefálica (alterações na permeabilidade e/ou diapedese de células mononucleares hematopoiéticas) também induz disfunção autonômica. O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, na hipertensão renovascular, foi

originalmente descrito por Sonkodi et al. (1970) que observaram, através da técnica de marcação com dióxido de tório associada à microscopia eletrônica, a incorporação das partículas de ferritina livre de cádmio nas células gliais. O papel causativo de disfunções na barreira hematoencefálica, na hipertensão arterial, foi ainda evidenciado pelos estudos de Bailey et al. (2011) e Hom et al. (2007), o quais descrevem que o aumento da permeabilidade precede a elevação da PA.

A sinalização da ANG II tem sido considerada um dos principais mecanismos que induzem o desenvolvimento de alterações na barreira hematoencefálica, pois ratos tratados com o antagonista de receptores AT₁ (AWAD, 2006; KAYA et al., 2003; KUCUK et al., 2002; PELISCH et al., 2011), assim como animais *knockout* para o receptor AT₁ (VITAL et al., 2010), não exibiam esta alteração patológica em diferentes modelos de hipertensão arterial. O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pela ANG II também está associado ao aumento da expressão de espécies reativas de oxigênio (KALAYCI et al., 2005) e de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2010) na microcirculação cerebral. De fato, a ativação do SRA encefálico e a maior permeabilidade da barreira hematoencefálica, parecem constituir um mecanismo de retroalimentação positiva de disfunção autonômica, uma vez que Capone et al. (2012) demonstraram, em modelo de hipertensão ANG II-dependente, que o bloqueio da sinalização oxidativa no SFO inibe alterações endoteliais na rede vascular cerebral, mediadas pela endotelina-1 e vasopressina. Além da disfunção na microcirculação cerebral promovida pelo SRA encefálico, Biancardi et al. (2014) e Ueno et al. (2004) identificaram, no PVN, alterações da barreira hematoencefálica, permitindo o extravasamento da ANG II plasmática com consequente aumento da atividade simpática e da PA (BIANCARDI et al., 2014). Em conjunto, estes resultados sugerem que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica favorece o estabelecimento da disfunção autonômica e, conseqüentemente, da hipertensão arterial, através da sinalização via receptor AT₁ nas áreas autonômicas de regulação, sobretudo no PVN.

A diapedese nestas áreas autonômicas é outro processo fisiopatológico que altera a integridade da barreira hematoencefálica e possibilita o desenvolvimento da disfunção autonômica na hipertensão arterial. Assim como no estabelecimento da lesão aterosclerótica, o aumento da expressão de moléculas de adesão permite a migração de células mononucleares, como linfócitos T e monócitos, presentes na circulação para o tecido encefálico protegido pela barreira hematoencefálica. Uma vez no tecido nervoso central, essas células apresentam comportamento semelhante a macrófagos residentes (microglia ativada)

que constituem, majoritariamente, uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias. Estudos conduzidos pelo grupo liderado pelo Dr. Julian Paton demonstraram que os SHR, na fase pré-hipertensiva, apresentam elevada expressão gênica da molécula de adesão juncional-1 (JAM-1) no NTS, RVLM e PVN quando comparados aos animais normotensos (XU et al., 2012; WAKI et al., 2007). Estes autores identificaram ainda que a superexpressão da JAM-1, no NTS, através de transfecção viral, elevou a PA média em torno de 15 mmHg em ratos Wistar, 7 dias após a administração do adenovírus. Curiosamente, não foi observada alteração significativa na BrS (WAKI et al., 2007). Adicionalmente, Xu et al. (2012) identificaram aumento da expressão da JAM-1, no NTS, na hipertensão-dependente de ANG II ou renovascular, bem como em células endoteliais da veia safena de pacientes hipertensos. Pode-se, portanto, sugerir que o aumento da expressão da JAM-1 em áreas autonômicas de controle cardiovascular, sobretudo no NTS, contribui para a diapedese leucocitária, ativação da microglia e inflamação, desencadeando o estabelecimento da hipertensão arterial.

1.4 Mecanismos de retroalimentação positiva desencadeados pela hiperatividade simpática

O estabelecimento da disfunção autonômica estimula diferentes mecanismos que favorecem a progressão e a perpetuação da hiperatividade simpática. Classicamente, a ativação do SRA plasmático é identificada como um dos principais mecanismos de manutenção da disfunção autonômica. O aumento da concentração de ANG II na circulação induz a elevação da atividade simpática através da estimulação de neurônios pré-motores simpáticos, facilitando a transmissão ganglionar, e a liberação de catecolaminas nas terminações nervosas de neurônios pós-ganglionares simpáticos. A disfunção autonômica também contribui para a elevação da concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias, as quais estimulam as fibras quimiossensíveis periféricas, contribuindo para manutenção da hiperatividade simpática e da hipertensão arterial. Nesse sentido, os estudos desenvolvidos pelo grupo liderado pelo Dr. Kevin Tracey no Instituto Feinstein para Pesquisa Médica (Estados Unidos) demonstraram que o aumento da atividade dos núcleos vagais (ambíguo e dorsal motor do vago) facilita liberação de catecolaminas pelo nervo esplênico no baço. As catecolaminas interagem com os receptores β_3 -adrenérgicos das células T, aumentando a atividade da enzima colina acetiltransferase e, conseqüentemente, a liberação de acetilcolina pelas células T no baço. A acetilcolina se liga aos receptores $\alpha 7$ -nicotínicos dos macrófagos residentes no baço, o que reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α ,

frente à administração intraperitoneal de LPS e em diferentes modelos de doenças inflamatórias crônicas (BRUCHFELD et al., 2010; HUSTON et al., 2009; OLOFSSON et al., 2012; REARDON et al., 2013; ROSAS-BALLINA et al., 2011). Adicionalmente, Wang et al. (2014) demonstraram que o aumento da atividade do núcleo dorsal motor do vago modifica o perfil dos macrófagos esplênicos de M1 (perfil pró-inflamatório) para M2 (perfil anti-inflamatório e reparador), o que contribuiu para o aumento da sensibilidade insulínica e redução da obesidade visceral em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Estes resultados sugerem que a redução da descarga vagal para o baço induz o aumento do perfil pró-inflamatório dos macrófagos residentes no baço, contribuindo para o aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias e a maior ativação das terminações nervosas quimiossensíveis periféricas.

1.5 Treinamento aeróbio na hipertensão arterial

Dentre as mudanças de estilo de vida, o treinamento aeróbio é considerado uma das principais estratégias não farmacológicas para a redução da PA em hipertensos. Meta-análises recentes descreveram que um programa regular de exercícios aeróbios, em pacientes hipertensos, reduz a PA sistólica e diastólica em torno de 8 e 5 mmHg, respectivamente (CORNELISSEN; SMART, 2013; FAGARD, 2006). Entre os diversos mecanismos responsáveis pelo efeito hipotensor crônico do treinamento aeróbio, a reversão da disfunção autonômica, a redução da atividade simpática e o remodelamento arteriolar eutrófico são apontados como os benefícios principais desta estratégia não farmacológica em estudos clínicos (COLLIER et al., 2009; LATERZA et al., 2007; MADDEN et al., 2010) e em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial (AMARAL et al., 2000; BERTAGNOLLI et al., 2006; BRUM et al., 2000; CERONI et al., 2009; MASSON et al., 2014; MELO et al., 2003; MORAES-SILVA et al., 2010; PAN et al., 2007). A reversão da disfunção autonômica é caracterizada pela redução da atividade simpática para vasos, rins e coração (BURGI et al., 2011) e pelo aumento da atividade parassimpática e da sensibilidade do barorreflexo e quimiorreflexo periférico (CRUZ et al., 2013). Demonstrando estes benefícios em pacientes hipertensos que nunca receberam tratamento farmacológico, Laterza et al. (2007) identificaram que o treinamento aeróbio, 4 meses de treinamento com frequência semanal de 3 sessões de 60 minutos a 70% do consumo máximo de oxigênio, normaliza a descarga simpática para o músculo esquelético e o controle barorreflexo da frequência

cardíaca (FC) e da atividade simpática muscular. Em SHR, uma série de estudos conduzidos pelo grupo da Dra. Lisete Michelini demonstraram que o treinamento aeróbio reduz a excitabilidade dos neurônios pré-motores simpáticos no PVN (STERN et al., 2012) e aumenta a densidade das projeções ocitocinérgicas do PVN ao complexo NTS-DMV (BRAGA et al., 2000; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013; HIGA et al., 2002; MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007; MICHELINI; STERN, 2009), o que contribui para o aumento da atividade vagal e, conseqüentemente, para a redução da FC de repouso e da taquicardia do exercício em intensidades submáximas, bem como para o aumento da sensibilidade do controle barorreflexo cardíaco. No que diz respeito às adaptações celulares, estudos recentes em SHR, associaram a redução da PA com a diminuição do SRA encefálico, a diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias e das subunidades gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox} da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) no PVN (AGARWAL et al., 2011; JIA et al., 2014), na RVLM (AGARWAL et al., 2011; KISHI et al., 2012) e no NTS (FELIX, MICHELINI, 2007). Contudo, estes autores não correlacionaram estas alterações com a função autonômica e nem determinaram a sequência temporal das adaptações cardiovasculares induzidas pelo treinamento aeróbio, sugerindo uma relação causal entre as alterações plásticas/funcionais nos núcleos autonômicos e os benefícios cardiovasculares. Outra lacuna sobre as adaptações autonômicas induzidas pelo treinamento aeróbio é o efeito desta estratégia não farmacológica de tratamento da hipertensão arterial no controle barorreflexo da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, na variabilidade do fluxo sanguíneo periférico, o qual encontra-se intimamente relacionado com o desenvolvimento de lesão de órgãos-alvo na hipertensão arterial.

Além das respostas autonômicas, as adaptações vasculares induzidas pelo treinamento aeróbio também contribuem para a queda da PA. Neste sentido, alguns estudos demonstraram que o treinamento aeróbio reduz a razão parede/luz arteriolar e aumenta o número de capilares/fibra da musculatura esquelética ativada durante o exercício, colaborando para a menor resistência vascular periférica e PA média observada nos animais hipertensos treinados (AMARAL et al., 2000; JORDAO et al., 2011; MELO et al., 2003). Além da rede vascular utilizada durante a sessão de exercício, outros estudos demonstraram que o treinamento aeróbio também reverte o remodelamento arteriolar em territórios não-locomotores, como o da circulação inativada durante o exercício, como as arteríolas do músculo temporal (MELO et al., 2003) e as arteríolas da circulação mesentérica (ROQUE et al., 2013). O aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e a redução do desacoplamento da NOS, decorrentes do aumento da biodisponibilidade de tetrahidrobiopterina (BH4), da redução da liberação de

ânion superóxido e da expressão da isoforma induzível da NOS, foram descritos como os mecanismos moleculares relacionados com estas adaptações vasculares ao treinamento aeróbio em SHR (ROQUE et al., 2013) e em ratos idosos (SINDLER et al., 2009; SPIER et al., 2007; SPIER et al., 2004). Entretanto, a análise da relação temporal entre as adaptações autonômicas e a redução da resistência vascular periférica e da PA ainda não foi descrita.

1.6 Mecanismos celulares ativados em áreas autonômicas de controle cardiovascular

1.6.1 Vias de sinalização em áreas autonômicas: a relação entre estresse oxidativo, inflamação e SRA

Os mecanismos desencadeantes da disfunção autonômica, discutidos anteriormente, apresentam uma característica comum: o aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio e das citocinas pró-inflamatórias nas regiões autonômicas de controle cardiovascular. A relação entre o estresse oxidativo e a inflamação constituem um mecanismo de retroalimentação positiva através da ativação de diferentes vias de sinalização nos vários tipos celulares presentes no sistema nervoso central. As principais vias de sinalização descritas em áreas autonômicas iniciam-se pela interação da ANG II com seu receptor AT₁, embora as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) também possam desencadear efeitos similares aos da ANG II (CHI et al., 2014; XIA et al., 2014). Assim, a ativação do receptor AT₁ promove o aumento da concentração citosólica de cálcio pela ativação da fosfolipase A₂, a qual produz o segundo mensageiro, o inositol 3-fosfato, que interage com receptores específicos presentes na membrana do retículo endoplasmático, favorecendo a extrusão de cálcio de seu interior para o citosol. O aumento da concentração citosólica de cálcio induz a fosforilação dos domínios autoinibitórios da subunidade regulatória p47^{phox} da NADPH oxidase através da ativação da isoforma β da proteína quinase dependente de cálcio (PKC). A fosforilação dos resíduos serina 303, 304 e 328 dos domínios autorregulatórios da subunidade regulatória p47^{phox} da NADPH oxidase possibilita a migração desta proteína do citosol para a membrana plasmática, onde esta subunidade se reúne com as demais subunidades da NADPH oxidase, desencadeando a redução da molécula de oxigênio e a liberação do ânion superóxido (CHAN et al., 2007; WANG et al., 2013; WANG et al., 2006). Especificamente no PVN e no NTS, alguns estudos (COLEMAN et al., 2013; GLASS et al., 2006; GLASS et al., 2007) demonstraram que a administração subcutânea crônica de ANG II promove a migração da subunidade p47^{phox} para a membrana plasmática em dendritos de neurônios não vasopressinérgicos (COLEMAN et al., 2013), co-localizando-se com as subunidades p22^{phox} e

gp91^{phox} (GLASS et al., 2006). Consistente em dados, Coleman et al. (2013) identificaram que a ANG II promove estresse oxidativo preferencialmente em neurônios não vasopressinérgicos e a ativação aguda de receptor NMDA, estimulando a síntese de espécies reativas de oxigênio tanto em neurônios vasopressinérgicos quanto em neurônios não vasopressinérgicos. Interessante notar-se que, em condições basais, a p47^{phox} parece estar preferencialmente localizada em associação com membranas de estruturas celulares relacionadas à homeostase do cálcio intracelular, como o retículo endoplasmático liso e a membrana externa mitocondrial, sugerindo um controle redox da homeostase do cálcio (COLEMAN et al., 2013; GLASS et al., 2006, 2007).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio possibilita a inativação de tirosina-fosfatases através da oxidação das cisteínas presentes nos domínios catalíticos das fosfatases, como a SHP-2 que possui papel importante no remodelamento vascular induzido pela ANG II (TABET et al., 2008). Desta forma, a liberação de superóxido pela NADPH oxidase possibilita a ativação de vias redox-sensíveis, como as quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Neste sentido, estudos do grupo da Dr. Julie Chan demonstraram que a ANG II induz a fosforilação da MAPK p38 e da MAPK p42/p44 na RVLM, onde a ativação da MAPK p38 estaria relacionada com a resposta aguda e associada com a maior liberação, para a fenda sináptica, de vesículas contendo neurotransmissores e a facilitação da ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes. Já a estimulação da MAPK p42/p44 está associada com a ativação do fator de transcrição CREB e a maior expressão do receptor AT₁ (CHAN et al., 2007; CHAN et al., 2005; ENDOH, 2005; KISHI et al., 2010). No PVN, o grupo liderado pelo Dr. Robert Felder na Universidade de Iowa (Estados Unidos) demonstrou que a administração crônica e intracerebroventricular de ANG II promove a fosforilação das MAPKs (WEI et al., 2009) e o silenciamento da MAPK p42/p44, mas não o da MAPK p38, inibe a resposta pressora e o aumento da expressão gênica do receptor AT₁, no PVN e no SFO, induzido pela administração crônica de ANG II (YU et al., 2013). Além da p42/p44 e da p38, o papel fisiopatológico da MAPK ativada por estresse (SAPK) ou Janus quinase (JNK) foi determinado por Burmeister et al. (2011), os quais observaram que o silenciamento gênico desta MAPK inibe a elevação da PA na hipertensão renovascular.

A ativação de vias de sinalização redox-sensíveis modifica o fenótipo celular através da ativação de determinados fatores de transcrição. A fosforilação da MAPK p42/p44 induz a fosforilação da proteína inibitória do fator de transcrição NF-κB, a Iκb-α, e, consequentemente a migração do NF-κB do citosol para o núcleo celular. A Iκb-α fosforilada é ubiquitinada e degradada pela via do proteossoma. A fosforilação do Iκb-α também é

desencadeada pela interação do TNF- α com seu receptor TNFR1, pois a via de sinalização deste receptor culmina na ativação da proteína IKK a qual também fosforila a I κ B- α , permitindo a ativação do NF- κ B. O NF- κ B tem sido considerado o principal fator de transcrição no controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. Sua relevância terapêutica na hipertensão arterial foi demonstrada pelo grupo coordenado pelo Dr. Joseph Francis na Louisiana State University (Estados Unidos) que demonstrou que a inibição do NF- κ B, no PVN, atenua efeitos fisiológicos (elevação da PA e da atividade simpática renal) e celulares (aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, da subunidade gp91phox da NADPH oxidase e do SRA tecidual, além de reduzir a expressão da nNOS) induzidos pela administração crônica de ANG II (CARDINALE et al., 2012; KANG et al., 2009). Em adição a sinalização MAPK p42/p44 - NF- κ B, a ativação da SAPK estimula a fosforilação da proteína c-Jun que, após esta modificação pós-traducional, associa-se a proteína c-Fos, formando o fator de transcrição AP-1. Na insuficiência cardíaca, estudos desenvolvidos no grupo liderado pelo Dr. Irving Zucker demonstraram a importância da ativação do fator de transcrição AP-1 para a elevação da atividade simpática, disfunção barorreflexa e aumento da atividade do SRAencefálico (LIU et al., 2008; LIU et al., 2006). Na hipertensão renovascular, Burmeister et al. (2011) demonstraram que o silenciamento gênico do AP-1, no PVN, inibe a elevação da PA. Portanto, a sinalização celular ativada pelo receptor AT₁ e TNF- α induz a hiperativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 que colaboram para o estabelecimento e a perpetuação do ambiente pró-oxidativo e pró-inflamatório nas áreas de controle autonômico, favorecendo a disfunção autonômica e a hipertensão arterial. Apesar desta série de estudos que caracterizaram as vias de sinalização nas áreas autonômicas na hipertensão, os efeitos do treinamento aeróbio nestas vias não foram claramente evidenciados em SHR.

1.6.2 A relevância fisiopatológica das espécies reativas de oxigênio em áreas autonômicas de controle cardiovascular

O grupo liderado pela Dra. Robin Davisson publicou uma série de estudos, na hipertensão induzida por ANG II, que evidenciaram o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no SFO, local em que o bloqueio da síntese destas moléculas inibiu adaptações funcionais (elevação da PA, da FC e do componente de baixa frequência da variabilidade da FC, maior influxo de cálcio em neurônios do SFO, infiltração de células T na aorta, ativação da resposta dipsogênica e disfunção na circulação cerebral) e celulares

(produção de prostaglandina E_2 , expressão do SRA tecidual) neste modelo de hipertensão (CAO et al., 2012; CAPONE et al., 2012; LOB et al., 2013; WANG et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2004).

Além das áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, vários estudos identificaram também aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no PVN em modelos de hipertensão, como o SHR (AGARWAL et al., 2011; MASSON et al., 2014; YUAN et al., 2013), dependente de ANG II (CARDINALE et al., 2012; COLEMAN et al., 2013; KANG et al., 2009; WANG et al., 2013; XIA et al., 2011), a hipertensão renovascular (BURMEISTER et al., 2011; YE et al., 2005) e a induzida por alto consumo de sal (XUE et al., 2012). A redução do estresse oxidativo no PVN, induzida pela administração de agentes farmacológicos que mimetizam a atividade da enzima superóxido dismutase ou pela superexpressão desta através de transfecção viral, inibiu respostas funcionais (elevação da PA, da FC, da concentração plasmática de noradrenalina e da atividade simpática renal) e moleculares (maior expressão das citocinas pró-inflamatórias, das subunidades da NADPH oxidase e do SRA tecidual e ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, bem como a redução da expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintetase) da administração intracerebroventricular aguda de angiotensina II (HAN et al., 2005; XU et al., 2011; YU et al., 2007), da hipertensão renovascular (BURMEISTER et al., 2011; HAN et al., 2011; YE et al., 2005), da hipertensão essencial (NISHIHARA et al., 2012; YUAN et al., 2013) e da hipertensão induzida por infusão crônica e subcutânea de ANG II (KANG et al., 2009).

No tronco encefálico, a maior produção de espécies reativas de oxigênio também induz a instalação da disfunção autonômica. Tsai et al. (2013) demonstraram que a administração intracerebroventricular crônica de ANG II reduz a BrS e a estimulação do núcleo ambíguo pelo NTS, além de promover elevação da PA, da FC e da produção de superóxido no NTS. Estes efeitos foram atenuados pela administração do antagonista de receptor AT_1 , pelo agente antioxidante Tempol e pelo inibidor da NADPH oxidase, mas não pelo antagonista do receptor AT_2 , indicando que a interação da ANG II com seu receptor AT_1 reduz a ativação do núcleo ambíguo pelo NTS, devido à geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase no NTS. Embora estes autores não tenham determinado a participação do óxido nítrico com este mecanismo, Wang et al. (2007), utilizando a técnica de *whole-cell patch clamp* em cortes do tronco encefálico de ratos jovens e saudáveis, observaram que o óxido nítrico potencializava correntes pós-sinápticas excitatórias, aumentando a excitabilidade neuronal. Dessa forma, é plausível sugerir que neurônios

estimulados pelo óxido nítrico projetam-se para o núcleo ambíguo e a liberação de superóxido induzida pela via $AT_1/NADPH$ oxidase atenua a ativação do núcleo ambíguo, reduzindo a atividade parassimpática e determinando a disfunção barorreflexa. Corroborando esta hipótese, Nozoe et al. (2007) identificaram, em SHR *stroke-prone*, que o silenciamento da subunidade da Rac-1 da NADPH oxidase, no NTS, reduz o estresse oxidativo, a PA, a FC e a excreção de noradrenalina urinária. Sugeriu-se ainda que a hiperativação do SRA tecidual, no NTS, e a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico configuram um mecanismo de retroalimentação positiva, uma vez que o bloqueio sistêmico e crônico da NOS aumenta a expressão do SRA tecidual, no NTS, e induz disfunção barorreflexa (ESHIMA et al., 2000).

Outra área bulbar relacionada com o desenvolvimento da disfunção autonômica mediado pelo estresse oxidativo é a RVLM. Diversos estudos demonstraram a maior produção de espécies reativas de oxigênio, geradas pela NADPH oxidase, na hipertensão espontânea (AGARWAL et al., 2011), renovascular (NISHI et al., 2013; OLIVEIRA-SALES et al., 2009; OLIVEIRA-SALES et al., 2008), na hipertensão induzida pela obesidade (KONNO et al., 2012), na administração central de ANG II (CHAN et al., 2010) e em SHR-*stroke prone* (KISHI et al., 2004; KONNO et al., 2008). O papel do estresse oxidativo, na RVLM, foi confirmado pela redução da PA e da atividade simpática renal, bem como aumento da BrS, subsequente a administração de agentes antioxidantes na hipertensão renovascular (OLIVEIRA-SALES et al., 2009; OLIVEIRA-SALES et al., 2008) e na hipertensão essencial (CHAN et al., 2006; KISHI et al., 2004; NISHIHARA et al., 2012; OGAWA et al., 2012; TAI et al., 2005; ZHONG et al., 2009).

Com a caracterização da importância fisiopatológica da geração de espécies reativas de oxigênio em áreas de controle autonômico, diversos estudos buscaram demonstrar as possíveis vias produtoras destas moléculas, indicando a NADPH oxidase como a principal fonte de espécies reativas no sistema nervoso autônomo. Este complexo enzimático é composto por sete subunidades catalíticas (Nox1-5 e Duox1-2), diversas subunidades regulatórias ($p47^{phox}$, $p22^{phox}$, Noxo1, $p67^{phox}$, Noxa1, $p40^{phox}$) e a subunidade agregadora Rac-1. As diferentes combinações entre subunidades catalíticas e regulatórias permite a constituição de diferentes isoformas. As subunidades catalíticas Nox1, Nox2 ($gp91^{phox}$), Nox4 e Nox5 participam de processos fisiológicos e patológicos no tecido vascular (células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos presentes na camada adventícia e macrófagos residentes no tecido adiposo perivascular), cardíaco (cardiomiócitos e fibroblastos), renal (túbulos T e glomérulos) e neural (neurônios e microglia). Enquanto a Nox4 consiste numa subunidade constitutiva e está relacionada com a produção de peróxido

de hidrogênio, a Nox2 é considerada a principal subunidade induzível. A estrutura terciária da subunidade catalítica Nox2 (gp91^{phox}) é caracterizada pela presença de 6 hélices transmembranares que estão conectadas por 5 loops, sendo 3 extracelulares e 2 intracelulares. Os loops citosólicos interagem com a NADPH e com o cofator FAD. Uma vez ativada, esta proteína transfere 2 elétrons do NADPH para o FAD, permitindo a redução de 2 moléculas de oxigênio em 2 moléculas de superóxido, as quais são liberadas no meio extracelular. Além da sua tradicional localização, na membrana plasmática, a gp91^{phox} já foi identificada na membrana do retículo endoplasmático e na membrana nuclear, em condições fisiopatológicas, sugerindo sua participação na alteração da expressão gênica e no estabelecimento do estresse do retículo endoplasmático durante o estabelecimento diversos processos patológicos.

A subunidade p47^{phox} é considerada a principal proteína regulatória da NADPH oxidase, pois a ativação deste complexo enzimático se inicia a partir da fosforilação desta subunidade. A p47^{phox} é composta por um domínio rico em prolina, que permite a interação com outras subunidades regulatórias, um domínio PX N-terminal e 2 domínios autoinibitórios SH3 centrais. Em condições de repouso, os domínios SH3 encobrem o domínio PX, mas a fosforilação dos resíduos serina 303, 304 e 328 dos domínios autoinibitórios permite a exposição do domínio PX. Uma vez exposto, o domínio PX favorece a migração da p47^{phox} do citosol para a membrana plasmática, pois este domínio se liga aos componentes lipídicos das membranas celulares. Além desta alteração conformacional, a fosforilação dos resíduos inibitórios também possibilita que o domínio SH3 se ligue a região rica em prolina da porção C-terminal citosólica da subunidade regulatória p22^{phox}. Ao lado da p47^{phox}, as subunidades p67^{phox} e p22^{phox} também favorecem a liberação do superóxido através da estabilização das interações entre as subunidades p47^{phox} e gp91^{phox} ou Nox4.

O papel da NADPH oxidase no estabelecimento da disfunção autonômica na hipertensão arterial, foi demonstrado por estudos, empregando agentes farmacológicos ou silenciamento gênico das subunidades Rac1, p22^{phox}, Nox2 ou Nox4, indicando que a inativação da NADPH oxidase, no SFO, PVN ou NTS, inibe a elevação da PA, da FC, da atividade simpática renal, do componente de baixa frequência da variabilidade da PA, da noradrenalina urinária e da infiltração de macrófagos na aorta, bem como bloqueava a resposta dipsinogênica, induzida pela administração intracerebroventricular de ANG II (PETERSON et al., 2009; ZHANG et al., 2006; ZIMMERMAN et al., 2004), na hipertensão essencial severa (NOZOE et al., 2007), dependente de ANG II (LOB et al., 2013) e dependente da ingestão de sal (XUE et al., 2012).

Uma vez demonstrado que a NADPH oxidase consiste numa importante fonte de espécies reativas de oxigênio em áreas autonômicas e que a redução do estresse oxidativo nestas regiões atenua a disfunção autonômica e o desenvolvimento da hipertensão arterial, estudos desenvolvidos pelos grupos liderados pelos Drs. Robin Davisson e Constatine Iadecola, na hipertensão dependente de ANG II, evidenciaram os possíveis mecanismos que associam o estresse oxidativo com o aumento da atividade dos neurônios pré-motores simpáticos. Zimmerman et al. (2005) identificaram, em estudo *in vitro*, que a ANG II aumentava a produção de espécies reativas de oxigênio e promovia, em neurônios, o influxo de cálcio do meio extracelular. Este efeito foi inibido pela transfecção viral da isoforma cobre-zinco da SOD, reduzindo a disponibilidade de superóxido. Já Wang et al. (2013) demonstraram, em cortes de PVN, que a ativação do receptor NMDA induzia uma maior corrente de entrada que foi abolida pela administração de agente antioxidante ou de doadores de óxido nítrico. Observaram também, no PVN, a co-localização da subunidade NR1 do receptor NMDA com a subunidade catalítica Nox2 em dendritos, bem como menor biodisponibilidade de óxido nítrico basal e após a ativação do receptor NMDA (Wang et al., 2013). Confirmando esta hipótese, demonstraram, no NTS, que o silenciamento da subunidade catalítica gp91phox ou a ativação do receptor AT₂ aumentava a disponibilidade de óxido nítrico e reduzia a geração de superóxido e o influxo de cálcio neuronal induzidos pela ANG II (WANG et al., 2012; WANG et al., 2006). Frente a estes resultados, pode-se sugerir que a hiperativação da NADPH oxidase, induzida pela administração crônica e subcutânea de ANG II, implica em maior geração de superóxido e, consequentemente, numa menor biodisponibilidade de óxido nítrico, reduzindo a nitrosilação do receptor NMDA. Sabe-se que a maior biodisponibilidade de óxido nítrico favorece a nitrosilação da subunidade NR1 do receptor NMDA, a qual é identificada como um mecanismo de inativação deste receptor, uma vez que esta modificação pós-translacional aumenta a interação entre o glutamato e o zinco, gerando o fechamento do canal iônico (NAKAMURA; LIPTON, 2011). No SFO, foi também identificada a participação da prostraglandina E₂ nos efeitos neuroexcitatórios da ANG II, uma vez que Wang et al. (2013) observaram que a enzima ciclooxigenase-1 e o receptor AT₁ estão co-localizados no SFO e que a ANG II induzia a produção da prostraglandina E₂ (via ativação da ciclooxigenase-1), a qual liga-se ao receptor EP₁, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio pela NADPH, resultando em aumento do influxo de cálcio neuronal. Em conjunto, estes estudos confirmam que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, a menor biodisponibilidade de NO e a consequente redução da nitrosilação da subunidade NR1 do receptor NMDA em neurônios

pré-motores simpáticos são os principais mecanismos desencadeantes da disfunção autonômica na hipertensão arterial.

1.6.3 A relevância fisiopatológica das citocinas pró-inflamatórias em áreas autonômicas de controle cardiovascular

Intrinsecamente relacionada com o estresse oxidativo, a inflamação tecidual consiste em outro mecanismo celular fundamental para o estabelecimento da disfunção autonômica na hipertensão arterial. O efeito estimulante das citocinas sobre o sistema nervoso central foi recentemente proposto a partir dos achados do grupo liderado pelo Dr. Robert Felder da Universidade de Iowa (Estados Unidos), os quais identificaram que uma maior expressão de TNF- α e IL1 β , no PVN, na cardiopatia dilatada isquêmica. Observou-se que a administração intracerebroventricular e crônica do bloqueador da síntese de TNF- α atenuava o aumento da atividade neuronal no PVN e a elevação da concentração plasmática de noradrenalina e de ANG II induzidos pela cardiopatia. Além disto, esse tratamento também reduziu o aumento da atividade do SRAencefálico, a expressão e atividade da ciclooxigenase-2, a concentração de prostaglandina E₂ e de citocinas pró-inflamatórias no PVN (KANG et al., 2008). Não identificaram, no entanto, efeito benéfico do bloqueador da síntese de TNF sobre o remodelamento cardíaco (KANG et al., 2008). Estudos recentes demonstraram que a administração aguda de TNF- α ou IL1 β no PVN promove elevação da PA e da atividade simpática renal em ratos saudáveis (SHI et al., 2010).

Vários estudos já haviam demonstrado aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias em áreas autonômicas de controle cardiovascular de hipertensos crônicos (AGARWAL et al., 2011; MASSON et al., 2014) e hipertensos por infusão de ANG II (CARDINALE et al., 2012; KANG et al., 2009; SRIRAMULA et al., 2013; SRIRAMULA et al., 2011). A relevância fisiopatológica da inflamação em áreas de controle cardiovascular no desenvolvimento da disfunção autonômica e da hipertensão arterial foi demonstrada por uma série de estudos do grupo do Dr. Joseph Francis, em modelo experimental de hipertensão arterial dependente de ANG II. Estes estudos evidenciaram que o bloqueio crônico do TNF- α , do fator de transcrição NF- κ B ou do *Toll-like receptor 4* atenuava a hipertrofia cardíaca, a elevação da PA e da atividade simpática renal através do bloqueio da hiperatividade do SRA encefálico, da geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase, da expressão da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase, da ativação do NF- κ B e da produção da TNF- α , IL1 β e IL6, além de inibir a redução da citocina anti-inflamatória IL10 no PVN (CARDINALE et al., 2012; DANGE et al., 2014; KANG et al., 2009; SRIRAMULA et al., 2013). Além da inflamação hipotalâmica, Takagishi et al. (2010) demonstraram que a

administração aguda de IL6 no NTS reduz a BrS em ratos saudáveis anestesiados. Além da produção local de citocinas pró-inflamatórias, Zhang et al. (2003) demonstraram ainda que a administração intra-carotídea de TNF- α ou prostraglandina E₂ aumentava a PA, a FC, a atividade simpática renal e a atividade neuronal no PVN e na RVLM. Recentemente, este mesmo grupo identificou que estes efeitos são mediados pelo SFO, pois sua lesão aboliu a elevação da PA, da FC e da atividade simpática renal induzida pela administração intra-carotídea de TNF- α ou IL1 β . Dados da imunofluorescência revelaram ainda a presença de receptor da IL1 β e do TNF- α no SFO (WEI et al., 2013). Estes estudos indicam que as citocinas pró-inflamatórias atuam em áreas encefálicas envolvidas no controle cardiovascular, favorecendo o desenvolvimento da disfunção autonômica e a instalação da hipertensão arterial.

Além da produção de citocinas pró-inflamatórias, a hiperatividade do fator de transcrição NF- κ B, induzida pelo estresse oxidativo, também favorece o aumento da expressão gênica da isoforma induzível da enzima NOS (iNOS). A iNOS produz óxido nítrico independentemente da concentração de cálcio citosólico, possibilitando uma maior atividade enzimática do que as demais isoformas da NOS (isoforma neuronal, nNOS, e isoforma endotelial, eNOS). Assim o aumento da expressão gênica da iNOS reduz a disponibilidade da BH₄ (BH₄) para as demais isoformas, pois a iNOS está constantemente associada a este cofator para a liberação do óxido nítrico. Já o estresse oxidativo colabora para redução da biodisponibilidade do BH₄ através de sua oxidação em 7,8-dihidrobiopterina (BH₂), que é considerado o principal mecanismo de degradação do BH₄. Com a reduzida disponibilidade de BH₄, há o desacoplamento da eNOS e nNOS, as quais, além de produzirem óxido nítrico também liberam uma molécula de superóxido. Em condições basais, durante a produção de óxido nítrico, o BH₄ doa um elétron, permitindo a oxidação da L-arginina em L-citrulina, e recebe um elétron do complexo ferro-NO, permitindo a síntese da molécula de óxido nítrico. Com a ausência do BH₄, o elétron doado pelo complexo ferro-NO reduz a molécula de oxigênio gerando uma molécula de superóxido, a qual rapidamente reage com o óxido nítrico formando peroxinitrito (ALKAITIS; CRABTREE; 2012; HIROOKA et al., 2011). O papel fisiopatológico da expressão da iNOS na disfunção autonômica e na hipertensão arterial foi demonstrado por Kimura et al. (2005), que observaram que a superexpressão de iNOS na RVLM promoveu estresse oxidativo e elevação da PA e da concentração urinária de noradrenalina. Estes autores ainda observaram que a administração intracerebroventricular de Tempol aboliu os efeitos da superexpressão da iNOS. Na hipertensão renovascular, Oliveira-Sales et al. (2010) demonstraram ainda que a inibição da iNOS reduz a PA e a atividade

simpática renal. Frente a estes resultados, podemos sugerir que a superexpressão da iNOS, em sinergismo com o estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias e SRA tecidual., contribui para a disfunção autonômica e para a instalação da hipertensão arterial.

1.6.4 Microglia: uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias

No contexto de inflamação em áreas autonômicas de controle cardiovascular, a ativação da microglia é considerada uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio na hipertensão arterial. As células da microglia são macrófagos especializados e residentes no sistema nervoso central, as quais diferem das demais células da glia (astrócitos e oligodendrócitos), devido a sua origem hematopoiética e sua função de combate a possíveis patógenos. Em condições basais, as células da microglia se caracterizam morfologicamente por processos celulares largamente ramificados, os quais realizam um contínuo monitoramento do sistema nervoso central (NIMMERJAHN et al., 2005). O principal mecanismo que mantém a microglia em repouso está relacionado com a secreção da quimiocina ligante-CX₃C (CX₃CL1) pelos neurônios, a qual interage com seus receptores específicos presentes na microglia. A secreção constitutiva da CX₃CL1 pelos neurônios é mediada pela interação dos receptores neuronais de superfície CD47, CD22 e CD 200 com receptores correspondentes na microglia (BLOCK et al., 2007; SAIJO; GLASS, 2011).

De maneira similar à ativação da resposta imune inata nos demais tecidos, a ativação da microglia é classicamente desencadeada pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão, os quais identificam a presença de moléculas associadas ao patógeno, encontradas em bactérias e vírus. Receptores Toll-like e NOD-like e CXCR4 são considerados os principais receptores relacionados com a ativação da microglia. As vias de sinalização celular ativadas por estes receptores contribuem para o aumento da atividade do NF- κ B e do complexo protéico NLRP3, da proteína adaptadora ASC e da pró-caspase 1 (inflamossomo), possibilitando várias adaptações plásticas e funcionais, como o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da atividade da NADPH oxidase, a redução do número de processos celulares, a indução do formato amebóide e o aumento da densidade nuclear. A interação com as demais células presentes no sistema nervoso central contribuem para a perpetuação da ativação da microglia, já que o TNF- α e a IL1 β interagem com seus receptores específicos nos astrócitos e favorecem a liberação do próprio TNF- α e fator de estimulação de

colônia-1, que por sua vez interagem com seus receptores na microglia mantendo seu estado ativado (BLOCK et al., 2007; SAIJO; GLASS, 2011).

A interação do SRA encefálico com a ativação da microglia sugere a participação deste tipo celular na gênese da inflamação neural observada na hipertensão arterial. Inicialmente, estudos *in vitro* identificaram que o bloqueio do receptor AT₁ previne a ativação da microglia induzida pelo LPS (BENICKY et al., 2009; MIYOSHI et al., 2008), pela 6-hidroxidopamina (RODRIGUEZ-PALLARES et al., 2008) e pela toxina MPTP (JOGLAR et al., 2009). Já experimentos *in vivo* demonstraram que o antagonista do receptor AT₁, candesartan, atenua o aumento da atividade neuronal, a ativação de microglia e a expressão gênica do TNF- α , IL6 e IL1 β no SFO e no PVN (BENICKY et al., 2011). Reforçando a importância da microglia na ativação de mecanismos que induzem a disfunção autonômica, Coleman et al. (2013) e Glass et al. (2006) identificaram que uma das principais localizações celulares das subunidades p47phox, p22phox e gp91phox da NADPH oxidase são as células da glia. A relevância fisiopatológica da microglia ativada na hipertensão arterial foi demonstrada em dois estudos recentes. Shi et al. (2010) demonstraram, na hipertensão induzida por ANG II, que a administração intracerebroventricular de bloqueador de ativação da microglia preveniu a elevação da PA, da noradrenalina plasmática, da razão peso do coração/peso corporal e da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL6 e IL1 β . Já Wu et al. (2012) identificaram que a ativação crônica da microglia na RVLM, induzida pela administração crônica de LPS (1,2 mg/kg/dia, *ip*), produziu aumento da PA e da concentração plasmática de proteína C-reativa, TNF- α e IL-1 β , bem como, na RVLM, aumento da expressão de pró-inflamatórias e das subunidades p47phox e gp91phox da NADPH oxidase. Esses efeitos foram atenuados com o bloqueio da ativação da microglia (WU et al., 2012), sugerindo que a ativação da microglia também contribui para o desenvolvimento da disfunção autonômica e da hipertensão arterial através da liberação de citocinas no tecido neuronal. Entretanto, nenhum estudo até o presente momento analisou o efeito do treinamento aeróbico na ativação de microglia nas áreas autonômicas em SHR.

1.6.5 HMGB1: um novo agente ativador da microglia e da inflamação neural

Além da sinalização das moléculas associadas aos patógenos, as moléculas associadas ao dano tecidual (DAMPs) também ativam a microglia e promovem a inflamação tecidual. Entre as DAMPs descreveu-se recentemente a presença de uma proteína nuclear, a HMGB1 (*high mobility group box-1*), em diferentes processos celulares como a resposta imune inata, a

autofagia, a esferocitose, a necrose e a metástase (BANERJEE et al., 2011; FANG et al., 2012; KANG et al., 2011; LEE et al., 2012; LUO et al., 2013; MAGNA; PISETSKY, 2014; TANG et al., 2010; YANAI et al., 2012). No núcleo celular, a HMGB1 interage com o DNA e com as histonas, regulando intrinsecamente a transcrição gênica, mas os diferentes efeitos celulares da HMGB1 são desencadeados quando esta proteína está no meio extracelular. A translocação do núcleo para o citosol e a subsequente secreção da HMGB1 são processos celulares complexos amplamente regulados por várias modificações pós-traducionais (MAGNA; PISETSKY, 2014). O deslocamento para o citosol é mediado pela acetilação de resíduos lisinas 2 e 81, os quais, quando não acetilados, interagem com o DNA (ELENKOV et al., 2011). Embora ainda não tenha sido descrita no sistema nervoso central, Funayama et al. (2013) desenvolveram um elegante estudo, em que identificaram menor co-localização da HMGB1 com o marcador nuclear DAPI no tecido cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca. Além disso, esses autores ainda identificaram, em experimentos *in vitro*, que o tratamento com endotelina-1 promove a acetilação dos resíduos de lisina e, subsequentemente, o deslocamento para o citosol. Resultados similares foram observados *in vivo* na hipertensão arterial induzida por coarctação da aorta, além do aumento da sobrevivência e da redução da hipertrofia cardíaca, após a inativação da HMGB1, neste modelo experimental. Desta forma, é possível inferir que, de maneira semelhante à identificada no tecido cardíaco, os mecanismos relacionados com o estabelecimento da disfunção autonômica influenciem o deslocamento da HMGB1 para o citosol em células do sistema nervoso central.

Uma vez no citosol, o deslocamento do HMGB1 para o meio extracelular é mediado pela fosforilação dos resíduos serina 39, serina 53 e serina 181 das regiões de sinal de localização nuclear presentes no HMGB1 (LEE et al., 2012). A PKC e a proteína cálcio-camoldulina quinase II (CAMKII) realizam a fosforilação destes resíduos do HMGB1, permitindo seu deslocamento do citosol para o meio extracelular (LEE et al., 2012; OH et al., 2009; ZHOU et al., 2013). Vale ressaltar que diversos estudos identificaram a hiperatividade da PKC no NTS, RVLM e SFO em modelo experimental de hipertensão arterial induzida por ANG II. Além da PKC, o aumento da atividade da CAMKII também pode contribuir para a maior secreção do HMGB1 em áreas de autonômicas, pois, na hipertensão neurogênica, o papel causativo do estresse do retículo endoplasmático no SFO (YOUNG et al., 2012) e na RVLM (CHAO et al., 2013) foi identificado e esta condição de estresse celular se caracteriza pelo aumento da concentração plasmática de cálcio citosólico e, portanto, ativação da CAMKII (TIMMINS et al., 2009). Dessa forma, é possível que, na hipertensão arterial, a

fosforilação do HMGB1 pela PKC e pela CAMKII possa estar aumentada em áreas de controle autonômico.

Além da acetilação e da fosforilação, a HMGB1 também é regulada por seu estado-redox (YANG et al., 2013; YANG et al., 2012). A oxidação dos resíduos cisteínas 23, 45 e 106 possibilita a interação com o receptor *Toll-like* 4 e a produção de citocinas pró-inflamatórias através dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, enquanto a completa redução destes resíduos permite a interação com o *stromal derived factor*-1 (SDF-1) e a ativação do receptor CXCR4, favorecendo a migração celular (YANG et al., 2013).

No tecido neuronal, a HMGB1 parece promover ativação de microglia e inflamação neural. Nesse sentido, Gao et al. (2011) demonstraram que a HMGB1 induz a ativação da microglia Mac1, a produção de superóxido pela Nox2, a ativação de NF- κ B e a expressão de iNOS e IL1 β . Adicionalmente, o bloqueio do HMGB1 reduz a ativação da microglia, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a geração de espécies reativas de oxigênio em modelo experimental de isquemia cerebral (GONG et al., 2014; KIM et al., 2012; LIU et al., 2007). Como o estresse oxidativo/nitrosativo está diretamente relacionado com a inflamação tecidual, Loukili et al. (2011) sugeriram a participação da HMGB1 na associação entre estresse oxidativo e inflamação, características moleculares das doenças inflamatórias crônicas, pois estes autores demonstraram que o peróxido nítrico, produto da reação entre superóxido e óxido nítrico, induz a liberação de HMGB1 no tecido cardíaco. Embora os efeitos cardiovasculares da administração intracerebroventricular ainda não tenham sido identificados, a correlação negativa entre a concentração plasmática de HMGB1 e a atividade parassimpática (GIALLAURIA et al., 2010) ou a função cardíaca (CIRILLO et al., 2009) foi observada em pacientes diagnosticados com infarto agudo do miocárdio. Além disso, a concentração plasmática do HMGB1 também se correlacionava indiretamente com a recuperação da função cardíaca e diretamente com a mortalidade após o infarto agudo do miocárdio (ANDRASSY et al., 2011; HASHIMOTO et al., 2012; SØRENSEN et al., 2011). A partir desses dados, podemos sugerir que a HMGB1 parece ter um papel relevante no desenvolvimento da disfunção autonômica, o qual ainda deve ser determinado na hipertensão arterial. Além da relevância fisiopatológica da hipertensão arterial, o efeito do treinamento físico ainda não foi determinado na concentração de HMGB1 ou nos seus efeitos sobre a ativação de microglia e inflamação neural.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese foi analisar em SHR, a sequência temporal de efeitos do treinamento aeróbio sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos. Adicionalmente, às variáveis fisiológicas também foram analisados mecanismos moleculares e celulares relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo nos núcleos encefálicos de regulação autonômica (NTS, RVLM e PVN). A tese envolve 2 (dois) estudos distintos desenvolvidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e no Departamento de Ciências Biomédicas Comparadas da Escola de Veterinária da Louisiana State University (Baton Rouge; LA; Estados Unidos).

2.1.1 Objetivos específicos – Estudo I: analisar a cronologia das adaptações cardiovasculares e autonômicas induzidas pelo treinamento aeróbio em SHR, relacionando-as temporalmente com possíveis adaptações moleculares nas áreas de regulação autonômica.

Neste estudo, os efeitos do treinamento aeróbio sobre as variáveis cardiovasculares e autonômicas, bem como perfil inflamatório e oxidante nas diferentes áreas encefálicas, foram analisados nas fases: inicial (primeira e segunda semanas de treinamento), intermediária (quarta semana de treinamento) e tardia (oitava semana de treinamento) em SHR. Foram também analisados nas semanas 0 e 8 do protocolo experimental, animais sedentários SHR e ratos Wistar-Kyoto (WKY) normotensos.

2.1.2 Objetivos específicos – Estudos II: analisar o possível papel do HMGB1 na disfunção autonômica, inflamação e ativação da microglia no PVN através do CxCr4. Além disso, verificamos se esse mecanismo molecular estaria inibido em SHR treinados.

Este estudo envolveu duas etapas distintas. Na primeira, foi avaliado o efeito da administração intracerebroventricular do HMGB1, bem como a participação do receptor CxCr4, em variáveis cardiovasculares e autonômicas, no perfil inflamatório e na ativação da microglia no PVN. Na segunda etapa, variáveis cardiovasculares e autonômicas, bem como o conteúdo de HMGB1, perfil inflamatório e a ativação da microglia no PVN, foram analisadas em SHR e ratos Wistar-Kyoto normotensos submetidos ao treinamento aeróbio por 2 (duas) semanas. De maneira semelhante ao Estudo I, ratos hipertensos e normotensos sedentários também foram utilizados como controles temporais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental – Estudo I

Este estudo foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com o Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia do ICB/USP e com o Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração/USP.

Foram utilizados ratos SHR, com 3 meses de idade no início dos experimentos, os quais foram alocados em protocolos de treinamento aeróbio ou sedentarismo. Os ratos foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica (3-4 ratos/caixa) com temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a ração e água. Os procedimentos descritos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (número 137; folha 94, livro 2).

Neste estudo, os animais treinados foram analisados nas semanas 1, 2, 3, 4 e 8, enquanto os animais hipertensos sedentários e Wistar Kyoto normotensos foram avaliados nas semanas 0 e 8 (figura 1). Nos determinados pontos experimentais, os ratos foram submetidos à cateterização crônica da artéria e da veia femoral, permitindo a medida da PA e FC, bem como suas respectivas variabilidades e componentes de frequência (HF - alta e LF - baixa frequência). Também foi analisado o controle barorreflexo cardíaco.

Num outro grupo de animais, o fluxo sanguíneo vascular também foi medido através da implantação de transdutor na artéria ilíaca esquerda, a qual foi realizada quatro dias antes da análise das variáveis fisiológicas. Em adição ao controle barorreflexo cardíaco, nestes animais o controle barorreflexo vascular também foi analisado.

Após a análise dos dados fisiológicos, os animais foram eutanaziados e os núcleos regulatórios do sistema nervoso central (NTS, RVL e PVN) foram coletados e armazenados em *freezer* -80°C para posterior processamento para emprego em técnicas de biologia molecular (RT-PCR em tempo real, *western blotting*, ensaio de mobilidade eletroforética, *high performance liquid cromotography*). Todos esses procedimentos experimentais serão descritos detalhadamente nas seções subsequentes.

Figura 01 – Desenho Experimental do Estudo I

3.2 Desenho Experimental – Estudo II

Este estudo foi desenvolvido no Departamento de Ciências Biomédicas Comparadas da *Louisiana State University*. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela comissão de ética em experimentação animal da Escola de Medicina Veterinária da *Louisiana State University*.

O Estudo foi caracterizado por duas etapas experimentais distintas. Na primeira fase, ratos *sprague-dowley* (3 meses de idade) foram submetidos à cirurgia para implantação de cânula intracerebroventricular (ventrículo lateral). Com um intervalo mínimo de 5 (cinco) dias, a cateterização crônica da artéria e veia femoral foi realizada, permitindo a medida da PA e da FC, incluindo suas respectivas variabilidades e componentes de alta e baixa frequência, com os animais conscientes e com movimentação livre.

Neste protocolo experimental, os animais foram alocados em 5 (cinco) diferentes grupos: veículo; HMGB1(0.38 µg); HMGB1(3.8 µg); HMGB1(3.8 µg) + ADM3100 - inibidor do CXCR4 (5 µg); HMGB1(3.8 µg) + inibidor do CXCR4 (50 µg). Após um período de aclimação de 60 (sessenta) minutos, veículo ou HMGB1, em duas diferentes doses (0.38 µg ou 3.8 µg), foi administrado pela cânula intracerebroventricular. O tratamento com inibidor do CXCR4 (5 µg ou 50 µg) foi realizado trinta minutos antes da infusão de HMGB1. As variáveis cardiovasculares e autonômicas foram analisadas por trinta minutos após a administração de HMGB1 ou veículo. Ao final deste período, a BrS foi avaliada através da infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (figura 2). Subsequentemente, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, perfundidos com salina (0.9%) ou paraformaldeído

(4%) e o encéfalo foi coletado. Aqueles tecidos perfundidos com salina foram analisados através de *Western-blotting*; já os perfundidos com paraformaldeído foram utilizados para imunofluorescência. Plasma e líquido cérebro-espinhal também foram coletados para a medida do conteúdo de HMGB1 e noradrenalina (Elisa Kit).

Na segunda etapa experimental deste estudo, ratos SHR e Wistar-Kyoto (com 3 meses de idade) foram submetidos ao treinamento aeróbio por duas semanas (5x/semana; 1hora/dia; 60% da capacidade física máxima) ou mantidos sedentários. Ao final deste protocolo, de maneira semelhante ao Estudo I, cirurgia de cateterização crônica da artéria e veia femorais foi realizada, permitindo a medida das variáveis cardiovasculares (PA e FC) e autonômicas (BrS e variabilidade da PA e da FC) nos animais conscientes e com livre movimentação. De forma semelhante à primeira parte do estudo, após a eutanásia, plasma, líquido cérebro-espinhal e encéfalo foram coletados para posterior análise (figura 2).

Figura 02 – Desenho Experimental do Estudo I

3.3 Avaliação da capacidade aeróbia máxima

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada indiretamente através do teste de esforço máximo durante exercício escalonado em esteira ergométrica (Millenium, Inbramed, adaptada para ratos). O teste se iniciava com uma velocidade inicial de 0,3 km/h seguida de incrementos de 0,3 km/h a cada 3 (três) minutos até a exaustão do animal. Estes testes foram realizados no início, no meio e ao final dos protocolos, possibilitando a determinação da intensidade do treinamento e a quantificação do ganho no desempenho

aeróbio ao término dos períodos de treinamento físico.

3.4 Protocolo de treinamento físico ou sedentarismo

Após o período inicial de adaptação à esteira (1 semana, 10 min/dia, com a esteira em movimento por 5-10 minutos a 0,3-0,7 km/h), os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico, que consistia de corrida em esteira, 1 hora/dia, 5 dias/semana com intensidade de 50-60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço máximo. No Estudo I, os períodos analisados foram: 0, 1, 2, 4 e 8 semanas, enquanto no Estudo II, os animais foram submetidos a duas semanas de treinamento físico. Os ratos alocados aos grupos não exercitados foram mantidos sedentários por igual período de tempo e apenas 1 vez/semana colocados na esteira por 5-10 min. Os grupos sedentários realizaram o teste de esforço máximo nos mesmos períodos que os grupos treinados.

3.5 Procedimento cirúrgico e registro da PA, do fluxo sanguíneo vascular e da FC

Os procedimentos para a cateterização crônica da arterial e veia femorais foram semelhantes nos 2 estudos realizados. Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina (100 mg.kg⁻¹, *ip*, Ketalar, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (10 mg.kg⁻¹, *ip*, Rompum). Após tricotomia da pata esquerda e da região dorsal superior, a fossa ilíaca foi dissecada e artéria e veia femorais foram isoladas. Cânula arterial (tubo de polietileno Tygon: 5 cm de PE-10 +15 cm de PE 050) preenchida com salina foi inserida nos vasos, exteriorizada no dorso do animal e fixada com fios de algodão não absorvível (4.0 Havel's, USA). Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (estudo I: 3 mg/kg de Cetoprofeno, *sc*; estudo II: 7.5 mg/kg de enrofloxacin, *sc*) e foram mantidos em caixas individuais para recuperação pós-cirúrgica.

No dia subsequente a esta cirurgia, as cânulas arteriais foram conectadas ao transdutor (Deltran® II transducer, Utah Medical Products, MidVale, UT, EUA), o qual estava acoplado ao sistema de aquisição de sinal biológico (Power Lab system e Labchart 7.0 software, AD Instruments, Bella Vista NSW, Austrália). O sinal da PA foi quantificado em frequência amostral de 2kHz (2000 amostras/segundo) e a FC foi determinada a partir do intervalo de pulso do sinal de PA.

No estudo I, ao final dos protocolos de treinamento aeróbio (semanas 1, 2, 4 e 8) ou sedentarismo (semanas 0 e 8), os ratos foram submetidos à cateterização crônica da artéria/veia femorais. Os registros basais de PA e FC foram obtidos no dia subsequente à

canulação, com os animais acordados e com livre movimentação. Em seguida a um período mínimo de aclimação do animal de 60 (sessenta) minutos, PA e FC foram monitoradas continuamente por 50 (cinquenta) minutos. Após o registro basal dos parâmetros cardiovasculares, foram administradas doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, *iv*, para a determinação da atividade barorreflexa.

Para a determinação do fluxo sanguíneo da pata esquerda, os animais foram submetidos, além da cateterização crônica da artéria e veia femorais, à cirurgia de implantação do sensor de fluxo ultrassônico (1RB, Transonic System, Ithaca, NY, EUA).

Inicialmente foram realizadas 3 (três) incisões: uma próxima à região dorsal do pescoço, outra próxima à região lateral do abdômen e uma última na linha mediana do abdômen do animal permitindo, assim, a inserção do conector do sensor na cavidade abdominal e a exteriorização da outra extremidade do sensor na região dorsal do pescoço. As artérias aorta abdominal e ilíaca esquerda foram visualizadas e dissecadas. O sensor foi adaptado ao redor da artéria ilíaca esquerda e seu cabo fixado na musculatura abdominal adjacente. O conector foi fixado no dorso do pescoço do animal com auxílio de um anel de silicone que foi suturado na pele. Todas as incisões foram suturadas e, assim como no experimento em que somente se mediu o controle barorreflexo cardíaco, os ratos foram tratados com analgésico (3 mg/kg de Cetoprofeno, *sc*). O experimento foi realizado após um período de 4 (quatro) dias de recuperação. A resistência vascular relativa da pata esquerda foi determinada a partir dos valores de PA média e fluxo absoluto, os quais foram normalizados pelo peso seco da musculatura da pata traseira esquerda ($R_p = (PA \text{ média}/F)/\text{tecido}$), sendo expressa em $\text{mmHg.ml}^{-1}.\text{min.g}$ de tecido.

No Estudo II, após um período de aclimação de 60 (sessenta) minutos, PA e FC foram medidas por 30 (trinta) minutos após a administração intracerebroventricular de veículo ou HMGB1 (0.38 μg ou 3.8 μg) e, então, a BrS foi avaliada pela infusão de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (*iv*). No estudo II, os ratos submetidos ao protocolo de treinamento ou sedentarismo foram analisados de maneira semelhante àqueles do estudo I.

3.6 Análise espectral da PA e da FC

Séries temporais de PA sistólica e do intervalo de pulso foram obtidas em períodos de 5 minutos. A variabilidade da PA sistólica e do intervalo de pulso (IP, indicativo da variabilidade da FC), bem como seus componentes de baixa (LF: 0.20-0.75 Hz) e alta (HF: 0.75-4.0 Hz) frequência foram calculados no domínio da frequência através da transformada rápida de Fourier, usando uma rotina personalizada (MATLAB 6.0, Mathworks). Em adição à

variabilidade de PA sistólica e de FC, a BrS espontânea também foi calculada através do índice alfa (componente de baixa frequência da variabilidade da FC/ componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica). A variabilidade do fluxo sanguíneo na artéria ilíaca esquerda foi analisada no domínio do tempo e determinada com o desvio padrão da série-temporal do sinal de fluxo sanguíneo num período de 5 a 10 minutos.

No estudo I e nos animais submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio ou sedentarismo do Estudo II, a variabilidade da PA sistólica, do IP e seus componentes foram medidos apenas no repouso nos períodos pré-determinados. Nos animais que receberam infusão central de veículo ou HMGB1 do Estudo II, além da medida em repouso, os parâmetros autonômicos foram analisados durante 30 minutos (segmentados em períodos de 5 minutos) após os tratamentos.

3.7 Medida do controle barorreflexo cardíaco e vascular

Após a medida das variáveis cardiovasculares e autonômicas, o controle barorreflexo cardíaco e vascular foi determinado através da ativação ou desativação dos barorreceptores com doses crescentes de fenilefrina (0.1-6.4 µg/kg, iv, 100 µL em bolus) e nitroprussiato de sódio (0.2-12.8 µg/kg, iv, 100 µL em bolus). A infusão subsequente não foi realizada até o retorno dos parâmetros, PA média e FC, aos valores pré-injeção. PA média, FC e resistência vascular relativa foram medidas antes (controle) e durante o pico de resposta. O controle barorreflexo da FC e da resistência vascular relativa, determinados em cada rato, foram estimados pela equação logística sigmoidal formada pelas respostas reflexas a cada dose, como descritas previamente (HIGA et al., 2002). As equações das respostas da FC e da resistência periférica relativa às variações de PA foram: FC ou Resistência periférica relativa = $P1 + P2/[1 + e^{P3(BP-P4)}]$, onde P1 = plateau inferior da FC ou da Resistência periférica relativa, P2 = amplitude da curva da FC ou da Resistência periférica relativa, P3 = coeficiente de curvatura e P4 = BP₅₀ (o valor da PA para metade da amplitude da curva). A média do ganho da função barorreflexa foi calculada como $BrS = -(P2 \times P3)/4$.

3.8 Implantação da cânula intracerebroventricular

Ratos Sprague-Dowley (3 meses de idade) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg.kg⁻¹, ip, Ketalar, Parke-Davis) e cloridrato de xylazina (10 mg.kg⁻¹, ip, Rompum, Bayer). A cabeça do animal foi fixada no aparelho estereotático (Kopf Instruments; Tujunga, CA) e o crânio foi exposto através da incisão na linha média do

escalpo. Conforme as coordenadas estabelecidas por Paxinos e Watson (1986), a cânula intracerebroventricular foi implantada no ventrículo lateral esquerdo (1.3 mm posterior ao Bregma e 1.5 mm lateral à linha média e 3.5 mm ventral em relação à dura mater) e fixada no crânio usando cimento dentário e pequenos parafusos. A cânula foi ocluída com fio de aço, o qual também foi fixado com cimento dentário. Após a cirurgia, os ratos foram tratados com antibiótico (7.5 mg/kg de enrofloxacin, *sc*).

Após um intervalo mínimo de 5 (cinco) dias, os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização crônica da artéria e veia femorais, como descrito anteriormente. A análise dos efeitos cardiovasculares e autonômicos da infusão intracerebroventricular da HMGB1 foi realizada no dia subsequente a este procedimento. No momento do experimento, o fio de aço foi removido e um tubo de polietileno (PE50) foi conectado à cânula intracerebroventricular. Após um período de aclimação de 60 (sessenta) minutos, veículo ou HMGB1 (0.38 µg ou 3.8 µg) foi administrado através de uma seringa Hamilton de 50 µl. O volume administrado em todos os experimentos foi de 2 µl. Os ratos alocados nos grupos HMGB1 (3.8µg) + ADM3100 (5µg) ou HMGB1 (3.8µg) + ADM3100 (50µg) receberam a infusão do bloqueador do receptor CXCR4 30 minutos antes da administração do HMGB1.

A localização da cânula foi confirmada durante a coleta do PVN. Aqueles animais (n=6) que não apresentaram a localização apropriada da cânula (ventrículo lateral) foram excluídos da análise.

3.9 RT-PCR em tempo real

No estudo I, após a análise das variáveis fisiológicas, 8 (oito) ratos/grupo foram anestesiados profundamente e perfundidos via transcardíaca com solução salina até a remoção total do sangue. O encéfalo foi rapidamente removido e fatias coronais espessas (800 a 1.000 µm) do hipotálamo e do troncoencefálico ao nível do óbex foram obtidas, permitindo o isolamento das regiões dorsal (núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago) e ventral (região rostral da medula ventrolateral e estruturas contíguas) do bulbo, bem como do PVN, através de “*punches*”, os quais foram armazenados em freezer -80°C para processamento posterior.

O RNA total foi extraído (TRIzol®) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi verificada através de gel de agarose marcado com brometo de Etídio. Subsequentemente, as amostras foram tratadas com DNase Amp I (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 2µg de RNA total/reação, empregando o protocolo indicado para a enzima MMLV (Invitrogen). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

A quantificação relativa do número de cópias do mRNA foi realizada pelo PCR em tempo real (7500 Real-Time PCR System; Applied Biosystem), utilizando ensaios Taqman customizados pela Applied Biosystem (TNF- α ; Interleucina-6, p47^{phox} e gp91^{phox}). Também empregamos o fluoróforo SYBR-Green para estimativa do número de cópias do RNA mensageiro da Interleucina-10. O gene endógeno, ou constitutivo, foi a Hipoxantina-guaninafosforibosil transferase (HPRT) que é expresso continuamente em todas as células do organismo e que, em experimento-piloto do laboratório, não foi alterado nem pela hipertensão, pela idade e/ou treinamento físico. A quantificação dos resultados do PCR em tempo real foi efetuada através da determinação do $2^{\Delta\Delta CT}$. Antes do início dos experimentos, curvas de eficiência foram obtidas com valores entre 96-114% de eficiência e r^2 entre 0.98-0.99.

3.10 Oxidação do DHE

Amostras do PVN e da região dorsal (DBS) e ventral (VBS) do troncoencefálico (5 ratos/grupo) foram incubadas em 0.5 ml de PBS/DTPA por 30 (trinta) minutos. Três μ l de dihydroethidium (DHE, 10mM - solução estoque) foram adicionados ao tampão, atingindo uma concentração final de 60 μ M. Amostras foram incubadas por 30 (trinta) minutos a 37°C, protegidas da luz.

As amostras foram centrifugadas (12,000g por 10 min a 4°C) e o tampão PBS/DTPA foi removido. Acetonitrila (0,5 ml) foi adicionada e o tecido foi sonificado em gelo (10 ciclos a 5W por 10s) e centrifugado (12,000 g por 10 min a 4°C). O pellet foi ressuspensionado em 200 μ l de tampão de lise, incubado por 10 (dez) minutos em gelo e centrifugado (18,000g por 10 min a 4°C). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O sobrenadante foi secado a vácuo e o pellet mantido a -20°C protegido da luz até a análise. As amostras foram ressuspensionadas em 80 μ l de acetonitrila e injetadas (60 μ l) no sistema de cromatografia líquida de alta performance. A separação do DHE, 2-hidroxietídio (EOH) e Etídio (E) foi realizada como descrito previamente (FERNANDES et al., 2007). As razões EOH/DHE e E/DHE foram obtidas e normalizadas pela concentração de proteínas avaliadas nos pellets.

3.11 Atividade do NF-kappaB

Extratos nucleares de amostras do PVN (4-5 ratos/grupo) foram homogeneizados em tampão de lise (10 mM HEPES; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 2 μ g/mL leupeptin; 2 μ g/mL

antipain; 0.5 mM PMSF; 0.1 mM EDTA; 30 mM NaF; 3 mM orthovanadate; 2 mM pyrophosphate) e incubadas no gelo por 15 (quinze) minutos. NP-40 (10%) foi adicionado e amostras foram misturadas (vórtex) e centrifugadas por 30 (trinta) segundos a 12.000g. O sobrenadante foi coletado e utilizado no *western blotting* (Estudo I). A fração nuclear foi ressuspendida em tampão de extração nuclear (20 mM HEPES; 1.5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0.25 mM EDTA; 2 µg/mL leupeptin; 2 µg/mL antipain; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 3 mM orthovanadate; 2 mM pyrophosphate), incubado por 20 (vinte) minutos em gelo e centrifugado a 12.000g a 4°C por 20 (vinte) minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O ensaio de mobilidade eletroforética para NF-κB foi realizado como descrito previamente com pequenas modificações (RONG; BAUDRY, 1996). Oligonucleotídeos dupla-fita contendo a sequência consenso do NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foram marcados com a quinase T4 polinucleotideo na presença de ³²P dATP. Extratos nucleares (5 µg) foram incubados com a sonda do NF-κB marcada com ³²P. A reação de ligação foi realizada à temperatura ambiente por 30 (trinta) minutos num tampão de reação contendo: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 20% glicerol, 0.25 µg/µL of polinucleotideo (dI-dC) and 2.5 mM dithiothreitol. Os complexos DNA-proteína foram separados pela eletroforese através de gel 6% acrilamida:bis-acrilamida (37.5:1) em TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido Bórico, 0.5 mM EDTA) por 2 (duas) horas a 150 V. Géis foram secados a vácuo por 1 (uma) hora a 80°C e expostos ao filme de raio-X a -80 °C. A densitometria foi determinada conjuntamente para as duas bandas assinaladas na figura 13A.

3.12 Western Blotting

A concentração protéica da fração citosólica dos extratos protéicos, conforme os procedimentos para extração descritos anteriormente, foi determinada a partir do método de Bradford (1976). Extratos protéicos foram combinados em igual volume do tampão de amostra em uma concentração de 1 µg/µL e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com voltagem constante. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF por cento e vinte minutos. As membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% albumina sérica bovina em TTBS por uma hora em temperatura ambiente. No estudo II o bloqueio da membrana foi realizado por 90 (noventa) minutos a 45°C. Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (ver tabela 02) por 12 (doze) horas a 4°C. Após a lavagem com TTBS por 30 (trinta) minutos (5x6 minutos), as

membranas foram incubadas por duas horas com anticorpos secundários conjugados com horseradish peroxidase.

A imunorreatividade das bandas foi visualizada utilizando revelador quimioluminescente (ECL Plus, Amersham) e a intensidade das bandas foi quantificada através do sistema de aquisição de imagem Versa Doc MP 5000 (BioRad) e normalizados com actina. A quantificação dos dados foi realizada no software ImageJ através da determinação da densitometria das bandas.

Tabela 02 – Anticorpos utilizados nos diferentes estudos.

	Anticorpo	Empresa	Diluição
Estudo I	Anti p42/p44 fosforilada	Cell Signaling Technology	1:1000
	Anti p42/p44 total	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
	Anti p38 fosforilada	Cell Signaling Technology	1:1000
	Anti p38 Total	Santa Cruz biotechnology	1:2000
	Anti β -actin	Sigma-Aldrich	1:2000
Estudo II	Anti-HMGB1	Abcam	1:1000
	Anti-SDF1	Abcam	1:2000
	Anti-CrCR4	Abcam	1:500
	Anti p42/p44 fosforilada	Cell Signaling Technology	1:1000
	Anti p42/p44 total	Cell Signaling Technology	1:1000
	Anti-I κ B α fosforilada	Cell Signaling Technology	1:100
	Anti-TNF α	Cell Signaling Technology	1:500
	Anti-IL6	Santa Cruz biotechnology	1:200
	Anti β -actin	Sigma-Aldrich	1:1000

3.13 Imunofluorescência

Secções coronais sequências do hipotálamo (30 μ m, -1.80 to -2.12 caudal em relação ao Bregma, 3 ratos/grupo) foram cortadas com criostato (Leica CM 1850; Nussloch, Germany) e coletadas em placas de cultura de 6 (seis) poços com 0.1M PB. Cortes *free-floating* foram pré-tratados com 1% H₂O₂ por 30 minutos, lavadas 0.1M PB por 30 minutos e incubadas com soro normal de burro 2% por também 30 minutos. Para as reações de imunofluorescência, as secções foram incubadas por 48 (quarenta e oito) horas com anticorpo primário, seguida da incubação por 60 (sessenta) minutos com anticorpo secundário. Três a quatro cortes foram colocados em cada lamina e montados utilizando solução mantenedora de

fluorescência (Vectashield). Controles negativos foram realizados, omitindo os anticorpos primários ou secundários. Os cortes foram examinados para localizar o PVN (Leica DMLB, Wetzlar, Germany). As imagens foram analisadas através do software Image ProPlus (Média Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.14 Apresentação dos dados e análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM e o nível de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$. Os testes estatísticos utilizados estão discriminados na Tabela 03.

Tabela 03 – Análise estatística empregada nos diferentes estudos

	Comparação	Variáveis	Teste	Pós-teste
	S0 vs T1 vs T2 vs T4 vs T8	Todas	Two-way ANOVA	Bonferroni
Estudo I	SHR-S0 vs WKY-S0 e SHR-T8 vs SHR-S8 vs WKY-S8	Todas	One-way ANOVA	Tukey
	H ₂ O vs HMGB1 (0.38 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) + ADM3100 (5 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) + ADM3100 (50 µg)	PA, FC, VarFC, HF-VarFC, LF- VarFC, VarPAS e LF-VarPAS	Two-way ANOVA (medidas repetidas)	Bonferroni
Estudo II	H ₂ O vs HMGB1 (0.38 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) + ADM3100 (5 µg) vs HMGB1 (3.8 µg) + ADM3100 (50 µg)	BrS e dados moleculares	One-way ANOVA	Tukey
	WKY-S vs WKY-T vs SHR-S vs SHR-T	Todas	One-way ANOVA	Tukey

4 RESULTADOS

4.1 Estudo I

4.1.1 Desempenho Físico

Desde o início dos protocolos, os SHR exibiam melhor desempenho na esteira, evidenciado pela maior duração do teste de esforço quando comparados aos WKY (798 ± 100 vs. 350 ± 137 s; $p < 0.05$). O treinamento aeróbio promoveu aumento significativo da duração do teste de esforço na 4ª (1107 ± 157 s; $p < 0.01$) e na 8ª semana (1352 ± 154 s; $p < 0.01$). Por outro lado, os SHR mantidos sedentários apresentaram uma redução significativa da capacidade física após 8 semanas de protocolo (479 ± 159 s; $p < 0.05$). Os WKY mantidos sedentários não apresentaram alteração significativa na capacidade aeróbia ao longo do período experimental.

4.1.2 Adaptações Cardiovasculares

Conforme apresentando na Figura 03, no início dos protocolos, os SHR apresentaram maior PA média e FC de repouso (em média +43% e +17% vs. WKY_S, respectivamente). Os SHR treinados apresentaram redução significativa da FC de repouso a partir da 2ª semana de treinamento aeróbio (-5%), com normalização da FC de repouso após 8 semanas de treinamento (-13% vs Semana 0). O treinamento aeróbio promoveu redução significativa da PA apenas na 8ª. semana de treinamento aeróbio (-8%). Ao final dos protocolos, os SHR treinados exibiram menor PA média do que seus respectivos controles temporais (159 ± 6 vs. 173 ± 6 mmHg, $p < 0,05$), mas os SHR treinados ainda mantinham uma PA média elevada quando comparada aos WKY sedentários (159 ± 6 vs. 114 ± 4 mmHg, $p < 0,01$). Por outro lado, os valores de FC basal foram semelhantes entre SHR treinados e WKY sedentários na 8ª. semana dos protocolos (Figura 03, Tabela 04).

Figura 03 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na PA média (painel A) e na FC basais (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=12). * p<0,05 vs WKY no respectivo ponto, # p<0,05 vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 04.

Valores basais de PA sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais.

	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)	PAD (mmHg)	FC (b/min)
SHR				
S₀=T₀ (n=11)	195±3 *	172±3 *	159±3 *	358±7*
T₁ (n=12)	192±3	168±3	156±3	348±7
T₂ (n=13)	195±2	168±3	155±2	340±8 #
T₄ (n=11)	200±2	174±2	160±2	339±5 #
T₈ (n=13)	186±3*# †	156±5 *# †	140±6 *# †	313±7 # †
S₈ (n=12)	197±3 *	173±6 *	160±5 *	361±13*
WKY				
S₀ (n=11)	138±4	118±4	108±4	307±6
S₈ (n=12)	137±3	117±2	106±3	321±9

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; *n* é o número de ratos em cada subgrupo. PAS, PA sistólica; PAM, PA média; PAD, PA diastólica; FC, frequência cardíaca. Significância estatística (p<0.05): * vs WKY no respectivo ponto, # vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Em adição aos valores de PA média e FC, no início dos protocolos experimentais, os SHR apresentaram fluxo sanguíneo relativo semelhante aos WKY (2,7±0.1 vs 1,5 ±0,2 ml. min⁻¹ /g de tecido; respectivamente; p=0,07). Contudo, os SHR exibiram maior resistência vascular periférica relativa (10,7±1 vs 4,7±2 mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido; respectivamente;

$p<0,05$). O treinamento aeróbio não alterou significativamente o fluxo sanguíneo relativo ao longo do protocolo experimental, mas reduziu transitoriamente a resistência vascular periférica relativa na 1ª. semana, normalizando-a apenas após 8 (oito) semanas experimentais, fase em que os SHR-T8 apresentavam valor significativamente menor quando comparado aos SHR-S0 ($6,9\pm1$ vs $10,7\pm1$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido; SHR-T8 vs SHR-S0; $p<0,05$), não diferindo daqueles apresentados por WKY-S0 ($6,9\pm1$ vs $4,7\pm2$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido; SHR-T8 vs WKY-S0; $p>0,05$) e WKY-S8 ($6,9\pm1$ vs $4,8\pm1$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido; SHR-T8 vs WKY-S8; $p>0,05$; figura 4; Tabela 05). O protocolo de sedentarismo não alterou significativamente, nos grupos WKY e SHR, o fluxo sanguíneo relativo e a resistência vascular periférica relativa.

Figura 04 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) no fluxo sanguíneo vascular relativo (painel A) e na resistência vascular relativa (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=5-7). * $p<0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 05. Valores basais de fluxo sanguíneo relativo e resistência vascular relativa em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais.

	Fluxo Sanguíneo Relativo (ml. min ⁻¹ /g de tecido)	Resistência Vascular Relativa (mmhg.ml ⁻¹ .min.g de tecido)
SHR		
S ₀ =T ₀	2,7± 0,09	10,7±1,4*
T ₁	3,6±0,43	7,2±0,6
T ₂	2,5±0,35	11,6±0,8
T ₄	2,0±0,21	11,3±2,3
T ₈	2,0±0,82	6,9±1,0 # †
S ₈	2,7± 0,12	12,3±1,6 *
WKY		
S ₀	1,5±0,22	4,7±1,9
S ₈	2,0±0,35	4,8±0,7

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; *n* é o número de ratos em cada subgrupo. T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto. Significância estatística ($p < 0,05$): * vs WKY no respectivo ponto, # vs SHR-S₀, † vs SHR-S₈.

4.1.3 Adaptações Autonômicas cardíacas e periféricas

4.1.3.1 Barorreflexo cardíaco e vascular

Na Figura 05 são expostos os efeitos do treinamento aeróbio sobre o controle barorreflexo cardíaco no modelo experimental de hipertensão arterial primária. Utilizando doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, *iv*, identificamos que os animais hipertensos apresentavam, quando comparados aos ratos normotensos, reduzida BrS (2,3±0,2 vs 3,6±0,3 b/min.mmHg⁻¹, $p < 0,01$) e menor amplitude da curva sigmoidal da FC (130±13 vs 209±19 b/min, $p < 0,01$), bem como elevado platô inferior da FC (311±5 vs 241±13 b/min, $p < 0,01$). O treinamento aeróbio foi capaz de prontamente, já a partir da 1ª. semana, restabelecer a amplitude da curva sigmoidal da FC (178±12 vs 130±13 b/min, $p < 0,01$) e o platô inferior da FC (276±14 vs 311±5 b/min, $p < 0,01$), os quais contribuíram para a normalização da BrS (4,0±0,3 vs. 2,3±0,2 b/min.mmHg⁻¹, $p < 0,05$) a partir da 2ª semana de treinamento. Ao final do protocolo, a curva sigmoidal do barorreflexo (respostas da FC às

variações transitórias da PA média) dos SHR treinados encontrava-se com sensibilidade e amplitude similares às observadas nos animais normotensos e deslocada para valores menores de PA média, sem, no entanto, atingir os níveis pressóricos dos WKY (figura 5; Tabela 06).

Figura 05 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na BrS (Brs, painel A), no intervalo de funcionamento do reflexo (amplitude, painel B) e no platô inferior (painel C) de SHR e WKY durante os protocolos experimentais. No painel D são comparadas as barocurvas dos SHR-S, SHR-T e WKY obtidas ao final dos protocolos (n=12). * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 06. Valores da BrS cardíaca, da amplitude de funcionamento do barorreflexo, do platô inferior e do ponto médio da barocurva sigmoidal.

	BrS (b/min.mmHg ⁻¹)	Amplitude (b/min)	Plato inferior (b/min)	BP ₅₀ (mmHg)
SHR				
S₀=T₀ (n=11)	2,31±0,19 *	122±12 *	311±5 *	159±13*
T₁ (n=12)	2,61±0,12	179±13 #	277±14 #	157±4
T₂ (n=13)	4,04±0,31#	159±9#	305±9 #	152±4
T₄ (n=11)	4,00±0,55#	168±10 #	288±9 #	167±3
T₈ (n=13)	4,04±0,31# †	169±9 # †	259±12 # †	152±2*
S₈ (n=12)	2,00±0,21 *	145±11 *	288±13 *	159±5*
WKY				
S₀ (n=11)	3,58±0,32	200±18	241±13	110±3
S₈ (n=12)	3,89±0,51	199±18	240±15	107±5

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; *n* é o número de ratos em cada subgrupo. T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto; BrS, BrS; BP₅₀, ponto médio da PA média da barocurva sigmoidal. Significância estatística (*p*<0.05): * *p*<0,05 vs WKY no respectivo ponto, # *p*<0,05 vs SHR-S₀, † vs SHR-S₈.

Na Figura 06, estão apresentados os efeitos do treinamento aeróbio sobre o controle barorreflexo vascular nos diferentes grupos experimentais. Assim como o controle barorreflexo cardíaco, utilizamos as respostas reflexas às doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, *iv*. As respostas reflexas consistiram na redução ou no aumento da resistência vascular periférica relativa induzidas pela fenilefrina (aumento da PA) e pelo nitroprussiato de sódio (redução da PA), respectivamente. Conforme elucidado no painel A da Figura 04, a administração aguda de fenilefrina promove uma resposta bifásica caracterizada por aumento instantâneo da resistência vascular periférica relativa (efeito vasoconstritor direto da droga) e, após cerca de 30-60 segundos, pela redução da resistência vascular periférica relativa (efeito reflexo, que é proporcional à alteração pressora e perdura por 1 a 2 minutos). Para o nitroprussiato de sódio, como ilustrado no painel B da Figura 06, sua administração em bolus produziu redução instantânea da resistência vascular periférica relativa (efeito vasodilatador da droga) que foi seguido pelo aumento da resistência vascular

periférica (efeito reflexo). Para a avaliação do barorreflexo vascular quantificamos as respostas reflexas à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio.

No início dos protocolos experimentais, os SHR-S0, quando comparados com os WKY-S0, apresentavam reduzida BrS ($0,25 \pm 0,02$ vs. $26,35 \pm 1,10$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido/mmHg, $p < 0,01$) e aumentado platô inferior ($7,5 \pm 0,11$ vs. $3,6 \pm 0,19$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido para SHR-S0 vs WKY-S0, respectivamente, $p < 0,01$, Figura 06). O treinamento aeróbio aumentou a BrS vascular a partir da 2^a. semana de protocolo ($0,65 \pm 0,10$ vs $0,25 \pm 0,02$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido/mmHg, SHR-T2 vs SHR-S0, $p < 0,05$), com aumento adicional a partir da 4^a. semana de treinamento físico ($2,13 \pm 0,11$ vs $0,25 \pm 0,02$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido/mmHg, SHR-T4 vs SHR-S0, $p < 0,01$). Contudo, ao final de 8 (oito) semanas de treinamento aeróbio, os SHR-T ainda exibiam menor BrS vascular quando comparado aos WKY-S8 ($1,8 \pm 0,4$ vs $22,5 \pm 0,8$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido/mmHg; SHR-T8 vs WKY-S8; $p < 0,01$). No entanto, o treinamento aeróbio foi capaz de normalizar o platô inferior na 8^a. semana experimental, uma vez que os SHR-T8 exibiram valores menores do que os SHR-S0 ($4,8 \pm 0,17$ vs $7,5 \pm 0,11$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido; SHR- T8 vs SHR- S0; $p < 0,05$, Figura 06), os quais foram similares àqueles observados nos WKY-S0 ($3,6 \pm 0,19$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido, $p > 0,05$ vs SHR-T8) e nos WKY-S8 ($3,5 \pm 0,21$ mmHg.ml⁻¹.min.g de tecido, vs SHR-T8). O protocolo de sedentarismo não modificou significativamente a BrS vascular e o platô inferior nos grupos WKY-S e SHR-S (Figura 06). Ao final do protocolo, a curva sigmoidal do barorreflexo (respostas da resistência vascular periférica às variações transitórias da PA média) dos SHR treinados encontrava-se com o platô inferior deslocado para baixo em relação aos SHR sedentários, atingindo níveis similares aos dos WKY. Contudo, embora o treinamento aeróbio tenha aumentado a BrS vascular, esta ainda foi menor nos animais treinados quando comparados aos WKY (Figura 06).

Figura 06 –A infusão de fenilefrina (Painel A) promove elevação da PA e redução do fluxo sanguíneo médio (resposta farmacológica, seta branca, Painel A). Reflexamente, identificamos o aumento do fluxio sanguíneo (resposta reflexa, seta preta, Painel A). A infusão de nitroprussiato de sódio (Painel B) promove redução da PA e aumento do fluxo sanguíneo médio (reposta farmacológica, seta branca, Painel B). Reflexamente, identificamos a redução do fluxo sanguíneo médio (resposta reflexa, seta preta, Painel B). Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo(S) no controle barorreflexo vascular (Brs, painel C) e no platô inferior (painel D) de SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=6-8). * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

A

B

C

D

E

Valores são apresentados como média $\pm$ err o padrão da média; n é o número de ratos em cada subgrupo. T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto; BrS, BrS; BP₅₀, ponto médio da PA média da barocurva sigmoidal. Significância estatística ($p < 0,05$): * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

4.1.3.2 Variabilidade da PA Sistólica, Intervalo de Pulso e Fluxo Sanguíneo periférico

Os efeitos do treinamento sobre a variabilidade da FC, quantificada pela variabilidade do intervalo de pulso (IP), são apresentados na Figura 05. Inicialmente, os SHR-S, quando comparado aos WKY-S, apresentavam reduzida variabilidade do IP e de seu componente de alta frequência ($13 \pm 1,5$ vs. $22 \pm 2,2$ ms²; $3,5 \pm 0,3$ vs. $7,1 \pm 0,4$ ms², respectivamente, $p < 0,05$). Treinamento aeróbio promoveu nos SHR aumento do componente de alta frequência e da variabilidade do IP (de $3,5 \pm 0,3$ para $4,5 \pm 0,9$ ms² e de $13,6 \pm 1,5$ para $21 \pm 0,9$ ms², $p < 0,05$) a partir da 2^a e da 4^a semana de treinamento, respectivamente (Figura 07; Tabela 07). As 8 (oito) semanas transcorridas entre o início e o final dos protocolos não alteraram a variabilidade do PI e do seu componente de alta frequência nos grupos mantidos sedentários (SHR-S e WKY-S, Figura 07; Tabela 07).

Figura 07 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade da FC (Var IP, painel A) e do seu componente de alta frequência (HF, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=12). * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Na Figura 08 são apresentadas as adaptações induzidas pelo treinamento aeróbio na variabilidade da PA sistólica e em seu componente de baixa frequência. No início dos protocolos, os SHR-S, quando comparados aos WKY-S, apresentavam elevada variabilidade da PA sistólica ($13,7 \pm 0,5$ vs $6,4 \pm 0,4$ mmHg², $p < 0,01$), bem como de seu componente de baixa frequência ($2,5 \pm 0,2$ vs $1,1 \pm 0,1$ mmHg², $p < 0,01$, respectivamente). O treinamento aeróbio foi capaz de prevenir ambos, o aumento tempo-dependente da variabilidade da PA sistólica (de $13,7 \pm 0,5$ para $20,0 \pm 2,9$ mmHg² nos SHR-S8, $p < 0,05$, Figura 08; Tabela 07) e a elevação idade-dependente do componente de baixa frequência da PA sistólica (de $2,5 \pm 0,2$ para $4,0 \pm 0,5$ mmHg², nos SHR-S8, $p < 0,05$, Figura 08; Tabela 07). Apesar de significativamente reduzidos, quando comparado aos animais SHR-S8, os SHR treinados por 8 (oito) semanas

ainda apresentavam elevada variabilidade da PA sistólica e de seu componente de baixa frequência quando comparados aos WKY-S8 (Figura 08; Tabela 07).

Figura 08 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade da PA sistólica (Var PA, painel A) e do seu componente de baixa frequência (LF, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=12).

* p<0,05 vs WKY no respectivo ponto, # p<0,05 vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 07. Valores basais de variabilidade da FC (VarPI) e da PA sistólica (VarPAS) e seu componente de baixa frequência (LF) e alta frequência (HF) em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais.

	PA Sistólica		Frequência Cardíaca e Intervalo de Pulso		
	VarPAS (mmHg ²)	LF (mmHg ²)	VarPI (ms ²)	LF (ms ²)	HF (ms ²)
SHR					
S ₀ =T ₀ (n=11)	14,4±0,4	3,30±0,19*	13,6±1,5 *	1,12±0,13	3,47±0,30*
T ₁ (n=12)	13,6±0,7	2,85±0,24	12,1±1,3	0,73±0,08	3,66±0,35
T ₂ (n=13)	13,4±0,8	2,80±0,22	14,4±1,0	0,88±0,12	4,51±0,55 #
T ₄ (n=11)	16,8±1,3	2,49±0,24	21,1±1,0 #	1,23±0,15	4,92±0,33 #
T ₈ (n=13)	13,2±0,5 #†	2,37±0,23 *# †	22,6±3,3# †	1,31±0,23	6,66±1,57 # †
S ₈ (n=12)	20,1±3,0*#	4,35±0,44 *#	14,1±2,8 *	1,14±0,22	4,02±0,33 *
WKY					
S ₀ (n=11)	6,4±0,4	1,13±0,11	22,0±2,2	1,39±0,33	4,80±0,37
S ₈ (n=12)	7,6±0,7	1,13±0,09	26,0±1,7	1,09±0,14	5,61±0,51

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; n é o número de ratos em cada subgrupo. T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto; VarPAS, variabilidade da PA sistólica; VarPI, variabilidade do Intervalo de Pulso; HF, componente de alta frequência; LF, componente de baixa frequência. Significância estatística (p<0.05): * p<0,05 vs WKY no respectivo ponto, # p<0,05 vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Adicionalmente às variabilidades do IP e da PAS, analisamos a variabilidade do fluxo sanguíneo na artéria ilíaca esquerda. No início dos protocolos experimentais, os SHR-S0 exibiram maior variabilidade do fluxo sanguíneo do que WKY-S0 ($1,5 \pm 0,11$ vs $0,8 \pm 0,03$ $[\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}]^2$, respectivamente, $p < 0,05$). O treinamento aeróbio, a partir da 2^a. semana, normalizou a variabilidade do fluxo sanguíneo nos SHR, uma vez que os SHR-T2 apresentavam valores significativamente menores do que os SHR-S0 ($1,5 \pm 0,11$ vs $0,8 \pm 0,14$ $[\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}]^2$, respectivamente, $p < 0,05$). Este benefício do treinamento perdurou até a 8^a. semana de protocolo onde SHR-T demonstraram valores semelhantes aos WKY-S8 ($0,8 \pm 0,14$ vs $0,9 \pm 0,16$ $[\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}]^2$, respectivamente, $p < 0,05$) e significativamente menores do que SHR-S8 ($0,8 \pm 0,14$ vs $1,9 \pm 0,18$ $[\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}]^2$, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 09; Tabela 08).

Figura 09 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade do fluxo sanguíneo periférico em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=5-7). * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 08. Valores basais de variabilidade da fluxo sanguíneo periférico ($[\text{ml. min}^{-1}]^2$) em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais.

Variabilidade do Fluxo Sanguíneo ($[\text{ml. min}^{-1}]^2$)	
<hr/>	
SHR	
S₀=T₀	1,5± 0,11*
T₁	1,3±0,17
T₂	0,8±0,14 [#]
T₄	0,7±0,18 [#]
T₈	0,7±0,16 ^{#†}
S₈	1,9± 0,18*
<hr/>	
WKY	
S₀	0,8±0,03
S₈	0,9±0,16

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto; Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p<0,05$ vs SHR-S₀, † vs SHR-S₈.

4.1.4 Estresse oxidativo nos núcleos regulatórios autonômicos

A fim de sugerir um possível mecanismo molecular que explicasse as adaptações fisiológicas supracitadas, analisamos o conteúdo de espécies reativas de oxigênio nos núcleos autonômicos envolvidos na regulação da função cardiovascular. Para tanto determinamos através da HPLC os efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre os produtos da oxidação do DHE nestas áreas encefálicas. No início dos protocolos experimentais, os SHR-S, quando comparados aos WKY-S, exibiram um maior conteúdo de EOH (1267 ± 122 vs 300 ± 55 EOH/DHE/ μg de proteína, $p<0,01$) e de E ($7,7\pm0,98$ vs $2,4\pm0,25$ E/DHE/ μg de proteína, $p<0,01$, Figura 10; Tabela 09) no PVN. Já na 1^a. semana de treinamento aeróbio, SHR-T apresentaram redução significativa de EOH (de 1267 ± 122 para 921 ± 133 EOH/DHE/ μg de proteína, $p<0,05$) e de E (de $7,7\pm0,98$ para $4,8\pm0,78$ E/DHE/ μg de proteína, $p<0,05$) quando comparados aos SHR-S₀, os quais foram normalizados a partir da 2^a. semana de treinamento (Figura 10; Tabela 09).

Figura 10 – Adaptações sequenciais geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) no conteúdo de EOH (indicador de superóxido, painel A) e E (indicador de espécies reativas de oxigênio totais, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN. (n=5). * $p<0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Contrastando com o PVN, não identificamos no DBS no início dos protocolos diferenças significativas na concentração de EOH e E (405 ± 82 vs 457 ± 91 EOH/DHE/μg de proteína; $2,0 \pm 0,1$ vs $2,5 \pm 0,1$ E/DHE/μg de proteína, respectivamente, $p>0,05$, Figura 11), entre os SHR e os WKY sedentários. No entanto, houve, ao longo das 8 semanas de sedentarismo, elevação na concentração de EOH e de E (de 405 ± 82 para 1442 ± 56 EOH/DHE/μg de proteína e de $2,0 \pm 0,1$ para $13,8 \pm 6,0$ E/DHE/μg de proteína; SHR-S0 para SHR-S8, respectivamente; $p<0.01$), que foram abolidos pelo treinamento aeróbio, uma vez que os SHR-T8, quando comparados aos SHR-S8, exibiram reduzida concentração de EOH e de E (308 ± 46 vs 1442 ± 56 EOH/DHE/μg de proteína e $3,9 \pm 1,7$ vs $13,8 \pm 6,0$ E/DHE/μg de proteína, respectivamente $p<0,05$, Figura 11; Tabela 09), os quais não diferiam dos valores apresentados por WKY-S0 e WKY-S8 (Figura 11; Tabela 09).

Figura11 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) no conteúdo de EOH (indicador de superóxido, painel A) e E (indicador de espécies reativas de oxigênio totais, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no DBS. (n=5). * $p<0,05$ vs WKY, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

De maneira semelhante ao observado no DBS, não identificamos no VBS na semana 0 diferenças significativas no conteúdo de EOH (1657 ± 309 vs 1341 ± 294 EOH/DHE/ μ g de proteína) e de E ($4,7 \pm 0,8$ vs $6,1 \pm 1,00$ E/DHE/ μ g de proteína), entre os SHR e os WKY (Figura 12; Tabela 09). Nos SHR, o sedentarismo também promoveu, ao longo das 8 (oito) semanas, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no VBS (EOH: de 1657 ± 309 para 3108 ± 204 EOH/DHE/ μ g de proteína; E: de $4,7 \pm 0,8$ para $8,4 \pm 0,5$ E/DHE/ μ g de proteína; $p<0.01$; SHR-S0 para SHR-S8). De forma análoga à observada no PVN, o treinamento aeróbio determinou a redução da concentração dos indicadores de espécies reativas de oxigênio no VBS, a partir da 4^a. semana de treinamento, fase em que os SHR-T, quando comparados aos SHR-S0, apresentavam menor conteúdo de EOH (662 ± 42 vs 1657 ± 309 EOH/DHE/ μ g de proteína, $p<0.01$, Figura 12; Tabela 09). Houve também redução significativa de E a partir da 2^a. semana de treinamento, quando SHR-T2 apresentavam menor conteúdo de E no VBS ($3,0 \pm 0,3$ vs $4,7 \pm 0,8$ E/DHE/ μ g de proteína nos SHR-S0, $p<0.05$). Estes efeitos do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de EOH e de E foram mantidos até o final dos protocolos (Figura 12; Tabela 09).

Figura 12 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) no conteúdo de EOH (indicador de superóxido, painel A) e E (indicador de espécies reativas de oxigênio totais, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no VBS. (n=5). * $p<0,05$ vs WKY, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 09. Produção de espécies reativas de oxigênio no PVN, no DBS e no VBS em SHR sedentários (S) e treinados (T) e WKY sedentários nos diferentes pontos experimentais. n=5

	EOH/DHE (EOH/DHE/μg)			E/DHE (E/DHE/μg)		
	PVN	DBS	VBS	PVN	DBS	VBS
SHR						
S ₀ =T ₀	1268±122 *	404±81	1657±309	7,7±1,0 *	2,0±0,1	4,7±1,0
T ₁	921±133 #	627±205	1727±149	4,9±0,8 #	2,9±0,2	3,0±0,3
T ₂	282±53 #	708±131	1116±288	1,7±0,3 #	3,5±0,7	3,6±0,6
T ₄	458±27 #	696±205	661±42#	2,7±0,2 #	3,6±0,6	2,4±0,3 #
T ₈	344±40 # †	308±46†	658±32 #†	1,2±0,2 # †	3,9±1,7 †	2,1±0,2 #†
S ₈	962±159 *	1442±56 *	3126±156 *	5,2±0,7 *	13,8±6,0 *	9,4±1,0 *
WKY						
S ₀	300±55	456±90	1341±294	2,4±0,2	2,5±0,1	6.1±0,6
S ₈	360±46	395±29	1356±247	2,1±0,1	2,4±0,2	5.8±0,5

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média; T, treinamento aeróbio; S, sedentarismo; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKY, ratos Wistar Kyoto; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; DBS, bulbo dorsal; VBS, bulbo ventral; EOH, 2-hidroxi-etídio; E, Etídio. Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Em adição à quantificação da produção das espécies reativas de oxigênio no PVN, analisamos também no PVN a expressão gênica das subunidades $p47^{\text{phox}}$ e $gp91^{\text{phox}}$ da NADPH oxidase, a principal enzima geradora de espécies reativas de oxigênio (Figura 13). No início dos protocolos experimentais, os SHR-S0, quando comparados aos WKY-S0, apresentaram elevada expressão gênica da $p47^{\text{phox}}$ ($2,33 \pm 0,17$ vs $1,28 \pm 0,44$ UA, $p < 0,05$), mas valores similares quanto à expressão gênica da $gp91^{\text{phox}}$ ($2,1 \pm 0,4$ vs $1,3 \pm 0,4$ UA, $p > 0,05$). O treinamento aeróbio foi capaz de reduzir a expressão gênica da $p47^{\text{phox}}$ (de $2,33 \pm 0,17$ para $0,66 \pm 0,25$ UA, $p < 0,05$) e da $gp91^{\text{phox}}$ (de $2,7 \pm 0,42$ para $0,6 \pm 0,10$ UA, $p < 0,05$) a partir da 2^a. e da 4^a. semana de treinamento, respectivamente, quando comparado aos valores em SHR-S0 (Figura 13). Estas adaptações ao treinamento aeróbio perduraram até o final dos protocolos experimentais. Nenhuma alteração de expressão foi observada nos grupos mantidos sedentários.

Figura 13 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na expressão gênica das subunidades $p47^{\text{phox}}$ (painel A) e $gp91^{\text{phox}}$ (painel B) da NADPH oxidase em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN. (n=7-9). * $p < 0,05$ vs WKY, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, & vs SHR-S8.

4.1.5 Ativação das MAPKs

Adicionalmente à análise da disponibilidade de espécies reativas de oxigênio e da expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase, verificamos também a ativação de vias de sinalização redox sensíveis no PVN, como a MAPK p42/p44 e a MAPK p38 através de western blotting (Figura 14). Não identificamos diferenças significativas na fosforilação da p42/p44 entre SHR-S0 e WKY-S0 ($1,00 \pm 0,00$ vs $0,96 \pm 0,48$ UA). Contudo, o treinamento aeróbio reduziu a fosforilação da p42/p44 a partir da 2^a semana (de $1,00 \pm 0,00$ para $0,46 \pm 0,10$ UA, nos SHR-T2, $p < 0,05$). Este efeito do treinamento perdurou até a 8^a semana experimental

(Figura 14). A fosforilação da MAPKp38 não apresentou nenhuma diferença significativa nos grupos sedentários e treinado ao longo dos protocolos experimentais (Figura 14).

Figura 14 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na fosforilação da MAPK p42/p44 (gel representativo, painel A; quantificação dos resultados, painel B) e MAPK p38 (gel representativo, painel C; quantificação dos resultados, painel D) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN. (n=5). * $p < 0,05$ vs WKY, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, & vs SHR-S8.

4.1.6 Atividade do NF- κ B

Em sequência, analisamos a atividade do fator de transcrição NF- κ B em núcleos autonômicos através do ensaio de mobilidade eletroforética. Conforme indicado na Figura 13, os SHR-S0, acompanhando o comportamento das espécies reativas de oxigênio, apresentaram, no PVN, uma maior atividade transcriptase do NF- κ B quando comparado aos WKY-S0 (100 vs $56 \pm 11\%$, respectivamente, $p < 0.05$). O treinamento aeróbio normalizou a atividade do NF- κ B a partir da 2^a. semana (72 ± 8 vs 100%, $p < 0.05$), com redução ainda mais intensa na 4^a. semana experimental (Figura 15). Não houve alterações na ativação do NF- κ B nos grupos mantidos sedentários.

Figura 15 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na atividade do NF- κ B (gel representativo, painel A; quantificação dos resultados, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no PVN. (n=4-5). * $p<0,05$ vs WKY, # $p<0,05$ vs SHR-S0, & vs SHR-S8.

De forma similar à concentração dos indicadores de espécies reativas de oxigênio, SHR-S0 vs WKY-S0 não apresentaram no DBS atividade do NF- κ B diferente no início dos protocolos experimentais (100 ± 0 vs $95\pm45\%$, Figura 16). Ao longo das 8 (oito) semanas de sedentarismo, houve no DBS dos SHR-S aumento marcante da atividade do NF- κ B (de 100 ± 0 para $1361\pm896\%$ nos SHR-S8, $p<0,01$, Figura 16). Interessantemente, o treinamento aeróbio preveniu o aumento da atividade do NF- κ B no DBS, mantendo-a inalterada nos SHR-T durante as 8 (oito) semanas experimentais, com valores similares aos dos grupos WKY-S (71 ± 27 nos SHR-T8 vs $1361\pm896\%$ nos SHR-S8, $p<0,01$, Figura 16).

Figura 16 – Adaptações geradas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na atividade do NF- κ B (gel representativo, painel A; quantificação dos resultados, painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais no DBS. (n=4-5). * p<0,05 vs WKY, # p<0,05 vs SHR-S0, & vs SHR-S8.

4.1.7 Expressão gênica de Citocinas em áreas regulatórias autonômicas

Na medida em que o NF- κ B é um fator de transcrição crucial na regulação da expressão gênica de citocinas, avaliamos ao longo dos protocolos de treinamento e de sedentarismo, através do Real Time RT-PCR, a expressão gênica do TNF- α e IL6 (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória) em áreas autonômicas de regulação. No início dos protocolos, os SHR-S0, quando comparados aos WKY-S0, apresentavam elevado conteúdo de RNAm de TNF- α em todas as áreas estudadas (DBS= $3,35 \pm 0,17$ vs. $1,86 \pm 0,16$ UA; $p < 0,01$; VBS= $2,10 \pm 0,23$ vs. $1,06 \pm 0,14$ UA; $p < 0,05$; PVN = $2,0 \pm 0,3$ vs $1,1 \pm 0,1$ UA; $p < 0,05$; Figura 17). Observamos que, como ilustrado nos painéis A, B e C da Figura 15, o treinamento aeróbio determinou pronta normalização do conteúdo do RNAm de TNF- α no DBS (-43% a partir de T₂), no VBS (-42% a partir de T₁) e no PVN (-39% a partir de T₂), estes valores que foram mantidos até o final dos protocolos (Figura 17). A expressão gênica de TNF- α não foi alterada nos SHR-S e nos WKY-S ao longo das 8 (oito) semanas de sedentarismo.

Figura 17 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre a expressão de RNAm de TNF- α no DBS (painel A), VBS (painel B) e PVN (painel C) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais. * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

O efeito do treinamento sobre a expressão protéica do TNF- α foi confirmado no PVN pela técnica de imunofluorescência. Semelhante à expressão gênica, a intensa imunorreatividade ao TNF- α exibida pelos SHR-S0 quando comparado os WKY-S0 foi atenuada após 2 (duas) semanas de treinamento aeróbio.

Figura 18 –Redução da imunofluorescência para o TNF- α no subnúcleo ventromedial do PVN (uma importante área pré-autônômica) em SHR-T na 2^a. semana experimental., fase em que a imunofluorescência iguala-se àquela apresentada pelos WKY-S0. Os painéis em B mostram imagens ampliadas do PVN ventromedial no SHR-S0 e SHR-T2. 3V= 3^o. Ventrículo cerebral.

Além do TNF- α , analisamos também a expressão gênica da IL6, a qual não diferia significativamente, entre os SHR-S0 e os WKY-S0, no DBS e no VBS (Figura 19). Entretanto, no PVN, os SHR-S0 exibiam um elevado número de cópias do RNAm da IL6, quando comparados aos controles WKY-S0 ($4,90 \pm 0,84$ vs $1,14 \pm 0,33$, $p < 0.01$). O treinamento aeróbio produziu nas 3 (três) áreas analisadas importante redução do conteúdo de RNAm de IL6, já a partir da 2^a semana experimental, (-52% no DBS, -51% no VBS e -83% no PVN, $p < 0.05$, painéis A, B e C da Figura 19), mantendo-se nestes valores até a 8^a. semana de treinamento. Observamos também que a expressão da IL6 nos SHR-T foi normalizada no PVN e mantida em níveis inferiores aos dos WKY-S no DBS e VBS. Em todas as áreas analisadas o sedentarismo não alterou a expressão gênica da IL6 nos grupos mantidos sedentários (Figura 19).

Figura 19 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) no conteúdo de RNAm do Interleucina-6 (IL-6) no DBS (painel A), VBS (painel B) e PVN (painel C) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais. * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Além das citocinas pró-inflamatórias, quantificamos também a expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 20). Apesar de não termos identificado no DBS no início dos protocolos diferenças na expressão gênica de IL-10 entre SHR-S0 e WKY-S0, o treinamento aeróbio aumentou transitoriamente seu conteúdo entre T2 e T4 com diferença significativa em T4 (+127% vs SHR-S0, $p < 0,05$, Figura 20). No VBS dos SHR-S0, a expressão gênica da IL-10 encontrava-se significativamente reduzida quando comparada à dos WKY-S0 (-92% vs WKY-S0; $p < 0,01$). O treinamento aeróbio aumentou transitoriamente sua expressão gênica entre T2 e T4 (+ 94% vs SHR-S0, $p < 0,01$, Figura 20).

Figura 20 – Alterações sequenciais promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) sobre o conteúdo de RNAm de Interleucina-10 (IL-10) no DBS (painel A) e VBS (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais. * $p < 0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p < 0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

4.2 Estudo II

Como indicado anteriormente, o Estudo II foi dividido em duas etapas. Na primeira delas, demonstramos através da análise de variáveis fisiológicas e do emprego de técnicas de biologia molecular que o HMGB1 promove, em ratos normotensos e conscientes, disfunção autonômica, inflamação e ativação da microglia no PVN através do receptor CXCR4.

4.2.1 Respostas cardiovasculares à infusão intracerebroventricular de HMGB1

A fim de confirmar nossa hipótese de que o HMGB1 possui um papel relevante no controle do sistema nervoso central sobre a função cardiovascular, administramos, em ratos normotensos e conscientes, através de cânula inserida no terceiro ventrículo, o HMGB1 em diferentes dosagens (0.38 μ g e 3.8 μ g). Antes da infusão, os diferentes grupos apresentaram valores semelhantes de PAM e FC. As alterações na PA e na FC foram calculadas a partir do Δ (PAM_{final} ou $FC_{final} - PAM_{inicial}$ ou $FC_{inicial}$). Enquanto a infusão ICV do veículo e 0.38 μ g de HMGB1 não promoveram alterações significativas na PAM e na FC, ratos tratados com 3.8 μ g de HMGB1 exibiram elevação mantida da PAM e da FC, a partir do 5º e 10º minuto do protocolo, respectivamente (Tabela 10-11, Figura 21).

Após demonstrarmos o efeito pressórico e taquicárdico do HMGB1, realizamos pré-tratamento com o bloqueador do receptor CXCR4 (ADM3100) para confirmar nossa hipótese de que os efeitos cardiovasculares da administração de central de HMGB1 eram mediados pelo receptor CXCR4. A prévia administração de ADM3100 (5 μ g) não modificou a resposta pressórica e taquicárdica ao HMGB1. No entanto, a dose mais concentrada de ADM3100 (50

μg) aboliu completamente o aumento da PAM induzido por 3.8 μg de HMGB1 durante todo o protocolo experimental (Tabela 10-11, Figura 21).

Figura 21 – Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 na PA média e na FC e a participação do receptor CXCR4.

A

B

Tabela 10. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel da receptor CXCR4 na PA média (Δ PA média).

Tempo (min)	Veículo (mmHg)	HMGB1 0.38 μg (mmHg)	HMGB1 3.8 μg (mmHg)	HMGB1 + AMD3100 3.8 μg 5 μg (mmHg)	HMGB1 + AMD3100 3.8 μg 50 μg (mmHg)
5	5±2	4±4	14±4 *#	15±5 *#	5±2
10	3±1	2±2	14±3 *#	16±4 *#	3±2
15	3±1	4±2	17±1 *#	17±3 *#	3±2
20	5±2	6±2	19±2 *#	21±2 *#	3±2
25	5±1	7±3	21±1 *#	20±2 *#	3±2
30	5±2	3±2	21±2 *#	20±2 *#	3±2

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. AMD3100, antagonista do receptor CxCr4. Significância estatística ($p < 0,05$): * $p < 0,05$ HMGB1 3.8 μg vs veículo, HMGB1 0.38 μg e HMGB1 3.8 μg + AD3100 50 μg ; # HMGB1 3.8 μg + AD3100 5 μg vs veículo, HMGB1 0.38 μg e HMGB1 3.8 μg + AD3100 50 μg .

Tabela 11. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel da receptor CXCR4 na FC (Δ FC).

	Veículo (b/min)	HMGB1 0.38 μ g (b/min)	HMGB1 3.8 μ g (b/min)	HMGB1 + AMD3100 3.8 μ g 5 μ g (b/min)	HMGB1 + AMD3100 3.8 μ g 50 μ g (b/min)
Tempo (min)					
5	10 $\pm$ 6	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 10
10	-2 $\pm$ 6	-7 $\pm$ 11	25 $\pm$ 8 *#	26 $\pm$ 6 *#	-16 $\pm$ 11
15	-5 $\pm$ 6	-7 $\pm$ 11	34 $\pm$ 10 *#	35 $\pm$ 5 *#	-16 $\pm$ 10
20	-3 $\pm$ 7	-6 $\pm$ 9	53 $\pm$ 9 *#	55 $\pm$ 6 *#	-19 $\pm$ 11
25	-5 $\pm$ 4	-7 $\pm$ 12	54 $\pm$ 7 *#	54 $\pm$ 8 *#	-23 $\pm$ 13
30	-4 $\pm$ 4	-18 $\pm$ 12	49 $\pm$ 4 *#	48 $\pm$ 6 *#	-31 $\pm$ 11

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. AMD3100, antagonista do receptor CxCr4. Significância estatística ($p < 0,05$): Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. AMD3100, antagonista do receptor CxCr4. Significância estatística ($p < 0,05$): * $p < 0,05$ HMGB1 3.8 μ g vs veículo, HMGB1 0.38 μ g e HMGB1 3.8 μ g + AD3100 50 μ g; # HMGB1 3.8 μ g + AD3100 5 μ g vs veículo, HMGB1 0.38 μ g e HMGB1 3.8 μ g + AD3100 50 μ g..

4.2.2 Respostas autonômicas à infusão intracerebroventricular de HMGB1

Além dos efeitos cardiovasculares da infusão central de HMGB1, determinamos o efeito deste peptídeo e a participação do receptor CXCR4 nas respostas de variabilidade da PA sistólica e do PI, bem como seus componentes de alta e baixa frequência. Ainda analisamos a função barorreflexa, através da administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, *iv*, após o período de 30 minutos em que foram analisadas as demais variáveis autonômicas. De maneira distinta da PAM e da FC, as variáveis autonômicas encontram-se expressas em percentual do basal.

Como ilustrado nas Tabelas 12-16 e na Figura 22, no início da infusão não observamos, entre os grupos experimentais, diferenças significativas nas variáveis analisadas. A infusão ICV de HMGB1 (3.8 μ g) reduziu a variabilidade do IP e seu componente de alta frequência a partir do 5º minuto de infusão. HMGB1 produziu ainda aumento no componente de baixa frequência da variabilidade do IP também a partir do 5º minuto de infusão. Além da variabilidade do PI, o tratamento agudo com HMGB1 produziu elevação significativa da variabilidade da PA sistólica a partir do 10º minuto, mas, no que diz respeito ao seu componente de baixa frequência, apenas após 20º minuto. De maneira semelhante ao

identificado nas variáveis cardiovasculares, a infusão ICV prévia de AD3100 (50 μ g) aboliu completamente a diminuição da variabilidade do IP e de seu componente de alta frequência, bem como o aumento do componente de baixa frequência da variabilidade da FC, da variabilidade da PA sistólica e do componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica durante todo o protocolo experimental. O grupo HMGB1 3.8 μ g + ADM3100 5 μ g não determinou diferenças significativas nas variáveis autonômicas quando comparado ao grupo HMGB1 3.8 μ g.

Figura 22 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 (0.38 μ g ou 3.8 μ g) na variabilidade da FC (painel A), no componente de alta frequência da variabilidade da FC (painel B) e no componente de baixa frequência da variabilidade da FC (painel C), na variabilidade da PA sistólica (Painel D) e no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica (Painel E). n=7. * p<0,05 HMGB1 3.8 μ g vs veículo, HMGB1 0.38 μ g e HMGB1 3.8 μ g + AD3100 50 μ g; # HMGB1 3.8 μ g + AD3100 5 μ g vs veículo, HMGB1 0.38 μ g e HMGB1 3.8 μ g + AD3100 50 μ g.

E

Tabela 12. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na variabilidade da FC.

	Veículo (% do Tempo 0)	HMGB1 0.38 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 3.8 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 5µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 50µg (% do Tempo 0)
Tempo (min)					
5	153±27	131±8	85±6 *#	84±8 *#	185±20
10	105±19	117±11	70±14 *#	78±6 *#	164±30
15	133±42	141±25	49±3 *#	55±6 *#	138±30
20	168±33	132±10	53±12 *#	54±6 *#	132±34
25	91±10	93±17	38±8 *#	38±7 *#	91±7
30	136±8	152±24	38±7 *#	41±5 *#	88±10

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média. AMD3100, antagonista do receptor CxCr4. Significância estatística ($p < 0.05$): * $p < 0,05$ HMGB1 3.8µg vs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg; # HMGB1 3.8µg + AD3100 5µg vs H2O, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg.

Tabela 13. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no component de alta frequência da variabilidade da FC.

	Veiculo (% do Tempo 0)	HMGB1 0.38 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 3.8 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 5µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 50µg (% do Tempo 0)
Tempo (min)					
5	96±12	120±4	77±11 *#	79±8 *#	136±16
10	97±9	134±12	63±18 *#	58±7 *#	160±24
15	106±7	141±25	58±13 *#	48±12 *#	148±17
20	142±19	130±3	53±12 *#	52±10 *#	159±16
25	103±12	180±49	53±10 *#	51±5 *#	148±34
30	108±10	165±39	48±10 *#	47±4 *#	135±49

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ HMGB1 3.8µgvs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg; # HMGB1 3.8µg + AD3100 5µg vs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg.

Tabela 14. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no componente de baixa frequência da variabilidade da FC.

	Veiculo (% do Tempo 0)	HMGB1 0.38 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 3.8 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 5µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 50µg (% do Tempo 0)
Tempo (min)					
5	108±10	65±6	282±58 *#	280±32 *#	110±9
10	114±22	86±9	191±48 *#	188± 21*#	92±12
15	103±8	111±17	191±33 *#	186± 20 *#	106±14
20	156±14	92±11	223±31 *#	199±24 *#	112±26
25	128±12	89±29	218±34 *#	220±28 *#	120±15
30	123±8	59±8	217±41 *#	219±20 *#	132±23

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ HMGB1 3.8µgvs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg; # HMGB1 3.8µg + AD3100 5µg vs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg.

Tabela 15. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 na variabilidade da PA sistólica.

	Veículo (% do Tempo 0)	HMGB1 0.38 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 3.8 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 5µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 50µg (% do Tempo 0)
Tempo (min)					
5	138±14	114±40	169±48 *#	211±35 *#	111±7
10	144±20	114±35	189±54 *#	210± 22*#	60±7
15	138±21	113±19	266± 88*#	259± 33 *#	62±2
20	133±18	96±16	303±62 *#	289±32 *#	56±14
25	120±10	110±20	288±65 *#	290±28 *#	47±8
30	120±7	81±9	256±38 *#	261±29 *#	70±10

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ vs WKY no respectivo ponto, # $p<0,05$ vs SHR-S0, † vs SHR-S8.

Tabela 16. Efeito da administração intracerebroventricular de HMGB1 e o papel do receptor CXCR4 no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica.

	Veículo (% do Tempo 0)	HMGB1 0.38 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 3.8 µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 5µg (% do Tempo 0)	HMGB1 + AMD3100 3.8µg 50µg (% do Tempo 0)
Tempo (min)					
5	96±14	93±11	184±47 *#	209±29 *#	122±63
10	118±4	93±25	279±82 *#	285± 22*#	40±2
15	94±13	128±13	236± 58*#	270± 33 *#	46±8
20	138±20	122±12	178±5 *#	201±14 *#	35±3
25	138±21	116±17	246±43 *#	234±38 *#	56±6
30	108±25	74±15	213±18 *#	225±26 *#	73±9

Valores são apresentados como média ± erro padrão da média Significância estatística ($p<0.05$): * $p<0,05$ HMGB1 3.8µg vs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg; # HMGB1 3.8µg + AD3100 5µg vs veículo, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg.

Quanto ao controle barorreflexo cardíaco, o grupo HMGB1 3.8 μ g reduziu significativamente a BrS e elevou o platô inferior quando comparado aos grupos veículo HMGB1 0.38 μ g e HMGB1 3.8 μ g + ADM3100 5 μ g (Figura 23). De maneira coerente com as respostas cardiovasculares e as demais respostas autonômicas, o tratamento com 50 μ g, mas não com 5 μ g, de ADM3100 corrigiu a BrS e reduziu platô inferior determinado pelo HMGB 3.8 μ g. Na Figura 23, são ilustradas as curvas sigmoidais do controle barorreflexo da FC dos grupos veículo, HMGB1 3.8 μ g e HMGB1 3.8 μ g + ADM3100 50 μ g. A infusão de HMGB 3.8 deslocou a curva para a direita, reduzindo sua sensibilidade e seu intervalo operacional. Estas modificações foram completamente bloqueadas com o pré-tratamento de ADM3100 50 μ g (Figura 23). Estes resultados fisiológicos sugerem que o HMGB1, administrado centralmente promove disfunção autonômica e simultânea elevação da PAM e da FC através de receptores CXCR4, uma vez que os efeitos foram revertidos pelo bloqueio ICV destes receptores.

Figura 23 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1(0.38 µg ou 3.8µg) na BrS (painel A) e no platô inferior da curva sigmoidal do controle barorreflexo cardíaco. Curva sigmoidal do controle barorreflexo cardíaco nos grupos veículo, HMGB1 3.8 µg e HMGB1 3.8 µg + ADM3100 50 µg (Painel C). n=7. * p<0,05 vs H2O, HMGB1 0.38µg e HMGB1 3.8µg + AD3100 50µg.

4.2.3 Sinalização celular ativada pelo HMGB1 no PVN

Após demonstrarmos que a administração ICV de HMGB1 promove disfunção autonômica e elevação da PAM e da FC através do receptor CXCR4, analisamos a ativação da via de sinalização do receptor CXCR4 pela técnica do Western blotting.

Na medida em que a HMGB1 forma um heterocomplexo com a SDF1 (YANG et al., 2013), avaliamos a expressão protéica desta quimiocina após a infusão de HMGB1 no PVN. Os animais tratados ICV com HMGB1 apresentaram uma maior expressão protéica do que aqueles que receberam veículo (1.35 ± 0.24 vs 0.35 ± 0.06 UA, respectivamente, $p < 0.01$, Figura 24). O pré-tratamento com bloqueador do receptor CXCR4 não modificou este efeito do HMGB1, uma vez que HMGB1 (3.8 μ g) + ADM3100 (50 μ g) também determinaram maior expressão protéica do SDF1 quando comparado aos controles (1.76 ± 0.19 vs 0.35 ± 0.06 UA, respectivamente, $p < 0.01$; Figura 24A). Diferentemente do que foi observado para o SDF1, não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à expressão do CXCR4 no PVN (Figura 24B).

Figura 24 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 (3.8µg) na expressão protéica do SDF1 (painel A) e CXCR4 (painel B) n=5. * p<0,01.

A

B

Analizamos ainda no PVN dos diferentes grupos experimentais a via MAPK p42/p44, *downstream* ao CXCR4 (Figura 25). Ratos tratados ICV com HMGB1 (3.8 μ g) apresentaram maior fosforilação da MAPK p42/p44 quando comparados ao veículo (2.45 ± 0.25 vs 1.33 ± 0.14 UA, respectivamente, $p < 0.05$). Este efeito foi completamente abolido naqueles animais pré-tratados com o bloqueador do receptor CXCR4, pois estes exibiram menor fosforilação da p42/p44 do que a observada após HMGB1 3.8 μ g sem o bloqueador (1.25 ± 0.11 vs 2.45 ± 0.25 UA, respectivamente, $p < 0.05$, Figura 25A). Após verificarmos que HMGB1 promove fosforilação da MAPK p42/p44, que é uma das principais vias de estimulação do fator de transcrição NF- κ B no PVN a partir do receptor CXCR4, determinamos o efeito da infusão ICV de HMGB1, bem como a participação do receptor CXCR4, na ativação do NF- κ B através da análise da fosforilação do I κ B- α . A HMGB1 (3.8 μ g) induziu a fosforilação do I κ B- α quando comparado ao grupo controle (2.08 ± 0.22 vs 1.01 ± 0.04 UA, respectivamente $p < 0.01$, Figura 25B). À semelhança do observado para a p42/p44, o ADM3100 (50 μ g) foi capaz de abolir o aumento da fosforilação da I κ B- α , já que esses animais apresentaram menor fosforilação do I κ B- α quando comparado ao grupo HMGB1 3.8 μ g (1.02 ± 0.06 vs 2.08 ± 0.22 UA, respectivamente, $p < 0.01$; Figura 25B).

Figura 25 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 (3.8 μ g) na fosforilação da MAPK p42/p44 (painel A) e I κ B- α (painel B) n=5. * $p < 0,01$.

A

B

4.2.4 HMGB1 promove ativação de microglia e inflamação no PVN

De acordo com os dados da imunofluorescência para Ib1a, marcador celular de microglia ativada, o tratamento agudo de HMGB1 produziu uma intensa ativação de microglia no PVN, uma vez que, além de identificarmos um maior número de células ativadas, estas apresentaram um maior volume nuclear. O pré-tratamento com ADM3100 (50 μg) inibiu parcialmente este efeito celular (Figura 26A). A fim de se quantificar a ativação de microglia induzida pelo HMGB1 no PVN, avaliamos também a expressão protéica do Ib1a no PVN através do Western blotting (Figura 26B). Ratos tratados com HMGB1 (3.8μg) exibiram uma maior expressão protéica do que aqueles tratados com veículo (1.3 ± 0.14 vs 0.3 ± 0.08 UA, respectivamente, $p < 0.01$). Também a administração prévia do ADM3100 (50μg) normalizou a expressão do Ib1a no PVN, pois esses animais apresentaram valores significativamente menores do que os animais apenas tratados com HMGB1 (0.6 ± 0.03 vs 1.3 ± 0.14 UA, respectivamente, $p < 0.01$) e semelhantes aos observados no grupo controle (0.3 ± 0.08 UA, $p > 0.05$, Figura 26B).

Figura 26 – Figuras representativa da marcação para Ib1a no PVN de ratos tratados com veículo, HMGB1 (3.8µg) ou HMGB1 (3.8µg) + ADM3100 (50µg) (Painel A). n=2. Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 (3.8µg) na expressão protéica de Ib1A no PVN (Painel B). n=5. * p<0,01.

A

B

Após identificarmos que o HMGB1 promove ativação de microglia no PVN através do receptor CXCR4, analisamos a expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF- α , pois a microglia é considerada uma das principais fontes de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento ICV com HMGB1 aumentou a expressão protéica da IL6 (de 0.5 ± 0.07 para 1.5 ± 0.42 UA, $p < 0.01$, Figura 27A) e do TNF- α (de 1.1 ± 0.10 para 2.6 ± 0.22 UA,

$p < 0.01$, Figura 27B) quando comparado a seus controles. Coerentemente, ratos pré-tratados com ADM3100 exibiram valores significativamente menores de IL6 (0.5 ± 0.16 vs 1.5 ± 0.42 UA, respectivamente, $p < 0.01$, Figura 27A) e de TNF- α do que os tratados somente com HMGB1 (1.1 ± 0.08 vs 2.6 ± 0.22 UA, respectivamente, $p < 0.01$, Figura 27B).

Figura 27 – Efeito agudo da administração ICV de HMGB1 ($3.8 \mu\text{g}$) na expressão protéica da IL6(painel A) e TNF- α (painel B) $n=5$. * $p < 0,01$.

A

B

4.2.5 Efeitos do treinamento aeróbio nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos

Na segunda etapa do Estudo II, analisamos em SHR e WKY os efeitos do treinamento (2 semanas de treinamento aeróbio, 5x/semana; 1hora/dia; 50%-60% da capacidade máxima) sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos em repouso, sobre a concentração de HMGB1 no PVN, no líquido cérebro-espinhal e no plasma, bem como os efeitos celulares (ativação de microglia) e de sinalização do HMGB1 (ativação da sinalização do CXCR4/MAPK p42-p44/ NF-κB e expressão de citocinas pró-inflamatórias) no PVN.

À semelhança do observado no Estudo I, após 2 semanas de treinamento aeróbio, SHR-T continuavam a apresentar PAM similar à dos SHR-S (161 ± 4 vs 160 ± 4 mmHg, respectivamente, $p > 0.05$, Figura 26A) e ambos, SHR-T e SHR-S, apresentavam PAM significativamente maior do que os WKY-S e WKY-T (104 ± 7 e 100 ± 5 mmHg). Quanto à FC, SHR-S (355 ± 3 b/min) exibiram maior FC de repouso do que os grupos WKY-S e WKY-T (309 ± 4 e 305 ± 3 b/min, Figura 28B). O treinamento aeróbio por 2 (duas) semanas foi capaz de normalizar a FC basal dos SHR-T (de 355 ± 3 em S0 para 315 ± 6 b/min em T2, $p < 0.05$; (Figura 28B), determinando apenas ligeira redução da FC basal nos normotensos ($p > 0.05$).

Figura 28 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na PA média (painel A) e na FC (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=7). * p<0.05.

De acordo com os achados do Estudo I e com a menor FC de repouso também identificada nos SHR-T deste estudo, o treinamento aeróbio também foi capaz de normalizar as alterações autonômicas dos SHR, uma vez que foram normalizadas a variabilidade do IP (21.1 ± 2.0 vs 45.2 ± 8.9 ms²; SHR-T vs SHR-S; p<0.05, Figura 29A) e seus componentes de alta e de baixa frequência (19.3 ± 3.3 vs 5.0 ± 0.6 ms² e 1.8 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.2 ms² para SHR-T vs SHR-S; p<0.01, Figuras 29B e 29C). Embora, duas semanas de treinamento aeróbio não tenham modificado significativamente a variabilidade da PA sistólica (15.8 ± 2.0 vs 17.7 ± 0.9 mmHg²; SHR-T vs SHR-S; p>0.05, Figura 29D), o treinamento aeróbio normalizou seu componente de baixa frequência (4.4 ± 0.2 vs 2.7 ± 0.2 mmHg²; SHR-T vs SHR-S; p<0.05, Figura 29E). Nos WKY, o treinamento aeróbio não modificou significativamente as variáveis autonômicas analisadas (Figuras 29).

Figura 29 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na variabilidade da FC (painel A), no componente de alta frequência da variabilidade da FC (painel B), no componente de baixa frequência da variabilidade da FC (painel C), na variabilidade da PA sistólica (painel D) e no componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica (painel E) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais (n=7). * p<0.05.

4.2.6 Efeito do treinamento aeróbio na concentração de HMGB1 no PVN

Após verificarmos que o tratamento ICV do HMGB1 promovia disfunção autonômica e que o protocolo de treinamento aeróbio, com duração de duas semanas, normalizava a função autonômica em SHR, avaliamos o efeito do treinamento aeróbio sobre a expressão protéica do HMGB1 no PVN, no fluído cérebro-espinhal e no plasma de SHR e de WKY. A imunofluorescência indicou que o HMGB1 é expresso no PVN, com os SHR apresentando maior intensidade de marcação do que os WKY, que, no entanto, foi diminuída pelo treinamento aeróbio (Figura 30A). A quantificação da expressão protéica no PVN (western blotting) mostrou maior expressão do HMGB1 nos SHR-S (1.2 ± 0.28 vs 0.7 ± 0.05 UA nos

WKY-S, $p<0.01$, Figura 30B) que foi significativamente reduzida e normalizada no PVN dos SHR-T (0.6 ± 0.05 vs 1.2 ± 0.28 UA nos SHR-S, $p<0.01$), valor este que não diferiu do apresentado pelos WKY-S (0.7 ± 0.05 UA, $p>0.05$). O treinamento aeróbio não promoveu alteração significativa na expressão protéica de HMGB1 no PVN dos WKY (Figura 30B).

Figura 30 – Fotos de microscopia de fluorescência ilustrando a marcação para HMGB1 no PVN em SHR e ratos WKY submetidos ao treinamento aeróbio ou mantidos sedentários (Painel A). $n=2$. Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na expressão protéica do HMGB1 no PVN (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais ($n=5$). * $p<0.01$; # $p<0.05$.

A

B

Além da análise da expressão protéica do HMGB1 no PVN, medimos ainda concentração de HMGB1 no líquido cérebro-espinhal e no plasma dos diferentes grupos experimentais (Figura 31). SHR-S apresentaram elevada concentração de HMGB1 no líquido cérebro-espinhal (2.6 ± 0.31 vs 1.3 ± 0.11 ng/ml, $p<0.01$, Figura 31A) e no plasma (2.7 ± 0.74 vs

0.9±0.17 ng/ml, $p<0.01$, Figura 31B) quando comparado aos WKY-S. O treinamento por 2 semanas foi eficaz em reduzir a concentração de HMGB1 no líquido cérebro-espinhal e no plasma dos SHR-T quando comparado ao SHR-S (1.3 ± 0.08 vs 2.6 ± 0.31 ng/ml, $p<0.01$ e 0.7 ± 0.07 vs 2.7 ± 0.74 ng/ml, $p<0.01$, respectivamente Figuras 31). O treinamento aeróbio não modificou a concentração de HMGB1 no fluido encéfalo-raquidiano e no plasma dos WKY (Figura 31).

Figura 31– Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na concentração de HMGB1 no líquido cérebro-espinhal (painel A) e no plasma (painel B) em SHR e WKY (n=7). * $p<0.01$.

4.2.7 Efeito do treinamento aeróbio na sinalização celular ativada pelo HMGB1 no PVN

A partir da observação de que o HMGB1 estimula a MAPK p42/p44 e o NF- κ B no PVN através do receptor CXCR4 e de que o treinamento aeróbio reduz a expressão de HMGB1 no PVN, investigamos o efeito do treinamento na via de sinalização ativada pelo HMGB1 (SDF1-CXCR4 - p42/p44 - NF- κ B). Identificamos que o PVN de SHR-S, quando comparado ao WKY-S, apresentou maior expressão protéica do SDF1 (1.6 ± 0.12 vs 0.6 ± 0.06 UA, $p<0.01$, Figura 33A) e de CXCR4 (1.6 ± 0.14 vs 0.8 ± 0.03 UA, $p<0.01$; Figura 32B). À semelhança do observado no Estudo I, SHR-S apresentaram maior ativação do NF- κ B no PVN do que a exibida pelos WKY-S, conforme demonstrado pela fosforilação do I κ B- α (Figura 32D), embora não tenhamos evidenciado diferenças significativas entre estes grupos na fosforilação da p-p42/p44 (1.3 ± 0.11 vs 1.1 ± 0.11 UA, $p>0.05$). Por outro lado, o treinamento aeróbio normalizou a expressão do SDF1 e do CXCR4 (0.5 ± 0.07 vs 1.6 ± 0.12 UA e 0.8 ± 0.02 vs 1.6 ± 0.14 UA para SHR-T vs SHR-S, respectivamente, $p<0.01$, Figuras 32 A e B), assim como a fosforilação da MAPK p42/p44 e da I κ B- α (0.5 ± 0.05 vs 1.3 ± 0.11 UA e 0.63 ± 0.02 vs 1.5 ± 0.17 UA para SHR-T vs SHR-S, respectivamente, $p<0.01$, Figuras 32 C e D).

Figura 32 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na expressão protéica do SDF1 (Painel A) e do CXCR4 (Painel B), bem como da fosforilação da MAPK p42/p44 (painel C) e do I κ B- α (Painel D), em SHR e WKY (n=5). * p<0.01.

A

B

4.2.8 Efeito do treinamento aeróbio na ativação de microglia e inflamação no PVN

Após confirmarmos disfunção autonômica, inflamação e ativação de microglia pelo elevado conteúdo de HMGB1 no PVN de SHR, as quais eram revertidas pelo treinamento aeróbio, analisamos a ativação de microglia e a expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF- α no PVN dos SHR e WKY submetidos a 2 (duas) semanas de treinamento ou mantidos sedentários.

A imunofluorescência mostrou que SHR-S apresentam intensa ativação da microglia, conforme identificada pela imunorreatividade para a Ib1a. Interessante observar-se que o treinamento aeróbio reduziu qualitativamente (Figura 33A) e quantitativamente a ativação de

microglia no PVN dos SHR-T (Figura 33B). A quantificação da expressão protéica do Ib1a, marcador de microglia ativada, mostrou valores elevados nos SHR-S (1.8 ± 0.24 vs 0.7 ± 0.06 UA nos WKY-S, $p < 0.01$). Por outro lado os SHR-T apresentaram expressão protéica de Ib1a similar à dos WKY-S (0.6 ± 0.03 vs 0.7 ± 0.06 UA, $p < 0.01$) e significativamente menor do que SHR-S (1.8 ± 0.24 UA, $p < 0.01$, Figura 33B). O treinamento aeróbio foi, portanto, eficaz em normalizar a expressão de Ib1a nos SHR, sem a alterar nos WKY.

Figura 33 – Fotos de microscopia de fluorescência ilustrando a marcação para Ib1a no PVN em SHR e ratos WKY submetidos ao treinamento aeróbio ou mantidos sedentários (Painel A). $n=2$. Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na expressão protéica do Ib1a no PVN (painel B) em SHR e WKY durante os protocolos experimentais ($n=5$). * $p < 0.01$; # $p < 0.05$.

A

B

Finalmente avaliamos os efeitos do treinamento aeróbio e sedentarismo sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF- α no PVN dos diferentes grupos experimentais. Assim como demonstrado para a expressão gênica no Estudo I, SHR-S quando comparados aos WKY-S exibiram elevada expressão protéica de IL6 (1.6 ± 0.31 vs 0.3 ± 0.05 UA, $p < 0.01$, Figura 34A) e de TNF- α (1.1 ± 0.07 vs 0.6 ± 0.03 UA, $p < 0.01$, figura 34B). De acordo com os dados da ativação da microglia, SHR-T vs SHR-S, apresentaram menor expressão protéica de IL6 (0.5 ± 0.08 vs 1.6 ± 0.31 UA, $p < 0.01$, Figura 34A) e de TNF- α (0.5 ± 0.04 vs 1.1 ± 0.07 UA, $p < 0.01$, Figura 34B), valores estes que não diferiam daqueles apresentados pelos WKY-S (0.5 ± 0.04 e 0.6 ± 0.03 UA, $p > 0.05$). Assim como para as demais parâmetros avaliados, o treinamento aeróbio não alterou a expressão de TNF- α e IL6 no PVN dos ratos normotensos.

Figura 34 – Alterações promovidas pelo treinamento aeróbio (T) ou sedentarismo (S) na expressão protéica da IL6 (Painel A) e do TNF- α (Painel B) em SHR e WKY (n=5). * $p < 0.01$.

A

5 DISCUSSÃO

A presente tese evidenciou os seguintes achados originais:

- 1) a normalização da função barorreflexa cardíaca e vascular coincide com a redução da FC de repouso e com o aumento do componente de alta frequência da variabilidade da FC, precedendo a redução da resistência vascular periférica e da pressão arterial em SHR treinados;
- 2) o treinamento aeróbio prontamente normalizou a sensibilidade do controle barorreflexo vascular e a variabilidade do fluxo sanguíneo vascular em SHR;
- 3) as primeiras adaptações autonômicas induzidas pelo treinamento aeróbio (normalização da função barorreflexa cardíaca e vascular, aumento da atividade vagal cardíaca e redução da FC de repouso e da variabilidade do fluxo sanguíneo) coincidem com a normalização do conteúdo de espécies reativas de oxigênio, da expressão gênica do TNF- α , IL6 e da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase e da atividade do NF- κ B no PVN;
- 4) o treinamento aeróbio reduz a fosforilação da MAPK p42/p44, no PVN, e este efeito coincidiu com a normalização do conteúdo de espécies reativas de oxigênio, da atividade do NF- κ B e da expressão gênica do TNF- α e IL6;
- 5) o treinamento aeróbio previne o aumento do estresse oxidativo e da atividade do NF- κ B no VBS e no DBS;
- 6) a infusão intracerebroventricular de HMGB1 promove elevação da PA, da FC, da variabilidade da PA e da atividade simpática periférica, além de reduzir a variabilidade da FC e a atividade vagal cardíaca, através da ativação do receptor CXCR4;
- 7) a disfunção autonômica provocada pela infusão intracerebroventricular de HMGB1 está associada com a ativação da via de sinalização do receptor CxCr4, a ativação de microglia e a expressão de citocinas pró-inflamatórias no PVN;
- 8) ratos espontaneamente hipertensos apresentam uma maior concentração de HMGB1 no plasma e no fluido cérebro-espinhal, bem como maior expressão protéica no PVN, quando comparados aos animais normotensos. O treinamento aeróbio, nos SHR, normalizou o conteúdo de HMGB1.
- 9) treinamento aeróbio reduz a ativação da microglia, no PVN, em SHR, pelo menos em parte, através da redução da estimulação da via de sinalização do CXCR4;

No início do protocolo experimental, identificamos que SHR, com 3 meses de idade, apresentavam disfunção autonômica, já que observamos menor função barorreflexa cardíaca e vascular, atividade vagal cardíaca e variabilidade da FC, bem como maior FC de repouso, atividade simpática vascular e variabilidade da PA sistólica e do fluxo sanguíneo periférico. A redução da sensibilidade do controle barorreflexo cardíaco e vascular foi gerada pela menor bradicardia e vasodilatação reflexa, respectivamente, frente à elevação da PA média induzida pelas doses de fenilefrina, pois, no início dos protocolos experimentais, os animais hipertensos apresentavam maior platô inferior da FC e da resistência vascular relativa quando comparados aos animais normotensos. Como, além da menor capacidade de reduzir a FC e a resistência vascular relativa, os SHR também apresentavam menor variabilidade da FC e de seu componente de alta frequência (marcador de atividade parassimpática), podemos sugerir que a disfunção barorreflexa, observada nos SHR, está relacionada com a menor atividade parassimpática.

Também no início dos protocolos experimentais, constatamos que SHRs exibiram maior produção de espécies reativas de oxigênio, atividade do fator de transcrição NF- κ B e expressão gênica da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL6 no PVN. Esses achados estão de acordo com vários estudos em modelo experimental de hipertensão essencial (AGARWAL et al., 2011; YUAN et al., 2013;), de hipertensão arterial dependente de ANG II (CARDINALE et al., 2012; COLEMAN et al., 2013; KANG et al., 2009; SRIRAMULA et al., 2013; SRIRAMULA et al., 2011; WANG et al., 2013; XIA et al., 2011), de hipertensão renovascular (BURMEISTER et al., 2011; YE et al., 2005) e hipertensão induzida por alto consumo de sal (XUE et al., 2012). De maneira interessante, no DBS e no VBS, não identificamos diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio e na atividade do NF- κ B entre ratos hipertensos e normotensos. Como, no início do protocolo experimental, SHR já apresentavam anormalidades autonômicas e cardiovasculares, podemos concluir que estas alterações moleculares, no PVN e não nos núcleos bulbares, colaboram para o estabelecimento da disfunção autonômica e cardiovascular. Como evidenciado pelos grupos do Dr. Constantine Iadecola e da Dra. Robin Davisson, o aumento da liberação de superóxido pela NADPH oxidase promove aumento da atividade neuronal, no PVN e no SFO, através da menor nitrosilação da subunidade NR1 do receptor NMDA, devido à redução da biodisponibilidade de NO, implicando num influxo de cálcio (WANG et al., 2013; WANG et al., 2012; WANG et al., 2006). Além deste efeito direto das espécies reativas de oxigênio na atividade neuronal, estas moléculas ativam, através

da inibição das fosfatases, a MAPK p42/44 que fosforila a proteína inibitória do NF- κ B, I κ B- α , que libera o NF- κ B, permitindo sua translocação para o núcleo. Uma vez fosforilada, a I κ B- α é ubiquitinada e degradada pelo proteossoma. No núcleo, o NF- κ B favorece a transcrição gênica das citocinas pro-inflamatórias, TNF- α e IL6, as quais vão interagir com seus receptores específicos estimulando novamente a NADPH oxidase e, contribuindo para a perpetuação do estresse oxidativo, da inflamação tecidual e, consequentemente, da hiperatividade neuronal no PVN (CHAN et al., 2007; CHI et al., 2014; COLEMAN et al., 2013; GLASS et al., 2007; GLASS et al., 2006; WANG et al., 2013; WANG et al., 2006; XIA et al., 2014).

Apesar destes resultados sobre a estimulação neuronal mediada pelo estresse oxidativo e por vias de sinalização redox-sensíveis, algumas questões ainda não foram respondidas. Na medida em que observamos alterações no perfil pró-inflamatório e pró-oxidante no PVN que parecem determinar o estabelecimento da disfunção barorreflexa cardíaca e vascular, a qual está associada à redução da atividade vagal, uma questão importante precisa ser caracterizada: como o aumento da atividade neuronal no PVN pode modificar a atividade neuronal dos núcleos parassimpáticos bulbares e/ou modificar a comunicação entre o NTS, RVLM e os núcleos vagais (núcleo ambíguo e núcleo dorsal motor do vago)? Uma hipótese para responder esta questão seria a alteração na atividade dos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos que se projetam do PVN para o NTS. Nesse sentido, uma série de estudos do grupo da Dra. Lisete Micheliní demonstrou que SHR apresentam uma maior e menor atividade destas projeções vasopressinérgicas (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI; BONAGAMBA, 1988) e ocitocinérgicas (BRAGA et al., 2000; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013; HIGA et al., 2002; MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007; MICHELINI; STERN, 2009;), respectivamente, determinando a disfunção barorreflexa e a maior FC de repouso identificada nos SHR. Contudo, os achados de Coleman et al. (2013) revelaram que, em modelo experimental dependente de ANG II, o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH ocorre somente nos neurônios não-vasopressinérgicos, excluindo a possibilidade de que o estresse oxidativo promova um aumento da expressão gênica e, consequentemente, uma descarga vasopressinérgica para o NTS (COLEMAN et al., 2013). Apesar disso, é plausível que o estresse oxidativo e a inflamação, no PVN, colaborem para a redução da expressão gênica da ocitocina e, consequentemente, diminuição da descarga ocitocinérgica para o NTS, o que poderia contribuir para a disfunção barorreflexa e redução da atividade parassimpática. Futuros

estudos são necessários para elucidar a relação entre estresse oxidativo, inflamação e projeções ocitocinéricas do PVN para os núcleos bulbares.

Além das projeções para o NTS, o PVN também possui projeções glutamatérgicas para a RVLM (LEE et al., 2013), as quais podem modular a BrS. Nesse sentido, Nosaka et al. (2000) demonstraram que a administração aguda do aminoácido excitatório ou a administração de antagonista gabaérgico reduz a resposta bradicárdica induzida pela fenilefrina. De maneira muito interessante, Xu et al. (2012) demonstraram que os neurônios glutamatérgicos que se projetam do PVN para a RVLM estão hiperativados em modelo experimental de insuficiência cardíaca, condição fisiopatológica que, assim como a hipertensão arterial, também se caracteriza pela disfunção barorreflexa. Além disso, estes autores ainda identificaram que a capacidade de aumentar e reduzir a frequência de despolarização desses neurônios glutamatérgicos, bem como a capacidade de aumentar ou reduzir a FC, frente às infusões de nitroprussiato de sódio e de fenilefrina, estava reduzida nos animais com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, em modelo experimental de hipertensão ANG II-dependente, Chen et al. (2010) identificaram que os animais hipertensos apresentavam maior excitabilidade dos neurônios que se projetam do PVN para RVLM, devido à redução da atividade dos canais de potássio ativados por cálcio. A partir desses resultados, podemos sugerir que o aumento do estresse oxidativo e da inflamação, no PVN, gera hiperatividade dos neurônios glutamatérgicos que se projetam do PVN para a RVLM, contribuindo para a disfunção barorreflexa associada a redução da atividade parassimpática.

No decorrer das 8 (oito) semanas de protocolo experimental, não observamos alteração significativa na PA, FC, variabilidade da FC e nos seus componentes de frequência, controle barorreflexo cardíaco e vascular, na concentração dos indicadores de espécies reativas de oxigênio, na expressão de citocinas pró-inflamatórias e na atividade do NF- κ B nos SHR sedentários. Contudo, identificamos, ao longo das 8 (oito) semanas de protocolo, elevação da variabilidade da PA sistólica e de seu componente de alta frequência, além do aumento do conteúdo de espécies reativas de oxigênio e da atividade do NF- κ B nos núcleos bulbares dos SHR sedentários. Esse comportamento similar entre as variáveis sugere uma relação entre estas. Poucos estudos analisaram a relação entre estresse oxidativo em áreas autonômicas e o comportamento da variabilidade da PA sistólica e de seu componente de baixa frequência. Dentre esses estudos, Chan et al. (2010) identificaram, em SHR, que a administração aguda de rosiglitazona, na RVLM, reduz a elevada atividade simpática vascular através da normalização do estresse oxidativo pela ativação da via do PPAR- γ nesta área. Adicionalmente, em modelo de hipertensão renovascular, Oliveira-Sales et al. (2010)

identificaram que a inibição do estresse oxidativo na RVLM, através da infusão de adenovírus que superexpressa a isoforma cobre-zinco da enzima superóxido dismutase, previne a elevação do componente de baixa frequência da variabilidade da PA sistólica. Dessa forma, identificamos que o aumento do estresse oxidativo em regiões bulbares de controle cardiovascular, sobretudo a RVLM, está relacionado com o aumento da atividade simpática vascular.

Além da disfunção autonômica, identificamos, no início do protocolo experimental, que SHR demonstravam maior atividade simpática vascular, resistência vascular periférica e PA. Alguns estudos identificaram achados similares aos produzidos no presente estudo (AMARAL et al., 2000; CERONI et al., 2009). O aumento da atividade simpática possibilita o remodelamento vascular diretamente, através do efeito trófico da sinalização noradrenérgica nas células musculares lisas vasculares, e indiretamente pela ativação do SRA plasmático e a posterior disfunção endotelial e remodelamento vascular induzido pela ANG II e também pela renina (DU et al., 2014).

O treinamento aeróbio é considerado uma das principais terapias não-farmacológicas no tratamento da hipertensão arterial. No presente estudo, identificamos importantes achados sobre a cronologia das adaptações cardiovasculares e autonômicas desencadeadas por esta ferramenta terapêutica. Na segunda semana de protocolo, identificamos os seguintes achados fisiológicos e moleculares: redução da FC de repouso; normalização da atividade vagal cardíaca e da BrS cardíaca e vascular; normalização da produção de espécies reativas de oxigênio, da atividade do NF- κ B e da expressão de citocinas pro-inflamatórias no PVN. Outros dois estudos observaram menor expressão de citocinas pro-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio em ratos hipertensos treinados quando comparado aos hipertensos sedentários, após 8 (oito) semanas de protocolo (AGARWAL et al., 2011; JIA et al., 2014). A coincidência temporal entre essas adaptações ao treinamento, constatada no presente estudo, e os demais estudos que identificaram a relevância fisiopatológica das espécies reativas de oxigênio (BURMEISTER et al., 2011; HAN et al., 2011; HAN et al., 2005; KANG et al., 2009; NISHIHARA et al., 2012; XU et al., 2011; YE et al., 2005 YU et al., 2007; YUAN et al., 2013;) e das citocinas pro-inflamatórias no PVN (CARDINALE et al., 2012; KANG et al., 2009; SRIRAMULA et al., 2013) sugerem uma relação de causa-efeito entre essas adaptações. Assim, o treinamento aeróbio reduz, no PVN, a via de sinalização: superóxido liberado pela Nox2 $\rightarrow$ ativação da MAPK p42/p44 $\rightarrow$ ativação do NF- κ B $\rightarrow$ expressão de citocinas pro-inflamatórias, o que, consequentemente, reduz a hiperexcitabilidade dos neurônios glutamatérgicos que se projetam do PVN para a RVLM, determinando a

normalização da função barorreflexa associada ao aumento da resposta vagal e ao aumento da atividade parassimpática cardíaca em repouso. Essa afirmação é corroborada pelo estudos desenvolvido por Stern et al. (2012) que observaram que o treinamento aeróbio reduz a excitabilidade dos neurônios do PVN em SHR.

Do ponto de vista evolutivo, os benefícios do treinamento físico são gerados a partir do modelo de agressão/adaptação, onde eventos moleculares desencadeados durante a realização da sessão de treinamento produzem repostas subagudas, as quais, cronicamente, determinam as adaptações em repouso. A redução do estresse oxidativo está entre as principais adaptações ao treinamento aeróbio mais descritas na literatura. Este benefício do treinamento aeróbio foi identificado no tecido vascular (ROQUE et al., 2013), no tecido cardíaco (AGARWAL et al., 2009) e no rim de SHR (AGARWAL et al., 2012). De uma maneira geral., a redução do estresse oxidativo nos indivíduos treinados ocorre a partir do aumento da capacidade antioxidante e/ou da redução das fontes de espécies reativas de oxigênio. O modelo molecular para o aumento da capacidade antioxidante produzido pelo treinamento físico consiste no aumento, de maneira subaguda à sessão de exercício, da atividade do fator de transcrição NRF2 (*Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2*). A ativação deste fator de transcrição ocorre através da reação do superóxido, gerado durante o exercício, com as cisteínas da proteína inibitória do NRF2, Keap-1, permitindo a translocação deste fator de transcrição do citosol para núcleo. Uma vez no núcleo, o NRF2 se liga com o elemento de reposa antioxidante, possibilitando a transcrição de várias enzimas antioxidantes, como a isoforma 2 da enzima superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase-1, γ -glutamyl cisteína ligase-modulatória, glutathione reductase e glicose-6 fosfato dehidrogenase (GOUNDER et al., 2012; MUTHUSAMY et al., 2011). Apesar dos achados de Kishi et al. (2012), os quais demonstraram que o treinamento aeróbio diminui a redução da PA induzida pela administração aguda de tempol na RVLM, indicando o efeito antioxidante do treinamento nesta região autonômica. As informações sobre o efeito agudo do exercício aeróbio na geração de espécies reativas de oxigênio são escassas e futuros estudos são necessários para caracterizar esse possível mecanismo antioxidante nas áreas autonômicas de regulação cardiovascular.

Em adicao a ativação do fator de transcrição NRF2, o fator neurotrófico derivado encefálico (BDNF) também pode contribuir para a redução do estresse oxidativo nos indivíduos treinados, uma vez que o superóxido induz a expressão de BDNF e este peptídeo é capaz de inibir a produção de superóxido pela NADPH oxidase pela ANG II (CHAN et al., 2010). Em estudo previo do grupo da Dra. Lisete Michelini, foi evidenciado que, em duas

semanas, o treinamento aeróbio aumentou a densidade do BDNF no PVN em SHR (ZAMPIERI, 2011). Cabe realçar que identificamos redução da concentração dos indicadores de espécies reativas de oxigênio no PVN também após 2 semana de treinamento aeróbio. Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da expressão de BDNF pode contribuir para a redução da produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, da atividade neuronal, no PVN, e da disfunção barorreflexa cardíaca.

Além do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e do BDNF, o treinamento aeróbio combate o estresse oxidativo através de dois mecanismos complementares: redução da expressão gênica e desativação dos sistemas geradores de espécies reativas de oxigenio. Nas áreas autonômicas de regulação cardiovascular, a NADPH oxidase e o escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial são considerados as principais fontes de espécies reativas. No presente estudo, identificamos que o treinamento aeróbio normaliza a produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão gênica da subunidade regulatória p47^{phox} da NADPH oxidase, no PVN, a partir da segunda semana de treinamento. Já nos núcleos bulbares, o treinamento aeróbio preveniu o aumento do conteúdo de espécies reativas de oxigênio observada nos SHR sedentários. Como descritos anteriormente, a interação da ANG II com o receptor AT₁, nas áreas autonômicas regulatórias, promove a liberação de superóxido pela NADPH oxidase. Dessa forma, a inibição dos mecanismos que possibilitam a ativação do receptor AT₁ (produção encefálica de ANG II, alterações na barreira hematoencefálica e da ativação do SFO) podem favorecer a redução do estresse oxidativo nos animais treinados. Nesse sentido, alguns estudos identificaram a redução do SRA encefálica no PVN e na RVLM em modelos experimentais de hipertensão arterial (AGARWAL et al., 2011; JIA et al., 2014;) Assim, a redução da interação da ANG II com o receptor AT₁ pode contribuir para a diminuição do estresse oxidativo observada nas regiões autonômicas dos SHR treinados.

Como o estresse oxidativo, a ativação do NF-κB e a inflamação tecidual configuram um mecanismo de retro-alimentação positiva, a redução em um destes fatores influencia no conteúdo dos demais, o que foi corroborado no presente estudo, uma vez que identificamos redução do estresse oxidativo, da ativação do NF-κB e da expressão gênica do TNF-α e IL6 na segunda semana de treinamento aeróbio nos SHR. A atividade do NF-κB parece ser crucial para os benefícios autonômicos do treinamento aeróbio, pois este fator de transcrição regula a expressão gênica das principais citocinas pro-inflamatórias e das subunidades da NADPH oxidase, além do peptídeo precursor do SRA, angiotensinogenio. Embora a redução da atividade transcriptase do NF-κB induzida pelo treinamento aeróbio tenha sido largamente

descrita na literatura, sobretudo no tecido cardíaco (SERRA et al., 2010) e hepático (RADÁK et. 2004), além do musculo esquelético (KANG et al., 2009), a relação do exercício físico com a ativação do NF- κ B pode ser dividida em duas fases: fase aguda e fase crônica (KRAMER, GOODYEAR; 2007). A fase aguda consiste no aumento da atividade deste fator transcrição induzida pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e da concentração de cálcio citosólico, o que estimula a transcrição da NOS e expressão da superóxido dismutase (EISELE et al., 2013; FENG et al., 2013; JI et al., 2004; KANG et al., 2009; KIM et al., 2009). O aumento da expressão da superóxido dismutase colabora para a supressão crônica da atividade do NF- κ B e, conseqüentemente, da expressão de citocinas e do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase (EISELE et al., 2013). A fase crônica dos efeitos do exercício sobre o NF- κ B é predominantemente inibitória, devido à redução da concentração dos agonistas deste fator de transcrição, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, e a ativação da via AMPK PGC1- α . Além do efeito direto das espécies reativas sobre a ativação das MAPKs, a redução do estresse oxidativo também colabora para redução da atividade do NF- κ B através do aumento da biodisponibilidade de NO, já que o NO é capaz de nitrosilar a cisteína-62 da subunidade RelA ou p65 do NF- κ B e esta modificação pós-traducional inibe sua atividade transcriptase (KELLEHER et al., 2007). No sistema nervoso central, futuros estudos são necessários para caracterizar os mecanismos de inibição do NF- κ B induzido pelo treinamento aeróbio na hipertensão arterial.

Além da inibição da NADPH oxidase e da atividade do NF- κ B, não podemos descartar a redução do escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial como um mecanismo adicional para a redução do estresse oxidativo gerado no presente estudo. Comprovando a relevância fisiopatológica da geração de superóxido pelo escape de elétrons da cadeia respiratória, estudos desenvolvidos pelo grupo da Dra. Julie Chan no Centro de Pesquisa Translacional em Ciências Biomédicas (China) demonstraram que a inibição do escape de elétrons da cadeia respiratória, através do aumento da expressão da proteína desacopladora-2 na RVLM (CHAN et al., 2009; CHAN et al., 2010; KUNG et al., 2008), reduz a PA em SHR. Dessa forma, além da inibição da atividade da NADPH oxidase, o escape de elétrons da cadeia respiratória, nas regiões autonômicas de controle cardiovascular, também pode ser modificado pelo treinamento aeróbio, contribuindo para os benefícios autonômicos e cardiovasculares.

Diretamente associado com a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo, duas semanas de treinamento aeróbio, somente nos SHR, também normalizaram a ativação da microglia no PVN, conforme nossos dados de

imunofluorescência e western blotting. Outros estudos experimentais identificaram que o treinamento aeróbico previne a ativação de microglia no núcleo arqueado induzida pela dieta hiperlipídica (YI et al., 2012), em modelo experimental de doença de Parkinson (SUNG et al., 2012) e em ratos idosos (KOHMAN et al., 2013). A fim de explicar o mecanismo que possibilita este benefício do treinamento aeróbico nos SHR, avaliamos a expressão do receptor Cxcr4, de seu agonista SDF-1 e sua via de sinalização, uma vez que estão relacionados com a ativação da microglia (LIPFERT et al., 2013; LU et al., 2009; UNOKI et al., 2010). O treinamento aeróbico, nos SHR, reduziu a expressão protéica da SDF-1 e da CXCR4 no PVN dos SHR. Em acordo com estes achados, evidenciamos suprimida fosforilação da MAPK p42/p44 e da fosforilação da I κ B- α e, conseqüentemente, a expressão gênica do TNF- α e IL6 foi reduzida nos SHR treinados. Atuando em sinergismo com o SDF-1, a HMGB1, na sua forma completamente reduzida, forma um complexo proteico com o SDF-1 e interage com o receptor CXCR4. Corroborando seu papel fisiopatológico em processos inflamatórios no sistema nervoso central, diversos estudos observaram que a inibição do HMGB1 atenua a inflamação em modelos experimentais de isquemia cerebral (GONG et al., 2014; KIM et al., 2012; LIU et al., 2007). No presente estudo, o treinamento aeróbico, por duas semanas, foi capaz de normalizar a elevada concentração de HMGB1 no PVN, no líquido encéfalo-raquidiano e no plasma dos SHR. Apenas um trabalho na literatura identificou redução da concentração plasmática de HMGB1 em pacientes com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio, sendo que este benefício do treinamento se correlacionou com as adaptações autonômicas e cardiorrespiratórias induzidas pelo treinamento (GIALLAURIA et al., 2011).

A fim de elucidar a relevância fisiopatológica da ativação do receptor CXCR4 pelo HMGB1 na ativação de microglia, na produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, na disfunção autonômica, administramos este peptídeo, em associação com o antagonista do CXCR4, no 3º ventrículo de ratos conscientes e saudáveis e verificamos a função autonômica e cardiovascular. O tratamento agudo com HMGB1, de maneira dose-dependente, promoveu disfunção autonômica associada com elevação da PA e da FC, os quais foram abolidos, também de maneira dose-dependente, com o antagonismo do receptor CXCR4. Além dos efeitos cardiovascular e autonômicos, a HMGB1, também através do receptor CXCR4, promoveu ativação de microglia associada com a estimulação da via de sinalização da MAPK p42/p44, a qual produziu, conseqüentemente aumento da ativação do NF- κ B e expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL6, no PVN. Embora nenhum estudo tenha caracterizado os efeitos cardiovasculares da administração HMGB1, Wei et al. (2012) demonstraram que a administração intracerebroventricular de SDF-1, ligante do

receptor CXCR4, promove elevação aguda da PA média, FC e da atividade simpática renal em ratos saudáveis e infartados. A disfunção autonômica desencadeada pela ativação do CXCR4 parece estar relacionada com a ativação dos neurônios vasopressinérgicos no PVN, já que Callewaere et al. (2006) observaram que a administração de SDF-1 ativa os neurônios vasopressinérgicos no PVN. Desta forma, podemos sugerir que a HMGB1 estimula as projeções vasopressinérgicas do PVN para o NTS, promovendo disfunção autonômica, como observado no presente estudo.

Além da possível ativação das projeções vasopressinergicas supra-bulbares, a produção de citocinas no PVN parece ser outro mecanismo para justificar a disfunção autonômica induzida pelo HMGB1, uma vez que, assim como no presente estudo, diversos trabalhos identificaram que a ativação do receptor CXCR4 produz ativação da microglia. Do ponto de vista molecular, a ativação de microglia está relacionada com a fosforilação da MAPK p42/p44 e, consequentemente, ativação do NF- κ B e expressão de citocinas pro-inflamatórias nestas células. Esses dados estão de acordo com observações *in vitro* (LU et al., 2009) e *in vivo* (O'CONNOR et al., 2003). Como comentado anteriormente, o aumento da liberação de citocinas pro-inflamatórias, no PVN, produz disfunção autonômica. Portanto, a partir dos presentes resultados, podemos afirmar que a redução do conteúdo do HMGB1, no PVN, induzida pelo treinamento aeróbio contribui para a diminuição da ativação de microglia, a ativação da sinalização do receptor CXCR4 e, consequentemente, expressão de citocinas pro-inflamatórias. Essas adaptações celulares contribuem para a reversão da disfunção autonômica em SHR.

Apesar do treinamento aeróbio promover prontamente benefícios autonômicos, a redução da resistência vascular e da PA foi identificada apenas após 8 semanas de treinamento. Vale ressaltar que, na oitava semana, a resistência vascular periférica, a qual foi analisada na artéria ilíaca esquerda, foi normalizada, enquanto a PA, apesar de menor do que os hipertensos sedentários, ainda encontrasse elevada quando comparada aos ratos normotensos. Este resultado indica que o efeito do treinamento aeróbio parece ser leito específico, uma vez que a normalização da resistência vascular ocorreu numa região ativada durante a sessão de exercício, mas a PA ainda encontrávasse aumentada, sugerindo que outros leitões possivelmente ainda apresentavam elevada resistência vascular.

Além da possível heterogeneidade das adaptações vasculares induzidas pelo treinamento aeróbio, nossos resultados também indicam que fatores adicionais ao sistema nervoso central também são determinantes para a redução da PA induzida pelo treinamento. Entre esses fatores, podemos sugerir a alteração da razão parede/luz nas arteríolas e o

aumento da razão capilar/fibra. Esses benefícios foram identificados em SHR treinados por 8 semanas, sugerindo que o treinamento promova essas alterações de maneira mais tardia. Por outro lado, a ativação crônica do barorreflexo, através do implante de marcapasso no nervo, vem sendo sugerida como uma eficiente alternativa terapêutica para hipertensão resistente. Recentemente, alguns estudos identificaram que a ativação crônica das fibras aferentes do barorreflexo promove redução da PA e benefícios autonômicos similares aos identificados no presente trabalho (ALNIÓA et al., 2012; BISOGNANO et al., 2001; HEUSSER et al., 2010; WUSTMANN et al., 2009). Adicionalmente, alguns estudos (CERONI et al., 2009; MORAES-SILVA et al., 2010;) identificaram que a desnervação sinoaórtica atenua os benefícios autonômicos e cardiovasculares do treinamento aeróbio em SHR. Coletivamente, esses dados sugerem que, embora não seja um fator exclusivo, a reversão da disfunção barorreflexa contribui para a redução da PA em hipertensos treinados.

Na figura 35, apresentamos a sequência temporal das principais adaptações moleculares e fisiológicas promovidas pelo treinamento aeróbio nos SHR. Como discutido anteriormente, a redução do conteúdo de HMGB1 determina a normalização da ativação de microglia mediada pelo receptor CXCR4, o que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e das espécies reativas de oxigênio no PVN, revertendo a disfunção autonômica e contribuindo para a redução da PA.

Figura 35 – Sequência das adaptações fisiológicas e celulares ao treinamento aeróbio em SHR. BrS, BrS; FC, frequência cardíaca; Var, variabilidade; SNP, sistema nervoso parassimpático; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; HMGB1, high mobility group Box-1; SDF-1, stromal derived-factor 1; MAPK, quinase ativada por mitógeno;

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o estresse oxidativo e a inflamação, no PVN, possibilitam o desenvolvimento da disfunção autonômica, caracterizada pelo deprimido controle barorreflexo cardíaco e vascular associados à hiperatividade simpática periférica e à reduzida atividade vagal cardíaca nos SHR. Estas anormalidades autonômicas propiciam o aumento da variabilidade da pressão arterial e do fluxo sanguíneo que permitem o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo, além do aumento da resistência vascular periférica que determina o aumento da pressão arterial. Ainda no PVN, o HMGB1 também estimula, ao menos agudamente, a disfunção autonômica e a elevação da pressão arterial associada à ativação da microglia e à expressão de citocinas pró-inflamatórias, através da ativação do receptor CXCR4. Já, nas áreas regulatórias do tronco encefálico, o estresse oxidativo e a inflamação contribuem para o agravamento da disfunção autonômica, a qual foi identificada pelo aumento adicional da variabilidade da pressão arterial e da atividade simpática periférica.

O treinamento aeróbio corrige o controle barorreflexo cardíaco e a atividade vagal cardíaca nos SHR através da normalização do estresse oxidativo e da inflamação no PVN, uma vez que, além dos estudos que evidenciaram o papel causativo das espécies reativas de oxigênio e das citocinas pró-inflamatórias na disfunção autonômica, foi identificado, no presente estudo, que estes benefícios moleculares coincidem com as adaptações autonômicas ao treinamento aeróbio. A redução da concentração de HMGB1 também colabora para a redução da inflamação e da ativação de microglia, no PVN, e, consequentemente, para os benefícios autonômicos observados nos SHR treinados por 2 semanas. O treinamento aeróbio foi igualmente capaz de prevenir a instalação do estresse oxidativo e da inflamação nos núcleos bulbares, o que parece colaborar para a redução da variabilidade da pressão arterial e para a hiperatividade simpática periférica. Os benefícios autonômicos induzidos pelo treinamento aeróbio precedem as adaptações cardiovasculares, como a redução da pressão arterial e da resistência vascular periférica, o que, além dos estudos que identificaram estes benefícios cardiovasculares em pacientes hipertensos resistentes submetidos à estimulação crônica da aferência do barorreflexo, indica que a melhoria do controle cardiovascular pelo sistema nervoso central colabora para a redução da pressão arterial na hipertensão arterial primária.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, A. P.; MCBRYDE, F. D.; MARINA, N.; HENDY, E. B.; ENGELMAN, Z. J.; FUDIM, M.; SOBOTKA, P. A.; GOURINE, A. V.; PATON, J. F. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **J. Physiol.**, v. 590, p. 4269-4277, 2012.
- AGARWAL, D.; HAQUE M.; SRIRAMULA, S.; MARIAPPAN, N.; PARIAUT, R.; FRANCIS, J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1393-1400, 2009.
- 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, n. 2, 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, n. 5, p. 1069-1085, 2011.
- ALBERT, V.; CAMPBELL, G. R. Relationship between the sympathetic nervous system and vascular smooth muscle: a morphometric study of adult and juvenile spontaneously hypertensive rat/Wistar-Kyoto rat caudal artery. **Heart Vessels**, v. 5, n. 3, p. 129-139, 1990.
- ALKAITIS, M. S.; CRABTREE, M. J. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. **Curr. Heart Fail. Rep.**, v. 9, n. 3, p. 200-210, 2012.
- 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, n. 11, p. 1563-1572, 2000.
- ANDRASSY, M.; VOLZ, H. C.; RIEDLE, N.; GITSIODIS, G.; SEIDEL, C.; LAOHACHEWIN, D.; ZANKL, A. R.; KAYA, Z.; BIERHAUS, A.; GIANNITSIS, E.; KATUS, H. A.; KOROSOGLOU, G. HMGB1 as a predictor of infarct transmural and functional recovery in patients with myocardial infarction. **J. Intern. Med.**, v. 270, n. 3, p. 245-253, 2011.
- AVERILL, D. B.; TSUCHIHASHI, T.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Losartan, nonpeptide angiotensin II-type 1 (AT1) receptor antagonist, attenuates pressor and sympathoexcitatory responses evoked by angiotensin II and L-glutamate in rostral ventrolateral medulla. **Brain Res.**, v. 665, n. 2, p. 245-252, 1994.
- AWAD, A. S. Role of AT1 receptors in permeability of the blood-brain barrier in diabetic hypertensive rats. **Vascul. Pharmacol.**, v. 45, n. 3, p. 141-147, 2006.
- BAILEY, E. L.; WARDLAW, J. M.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A. F.; SUDLOW, C. L.; SMITH, C. Cerebral small vessel endothelial structural changes predate hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: a blinded, controlled immunohistochemical study of 5- to 21-week-old rats. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 37, n. 7, p. 711-726, 2011.

BANERJEE, S.; DE FREITAS, A.; FRIGGERI, A.; ZMIJEWSKI, J. W.; LIU, G.; ABRAHAM, E. Intracellular HMGB1 negatively regulates efferocytosis. **J. Immunol.**, v. 187, n. 9, p. 4686-4694, 2011.

BARNES, K. L.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Functional interactions between angiotensin II and substance P in the dorsal medulla. **Hypertension**, v. 17, n. 6, p. 1121-1126, 1991.

BENICKY, J.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; HONDA, M.; PANG, T.; ORECNA, M.; WANG, J.; LENG, Y.; CHUANG, D. M.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 857-870, 2011.

BENICKY, J.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; PAVEL, J.; SAAVEDRA, J. M. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 29, n. 6-7, p. 781-792, 2009.

BERTAGNOLLI, M.; CAMPOS, C.; SCHENKEL, P. C.; DE OLIVEIRA, V. L.; DE ANGELIS, K.; BELLÓ-KLEIN, A.; RIGATTO, K.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. **J. Hypertens.**, v. 24, n. 12, p. 2437-2443, 2006.

BIANCARDI, V. C.; SON, S. J.; AHMADI, S.; FILOSA, J. A.; STERN, J. E. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 572-579, 2014.

BISOGNANO, J. D.; BAKRIS, G.; NADIM, M. K.; SANCHEZ, L.; KROON, A. A.; SCHAFER, J.; DE LEEUW, P. W.; SICA, D. A. Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled rheos pivotal trial. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 58, n. 7, p. 765-773, 2011.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, D. C.; MORI, E.; HIGA, K. T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 278, n. 6, p. R1474-1482, 2000.

BRUCHFELD, A.; GOLDSTEIN, R. S.; CHAVAN, S.; PATEL, N. B.; ROSAS-BALLINA, M.; KOHN, N.; QURESHI, A. R.; TRACEY, K. J. Whole blood cytokine attenuation by cholinergic agonists ex vivo and relationship to vagus nerve activity in rheumatoid arthritis. **J. Intern. Med.**, v. 268, n. 1, p. 94-101, 2010.

BRUM, P. C.; DA SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-1022, 2000.

BURGI, K.; CAVALLERI, M. T.; ALVES, A. S.; BRITTO, L. R.; ANTUNES, V. R.; MICHELINI, L. C. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic

activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 2, p. R264-271, 2011.

BURMEISTER, M. A.; YOUNG, C. N.; BRAGA, V. A.; BUTLER, S. D.; SHARMA, R. V.; DAVISSON R. L. In vivo bioluminescence imaging reveals redox-regulated activator protein-1 activation in paraventricular nucleus of mice with renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 289-297, 2011.

CABASSI, A.; VINCI, S.; CALZOLARI, M.; BRUSCHI, G.; BORGHETTI, A. Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.** n. 62, v. 12, p. 1111-1118, 1998.

CALLEWAERE, C.; BANISADR, G.; DESARMÉNIEN, M. G.; MECHIGHEL, P.; KITABGI, P.; ROSTÈNE, W. H.; MÉLIK-PARSADANIANTZ S. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 21, p. 8221-8226, 2006.

CAO, X.; PETERSON, J. R.; WANG, G.; ANRATHER, J.; YOUNG, C. N.; GURUJU, M. R.; BURMEISTER, M. A.; IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. Angiotensin II-dependent hypertension requires cyclooxygenase 1-derived prostaglandin E2 and EP1 receptor signaling in the subfornical organ of the brain. **Hypertension**, v. 59, n. 4, p. 869-876, 2012.

CAPONE, C.; FARACO, G.; PETERSON, J. R.; COLEMAN, C.; ANRATHER, J.; MILNER, T. A.; PICKEL, V.M.; DAVISSON, R.L.; IADECOLA, C. Central cardiovascular circuits contribute to the neurovascular dysfunction in angiotensin II hypertension. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 14, p. 4878-4886, 2012.

CARDINALE, J. P.; SRIRAMULA, S.; MARIAPPAN, N.; AGARWAL, D.; FRANCIS, J. Angiotensin II-induced hypertension is modulated by nuclear factor- κ B in the paraventricular nucleus. **Hypertension**, v. 59, n. 1, p. 113-121, 2012.

CATES, M. J.; STEED, P. W.; ABDALA, A. P.; LANGTON, P. D.; PATON, J. F. Elevated vertebrobasilar artery resistance in neonatal spontaneously hypertensive rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 111, n. 1, p. 149-156, 2011.

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, n. 4, p. R958-966, 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, n. 6, p. 630-640, 2009.

CHAE, C. U.; LEE, R. T.; RIFAI, N.; RIDKER, P. M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 399-403, 2001.

CHAMARTHI, B.; WILLIAMS, G. H.; RICCHIUTI, V.; SRIKUMAR, N.; HOPKINS, P. N.; LUTHER, J. M.; JEUNEMAITRE, X.; THOMAS, A. Inflammation and hypertension: the interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin system in humans. **Am. J. Hypertens.**, v. 24, n. 10, p. 1143-1148, 2011.

CHAN, S. H.; HSU, K. S.; HUANG, C. C.; WANG, L. L.; OU, C. C.; CHAN, J. Y. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. **Circ. Res.**, v. 97, n. 8, p. 772-780, 2005.

CHAN, S. H.; TAI, M. H.; LI, C. Y.; CHAN, J. Y. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, n. 11, p. 2028-2039, 2006.

CHAN, S. H.; WANG, L. L.; TSENG, H. L.; CHAN, J. Y. Upregulation of AT1 receptor gene on activation of protein kinase C β /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, n. 9, p. 1845-1861, 2007.

CHAN, S. H.; WU, C. A.; WU, K. L.; HO, Y. H.; CHANG, A. Y.; CHAN, J. Y. Transcriptional upregulation of mitochondrial uncoupling protein 2 protects against oxidative stress-associated neurogenic hypertension. **Circ. Res.**, v. 105, n. 9, p. 886-896, 2009.

CHAN, S. H.; WU, K. L.; CHANG, A. Y.; TAI, M. H.; CHAN, J. Y. Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 217-227, 2009.

CHAN, S. H.; WU, K. L.; KUNG, P. S.; CHAN, J. Y. Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1444-1453, 2010.

CHAN S.H.; WU C.W.; CHANG A.Y.; HSU K.S.; CHAN J.Y. Transcriptional upregulation of brain-derived neurotrophic factor in rostral ventrolateral medulla by angiotensin II: significance in superoxide homeostasis and neural regulation of arterial pressure. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1127-1139, 2010.

CHAO, Y. M.; LAI, M. D.; CHAN, J. Y. Redox-sensitive endoplasmic reticulum stress and autophagy at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 61, n. 6, p. 1270-1280, 2013.

CHEN, A. D.; ZHANG, S. J.; YUAN, N.; XU, Y.; DE, W.; GAO, X. Y.; ZHU, G. Q. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 2, p. 94-103, 2011.

CHEN, Q. H.; ANDRADE, M. A.; CALDERON, A. S.; TONEY, G. M. Hypertension induced by angiotensin II and a high salt diet involves reduced SK current and increased excitability of RVLM projecting PVN neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 104, n. 5, p. 2329-2337, 2010.

CHI, P. L.; LIU, C. J.; LEE, I. T.; CHEN, Y. W.; HSIAO, L. D.; YANG, C. M. HO-1 induction by CO-RM2 attenuates TNF- α -induced cytosolic phospholipase A2 expression via inhibition of PKC α -dependent NADPH oxidase/ROS and NF- κ B. **Mémediators Inflamm.**, In press, 2014.

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.; WRIGHT, J. T.; ROCCELLA, E. J. NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM COORDINATING COMMITTEE. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **JAMA.**, v. 289, n. 19, p. 2560-2572, 2003.

CIRILLO, P.; GIALLAURIA, F.; PACILEO, M.; PETRILLO, G.; D'AGOSTINO, M.; VIGORITO, C.; CHIARIELLO, M. Increased high mobility group box-1 protein levels are associated with impaired cardiopulmonary and echocardiographic findings after acute myocardial infarction. **J. Card. Fail.**, v. 15, n. 4, p. 362-367, 2009.

COLEMAN, C. G.; WANG, G.; FARACO, G.; MARQUES LOPES, J.; WATERS, E. M.; MILNER, T. A.; IADECOLA, C.; PICKEL, V. M. Membrane trafficking of NADPH oxidase p47(phox) in paraventricular hypothalamic neurons parallels local free radical production in angiotensin II slow-pressor hypertension. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 10, p. 4308-4316, 2013.

COLLIER, S. R.; KANALEY, J. A.; CARHART, R. JR.; FRECHETTE, V.; TOBIN, M. M.; BENNETT, N.; LUCKENBAUGH, A. N.; FERNHALL, B. Cardiac autonomic function and baroreflex changes following 4 weeks of resistance versus aerobic training in individuals with pre-hypertension. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 195, n.3, p. 339-348, 2009.

CORNELISSEN, V. A.; SMART, N. A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J. Am. Heart Assoc.**, v. 2, n.1, p. e004473, 2013.

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, n. 2, p. 386-396, 2013.

DANGE, R. B.; AGARWAL, D.; MASSON, G. S.; VILA, J.; WILSON, B.; NAIR, A.; FRANCIS, J. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovasc. Res.**, *In press*, 2014.

DE OLIVEIRA-SALES, E. B.; NISHI, E. E.; BOIM, M. A.; DOLNIKOFF, M. S.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model. **Am. J. Hypertens.**, v. 23, n. 7, p. 708-715, 2010.

DE SOUZA, S. B.; ROCHA, J. A.; CUOCO, M. A.; GUERRA, G. M.; FERREIRA-FILHO, J. C.; BORILE, S.; KRIEGER, E. M.; BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. High muscle sympathetic nerve activity is associated with left ventricular dysfunction in treated hypertensive patients. **Am. J. Hypertens.**, v. 26, n. 7, p. 912-917, 2013.

DU, C. Q.; YANG, L.; YANG, J.; HAN, J.; HU, X. S.; WU, T.; HU, S. J. Inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase prevents norepinephrine-induced fibrotic responses in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **Hypertens. Res.**, v. 37, n. 1, p. 26-34, 2014.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 4, p. R1271-1282, 1997.

DVORAKOVA, M.; HÖHLER, B.; VOLLERTHUN, R.; FISCHBACH, T.; KUMMER, W. Macrophages: a major source of cytochrome b558 in the rat carotid body. **Brain. Res.**, v. 852, n. 2, p. 349-354, 2000.

EISELE, P. S.; SALATINO, S.; SOBEK, J.; HOTTIGER, M. O.; HANDSCHIN, C. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n.4, p. 2246-2260, 2013.

ELENKOV, I.; PELOVSKY, P.; UGRINOVA, I.; TAKAHASHI, M.; PASHEVA, E. The DNA binding and bending activities of truncated tail-less HMGB1 protein are differentially affected by Lys-2 and Lys-81 residues and their acetylation. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 691-699, 2011.

ELGHANNAM, H.; TAVACKOLI, S.; FERLIC, L.; GOTTO, A. M. JR.; BALLANTYNE, C.M.; MARIAN, A. J. A prospective study of genetic markers of susceptibility to infection and inflammation, and the severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and its response to therapy. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 78, n. 10, p. 562-568, 2000.

ENDO, T. Involvement of Src tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase in the facilitation of calcium channels in rat nucleus of the tractus solitarius by angiotensin II. **J. Physiol.**, v. 568, n. 3, p. 851-865, 2005.

ESHIMA, K.; HIROOKA, Y.; SHIGEMATSU, H.; MATSUO, I.; KOIKE, G.; SAKAI, K.; TAKESHITA, A. Angiotensin in the nucleus tractus solitarii contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**, v. 36, n. 2, p. 259-263, 2000.

FAGARD, R. H. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 6, p. 853-856, 2006.

FAN, J.; ZHANG, B.; SHU, H. F.; ZHANG, X. Y.; WANG, X.; KUANG, F.; LIU, L.; PENG, Z. W.; WU, R.; ZHOU, Z.; WANG, B. R. Interleukin-6 increases intracellular Ca²⁺ concentration and induces catecholamine secretion in rat carotid body glomus cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 87, n. 12, p. 2757-2762, 2009.

FANG, P.; SCHACHNER, M.; SHEN, Y. Q. HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. **Mol. Neurobiol.**, v. 45, n. 3, p. 499-506, 2012.

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, n. 4, p. 780-785, 2007.

FERNANDES, D. C.; WOSNIAK, J.; PESCATORE, L. A.; BERTOLINE, M. A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F. R. M.; SANTOS, C. X. C. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, V. 292, p. C413-422, 2007.

FUNAYAMA, A.; SHISHIDO, T.; NETSU, S.; NARUMI, T.; KADOWAKI, S.; TAKAHASHI, H.; MIYAMOTO, T.; WATANABE, T.; WOO, C .H.; ABE, J.; KUWAHARA, K.; NAKAO, K.; TAKEISHI, Y.; KUBOTA, I. Cardiac nuclear high mobility group box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure. **Cardiovasc. Res.**, v. 99, n. 4, p. 657-664, 2013.

GAO, H. M.; ZHOU, H.; ZHANG, F.; WILSON, B. C.; KAM, W.; HONG, J. S. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 3, p. 1081-1092, 2011.

GAO, X. Y.; ZHANG, F.; HAN, Y.; WANG, H. J.; ZHANG, Y.; GUO, R.; ZHU, G. Q. AT1 receptor in rostral ventrolateral medulla mediating blunted baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 11, p. 1433-1438, 2004.

GIALLAURIA, F.; CIRILLO, P.; D'AGOSTINO, M.; PETRILLO, G.; VITELLI, A.; PACILEO, M.; ANGRI, V.; CHIARIELLO, M.; VIGORITO, C. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. **J. Card. Fail**, v. 17, n. 3, p. 108-114, 2011.

GIALLAURIA, F.; CIRILLO, P.; LUCCI, R.; PACILEO, M.; D'AGOSTINO, M.; MAIETTA, P.; VITELLI, A.; CHIARIELLO, M.; VIGORITO, C. Autonomic dysfunction is associated with high mobility group box-1 levels in patients after acute myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 280-284, 2010.

GLASS, M. J.; CHAN, J.; FRY, K. A.; OSELKIN, M.; TARSITANO, M. J.; IADECOLA, C.; PICKEL, V. M. Changes in the subcellular distribution of NADPH oxidase subunit p47phox in dendrites of rat dorsomedial nucleus tractus solitarius neurons in response to chronic administration of hypertensive agents. **Exp. Neurol.**, v. 205, n. 2, p. 383-395, 2007.

GLASS, M. J.; HUANG, J.; OSELKIN, M.; TARSITANO, M. J.; WANG, G.; IADECOLA, C.; PICKEL, V.M. Subcellular localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits in neurons and astroglia of the rat medial nucleus tractus solitarius: relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons. **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 547-564, 2006.

GONG, G.; XIANG, L.; YUAN, L.; HU, L.; WU, W.; CAI, L.; YIN, L.; DONG, H. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. **PLoS One**, v. 9, n.3, p. e89450, 2014.

GROUND, S. S.; KANNAN, S.; DEVADOSS, D.; MILLER, C. J.; WHITEHEAD, K. S.; ODELBURG, S. J.; FIRPO, M .A.; PAINE, R. 3RD.; HOIDAL, J. R.; ABEL, E. D.; RAJASEKARAN, N. S. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45697, 2012.

HAENSEL, A.; MILLS, P. J.; NELESEN, R. A.; ZIEGLER, M. G.; DIMSDALE, J. E. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 10, p. 1305-1312, 2008.

HAN, Y.; FAN, Z. D.; YUAN, N.; XIE, G. Q.; GAO, J.; DE, W.; GAO, X. Y.; ZHU, G. Q. Superoxide anions in the paraventricular nucleus mediate the enhanced cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in renovascular hypertensive rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 110, n. 3, p. 646-652, 2011.

HAN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, H. J.; GAO, X. Y.; WANG, W.; ZHU, G. Q. Reactive oxygen species in paraventricular nucleus modulates cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Brain Res.**, v. 1058, n. 1-2, p. 82-90, 2005.

HARTONO, S. P.; KNUDSEN, B. E.; LERMAN, L. O.; TEXTOR, S. C.; GRANDE, J. P. Combined effect of hyperfiltration and renin angiotensin system activation on development of chronic kidney disease in diabetic db/db mice. **BMC Nephrol.**, v. 15, n. 1, p. 58, 2014.

HASHIMOTO, T.; ISHII, J.; KITAGAWA, F.; YAMADA, S.; HATTORI, K.; OKUMURA, M.; NARUSE, H.; MOTOYAMA, S.; MATSUI, S.; TANAKA, I.; IZAWA, H.; MARUYAMA, I.; NOMURA, M.; OZAKI, Y. Circulating high-mobility group box 1 and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 221, n. 2, p. 490-495, 2012.

HEUSSER, K.; TANK, J.; ENGELI, S.; DIEDRICH, A.; MENNE, J.; ECKERT, S.; PETERS, T.; SWEEP, F. C.; HALLER, H.; PICHLMAIER, A. M.; LUFT, F. C.; JORDAN, J. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. **Hypertension**, v. 55, n. 3, p. 619-626, 2010.

HIGA, K. T.; MORI, E.; VIANA, F. F.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R537-545, 2002.

HIGASHIKUNI, Y.; TAKAOKA, M.; IWATA, H.; TANAKA, K.; HIRATA, Y.; NAGAI, R.; SATA, M. Aliskiren in combination with valsartan exerts synergistic protective effects against ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Hypertens Res**, v. 35, n. 1, p. 62-69, 2012.

HIGA-TANIGUCHI, 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, n. 11, p. 1103-1113, 2009.

HIROOKA, Y.; KISHI, T.; SAKAI, K.; TAKESHITA, A.; SUNAGAWA, K. Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 4, p. R818-826, 2011.

HOFFMAN, W. E.; PHILLIPS, M. I. The effect of subfornical organ lesions and ventricular blockade on drinking induced by angiotensin II. **Brain Res.**, v. 108, n. 1, p. 59-73, 1976.

HOM, S.; FLEEGAL, M. A.; EGLETON, R. D.; CAMPOS, C. R.; HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 5, p. R1881-1892, 2007.

HUANG, Y.; CAI, X.; ZHANG, J.; MAI, W.; WANG, S.; HU, Y.; REN, H.; XU, D. Prehypertension and Incidence of ESRD: a systematic review and meta-analysis. **Am J Kidney Dis**, v. 63, n. 1, p. 76-83, 2014.

HUANG, Y.; WANG, S.; CAI, X.; MAI, W.; HU, Y.; TANG, H.; XU, D. Prehypertension and incidence of cardiovascular disease: a meta-analysis. **BMC Med.**, v. 11, n. 2, p. 177, 2013.

HUSTON, J. M.; ROSAS-BALLINA, M.; XUE, X.; DOWLING, O.; OCHANI, K.; OCHANI, M.; YEBOAH, M.M.; CHATTERJEE, P. K.; TRACEY, K. J.; METZ, C.N. Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b. **J. Immunol.**, v. 183, n. 1, p. 552-559, 2009.

JIA, L.L.; KANG, Y.M.; WANG, F.X.; LI, H.B.; ZHANG, Y.; YU, X.J.; QI, J.; SUO, Y.P.; TIAN, Z.J.; ZHU, Z.; ZHU, G.Q.; QIN, D.N. Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. **PLoS One**, v.9, n.1, p. e85481, 2014.

JOGLAR, B.; RODRIGUEZ-PALLARES, J.; RODRIGUEZ-PEREZ, A.I.; REY, P.; GUERRA, M.J.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. **J Neurochem**, v. 109, n. 2, p. 656-669, 2009.

JORDÃO, M.T.; LADD, F.V.; COPPI, A.A.; CHOPARD, R.P.; MICHELINI, L.C. Exercise training restores hypertension-induced changes in the elastic tissue of the thoracic aorta. **J Vasc Res**, v. 48, n. 6, p. 513-524, 2011.

KALAYCI, R.; KAYA, M.; ELMAS, I.; ARICAN, N.; AHISHALI, B.; UZUN, H.; BILGIC, B.; KUCUK, M.; KUDAT, H. Effects of atorvastatin on blood-brain barrier permeability during L-NAME hypertension followed by angiotensin-II in rats. **Brain Res**, v. 1042, n. 2, p. 184-193, 2005.

KANG, C.; O'MOORE, K.M.; DICKMAN, J.R.; JI, L.L. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 10, p. 1394-1400, 2009.

KANG, R.; LIVESEY, K.M.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T.; TANG, D. HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. **Autophagy**, v.7, n.8, p. 904-906, 2011.

KANG, Y.M.; MA, Y.; ZHENG, J.P.; ELKS, C.; SRIRAMULA, S.; YANG, Z.M.; FRANCIS, J. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovasc Res**, v. 82, n.3, p. 503-512, 2009.

KANG, Y.M.; ZHANG, D.M.; YU, X.J.; YANG, Q.; QI, J.; SU, Q.; SUO, Y.P.; YUE, L.Y.; ZHU, G.Q.; QIN, D.N. Chronic infusion of enalaprilat into hypothalamic paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy by restoring neurotransmitters and cytokines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 274, n. 3, p. 436-444, 2014.

KANG, Y.M.; ZHANG, Z.H.; XUE, B.; WEISS, R.M.; FELDER, R.B. Inhibition of brain proinflammatory cytokine synthesis reduces hypothalamic excitation in rats with ischemia-induced heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. H227-236, 2008.

KAVVADAS, P.; WEIS, L.; ABED, A. B.; FELDMAN, D.L.; DUSSAULE, J.C.; CHATZIANTONIOU, C. Renin inhibition reverses renal disease in transgenic mice by shifting the balance between profibrotic and antifibrotic agents. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 901-907, 2013.

KAYA M.; KALAYCI, R.; KÜÇÜK, M.; ARICAN, N.; ELMAS, I.; KUDAT, H.; KORKUT, F. Effect of losartan on the blood-brain barrier permeability in diabetic hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 73, n. 25, p. 3235-3244, 2003.

KELLEHER, Z. T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J. S.; MARSHALL, H. E. NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 42, p. 30667-30672, 2007.

KIKUYA, M.; HOZAWA, A.; OHOKUBO, T.; TSUJI, I.; MICHIMATA, M.; MATSUBARA, M.; OTA, M.; NAGAI, K.; ARAKI, T.; SATOH, H.; ITO, S.; HISAMICHI, S.; IMAI, Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. **Hypertension**, v. 36, n. 5, p. 901-906, 2000.

KIM, S.W.; JIN, Y.; SHIN, J.H.; KIM, I.D.; LEE, H. K.; PARK, S.; HAN, P. L.; LEE, J. K. Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion. **Neurobiol.Dis.**, v.46, n.1, p. 147-156, 2012.

KIM, S. Y.; JUN, T. W.; LEE, Y. S.; NA, H. K.; SURH, Y. J.; SONG, W. Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappaB DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. 464-471, 2009.

KIMURA, Y.; HIROOKA, Y.; SAGARA, Y.; ITO, K.; KISHI, T.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A.; SUNAGAWA, K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. **Circ. Res.**, v. 96, n. 2, p. 252-260, 2005.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KATSUKI, M.; OGAWA, K.; SHINOHARA, K.; ISEGAWA, K.; SUNAGAWA, K. Exercise training causes sympathoinhibition through antioxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 34, n. 4, p. 278-283, 2012.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KIMURA, Y.; ITO, K.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 109, n. 19, p. 2357-2362, 2004.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KONNO, S.; OGAWA, K.; SUNAGAWA, K. Angiotensin II type 1 receptor-activated caspase-3 through ras/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the rostral ventrolateral medulla is involved in sympathoexcitation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 291-297, 2010.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; SUNAGAWA, K. Sympathoinhibition caused by orally administered telmisartan through inhibition of the AT₁ receptor in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats. **Hypertens. Res.**, v. 35, n. 9, p. 940-946, 2012.

KOHMAN, R. A.; BHATTACHARYA, T. K.; WOJCIK, E.; RHODES J. S. Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice. **J. Neuroinflammation**, v. 10, p. 114, 2013.

KON, H.; NAGANO, M.; TANAKA, F.; SATOH, K.; SEGAWA, T.; NAKAMURA, M. Association of decreased variation of R-R interval and elevated serum C-reactive protein level in a general population in Japan. **Int. Heart. J.**, V, 47, n. 6, p. 867-876, 2006.

KONNO, S.; HIROOKA, Y.; ARAKI, S.; KOGA, Y.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Azelnidipine decreases sympathetic nerve activity via antioxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 52, n. 6, p. 555-560, 2008.

KONNO, S.; HIROOKA, Y.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Sympathoinhibitory effects of telmisartan through the reduction of oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of obesity-induced hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 30, n. 10, p. 1992-1999, 2012.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 1, p. 388-395, 2007.

KUCUK, M.; KAYA, M.; KALAYCI, R.; CIMEN, V.; KUDAT, H.; ARICAN, N.; ELMAS, I.; KORKUT, F. Effects of losartan on the blood-brain barrier permeability in long-term nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 71, n. 8, p. 937-946, 2002.

KUNG, L. C.; CHAN, S. H.; WU, K. L.; OU, C. C.; TAI, M. H.; CHAN, J. Y. Mitochondrial respiratory enzyme complexes in rostral ventrolateral medulla as cellular targets of nitric oxide and superoxide interaction in the antagonism of antihypertensive action of eNOS transgene. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, n. 5, p. 1319-1332, 2008.

LA ROVERE, M. T.; BIGGER, J. T. JR.; MARCUS, F. I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P. J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet**, v. 351, n. 9101, p.478-484, 1998.

LAM, S. Y.; LIU, Y.; NG, K. M.; LIONG, E. C.; TIPOE, G. L.; LEUNG, P. S.; FUNG, M. L. Upregulation of a local renin-angiotensin system in the rat carotid body during chronic intermittent hypoxia. **Exp Physiol**, v. 99, n.1, p. 220-231, 2014.

LAM, S. Y.; TIPOE, G. L.; LIONG, E. C.; FUNG, M. L. Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 130, n. 3, p. 549-559, 2008.

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, n. 6, p. 1298-1306, 2007.

LEE, H.; PARK, M.; SHIN, N.; KIM, G.; KIM, Y.G.; SHIN, J. S.; KIM, H. High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 424, n. 2, p. 321-326, 2012.

LEE, S. K.; RYU, P. D.; LEE, S.Y. Differential distributions of neuropeptides in hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 556, p. 160-165, 2013.

LI, D.; LEE, C. W.; BUCKLER, K.; PAREKH, A.; HERRING, N.; PATERSON, D. J. Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. **Hypertension**, v. 59, n. 3, p. 642-649, 2012.

LI, X. C.; ZHUO, J. L. Proximal tubule-dominant transfer of AT(1a) receptors induces blood pressure responses to intracellular angiotensin II in AT(1a) receptor-deficient mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 304, n. 8, p. R588-598, 2013.

LIU, D.; GAO, L.; ROY, S. K.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Neuronal angiotensin II type 1 receptor upregulation in heart failure: activation of activator protein 1 and Jun N-terminal kinase. **Circ. Res.**, v. 99, n. 9, p. 1004-1011, 2006.

LIU, D.; GAO, L.; ROY, S. K.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Role of oxidant stress on AT1 receptor expression in neurons of rabbits with heart failure and in cultured neurons. **Circ. Res.**, v. 103, n. 2, p. 186-193, 2008.

LIU, K.; MORI, S.; TAKAHASHI, H. K.; TOMONO, Y.; WAKE, H.; KANKE, T.; SATO, Y.; HIRAGA, N.; ADACHI, N.; YOSHINO, T.; NISHIBORI, M. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. **FASEB J.**, v. 21, n. 14, p. 3904-3916, 2007.

LIU, X.; HE, L.; DINGER, B.; STENSAAS, L.; FIDONE, S. Effect of endothelin receptor antagonist bosentan on chronic hypoxia-induced inflammation and chemoafferent neuron adaptation in rat carotid body. **High. Alt. Med. Biol.**, v. 13, n. 3, p. 209-216, 2012.

LIU, X.; HE, L.; STENSAAS, L.; DINGER, B.; FIDONE, S. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 296, n.2, p. L158-166, 2009.

LOB, H. E.; SCHULTZ, D.; MARVAR, P. J.; DAVISSON, R. L.; HARRISON, D. G. Role of the NADPH oxidases in the subfornical organ in angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 61, n. 2, p 382-387, 2013.

LOUKILI, N.; ROSENBLATT-VELIN, N.; LI, J.; CLERC, S.; PACHER, P.; FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells in vitro and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium in vivo. **Cardiovasc. Res.**, v. 89, n. 3, p. 586-594, 2011.

LUO, Y.; CHIHARA, Y.; FUJIMOTO, K.; SASAHIRA, T.; KUWADA, M.; FUJIWARA, R.; FUJII, K.; OHMORI, H.; KUNIYASU, H. High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. **Eur. J. Cancer**, v.49, n. 3, p. 741-751, 2013.

MADDEN, K. M.; LOCKHART, C.; POTTER, T. F.; CUFF, D. Aerobic training restores arterial baroreflex sensitivity in older adults with type 2 diabetes, hypertension, and hypercholesterolemia. **Clin. J. Sport. Med.**, v. 20, n. 4, p. 312-317, 2010.

- MAGNA, M.; PISETSKY, D. S. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. **Mol. Med.**, v. 20, n. 1, p. 138-146, 2014.
- 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, n. 4, 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, n. 5, p. e94927, 2014.
- MATSUMURA, K.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 5, p. R1611-1619, 1998.
- MCBRYDE, F. D.; ABDALA, A. P.; HENDY, E. B.; PIJACKA, W.; MARVAR, P.; MORAES, D. J.; SOBOTKA, P. A.; PATON, J. F. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. **Nat. Commun.**, v. 4: p. 2395, 2013.
- 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, n. 4, p. 851-857, 2003.
- MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA L. G. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. **Hypertension**, v. 11, n. 2, p. I75-79, 1988.
- MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 9, p. 947-960, 2009.
- MICHELINI, L. C. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 9, n.3, p. 214-221, 2007.
- MINAMI, N.; IMAI, Y.; MUNAKATA, M.; SASAKI, S.; SEKINO, H.; ABE, K.; YOSHINAGA, K. Age-related changes in blood pressure, heart rate and baroreflex sensitivity in SHR. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.**, v. 15, p. 85-87, 1989.
- MITRIUS, J.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: Duration of dipsogenic action of angiotensin-II. **Neurosci. Lett.**, v. 5, n. 3-4, p. 183-187, 1977.
- MIYOSHI, M.; MIYANO, K.; MORIYAMA, N.; TANIGUCHI, M.; WATANABE, T. Angiotensin type 1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced stimulation of rat microglial cells by suppressing nuclear factor kappaB and activator protein-1 activation. **Eur. J. Neurosci.**, v. 27, n. 2, p. 343-351, 2008.
- MKRTCHIAN, S.; KÄHLIN, J.; EBBERYD, A.; GONZALEZ, C.; SANCHEZ, D.; BALBIR, A.; KOSTUK, E. W.; SHIRAHATA, M.; FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. The human carotid body transcriptome with focus on oxygen sensing and inflammation-a comparative analysis. **J. Physiol.**, v. 590, p. 3807-3819, 2012.

MORAES-SILVA, I. C.; DE LA FUENTE, R. N.; MOSTARDA, C.; ROSA, K.; FLUES, K.; DAMACENO-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M.C. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 37, n. 3, p. e114-120, 2010.

MURATANI, H.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 260, n. 5, p. R977-984, 1991.

MUTHUSAMY, V. R.; KANNAN, S.; SADHAASIVAM, K.; GOUNDER, S. S.; DAVIDSON, C. J.; BOEHEME, C.; HOIDAL, J. R.; WANG L.; RAJASEKARAN N. S. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, n. 2, p. 366-376, 2012.

NAITO, Y.; TSUJINO, T.; FUJIOKA, Y.; OHYANAGI, M.; IWASAKI, T. Augmented diurnal variations of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p. 827-833, 2002.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. **Cell. Death Differ.**, v. 18, n. 9, p. 1478-1486, 2011.

NI, J.; MA, K. L.; WANG, C. X.; LIU, J.; ZHANG, Y.; LV, L. L.; NI, H. F.; CHEN, Y. X.; RUAN, X. Z.; LIU, B. C. Activation of renin-angiotensin system is involved in dyslipidemia-mediated renal injuries in apolipoprotein E knockout mice and HK-2 cells. **Lipids Health Dis.**, v. 12, n. 1, p. 49, 2013.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, n. 308, p. 1314-1318, 2005.

NISHI, E. E.; BERGAMASCHI, C. T.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; SIMON, K. A.; CAMPOS, R. R. Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 26, n. 7, p. 858-865, 2013.

NISHIHARA, M.; HIROOKA, Y.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Different role of oxidative stress in paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation in awake spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 30, n. 9, p. 1758-1765, 2012.

NISHIHARA, M.; HIROOKA, Y.; MATSUKAWA, R.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 30, v.1, p. 97-106, 2012.

NORTHCOTT, C. A.; WATTS, S.; CHEN, Y.; MORRIS, M.; CHEN, A.; HAYWOOD, J. R. Adenoviral inhibition of AT1a receptors in the paraventricular nucleus inhibits acute increases in mean arterial blood pressure in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 299, n. 5, p. R1202-1211, 2010.

NOSAKA, S.; MURATA, K.; KOBAYASHI, M.; CHENG, Z. B.; MARUYAMA, J. Inhibition of baroreflex vagal bradycardia by activation of the rostral ventrolateral medulla in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n. 3, p. H1239-1247, 2000.

NOZOE, M.; HIROOKA, Y.; KOGA, Y.; SAGARA, Y.; KISHI, T.; ENGELHARDT, J. F.; SUNAGAWA, K. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 62-68, 2007.

O'CONNOR, K. A.; HANSEN, M. K.; RACHAL PUGH, C.; DEAK, M. M.; BIEDENKAPP, J. C.; MILLIGAN, E. D.; JOHNSON, J. D.; WANG, H.; MAIER, S. F.; TRACEY, K. J.; WATKINS, L. R. Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. **Cytokine**, v. 24, n. 6, p. 254-265, 2003.

OGAWA, K.; HIROOKA, Y.; SHINOHARA, K.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Inhibition of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla improves impaired baroreflex sensitivity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Int Heart J**, v. 53, n. 3, p. 193-198, 2012.

OH, Y. J.; YOUN, J. H.; JI, Y.; LEE, S. E.; LIM, K. J.; CHOI, J. E.; SHIN, J. S. HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. **J. Immunol.**, v. 182, n. 9, p. 5800-5809, 2009.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; COLOMBARI, D. S.; DAVISSON, R. L.; KASPAROV, S.; HIRATA, A. E.; CAMPOS, R. R.; PATON, J. F. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 290-296, 2010.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; DUGAICH, A. P.; CARILLO, B. A.; ABREU, N. P.; BOIM, M. A.; MARTINS, P. J.; D'ALMEIDA, V.; DOLNIKOFF, M. S.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; NISHI, E. E.; CARILLO, B. A.; BOIM, M. A.; DOLNIKOFF, M. S.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 22, n.5, p. 484-492, 2009.

OLOFSSON, P. S.; ROSAS-BALLINA, M.; LEVINE, Y. A.; TRACEY, K. J. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. **Immunol. Rev.**, v. 248, n. 1, p. 188-204, 2012.

ORMEZZANO, O.; CRACOWSKI, J. L.; QUESADA, J. L.; PIERRE, H.; MALLION, J. M.; BAGUET J. P. EVALuation of the prognostic value of BARoreflex sensitivity in hypertensive patients: the EVABAR study. **J. Hypertens.**, v. 26, n. 7, p. 1373-1378, 2008.

PAN, Y. X.; GAO, L.; WANG, W. Z.; ZHENG, H.; LIU, D.; PATEL, K. P.; ZUCKER, I. H.; WANG, W. Exercise training prevents arterial baroreflex dysfunction in rats treated with central angiotensin II. **Hypertension**, v.49, n.3, p. 519-527, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1986.

PELISCH, N.; HOSOMI, N.; UENO, M.; NAKANO, D.; HITOMI, H.; MOGI, M.; SHIMADA, K.; KOBORI, H.; HORIUCHI, M.; SAKAMOTO, H.; MATSUMOTO, M.; KOHNO, M.; NISHIYAMA, A. Blockade of AT1 receptors protects the blood-brain barrier

and improves cognition in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 24, n.3, p. 362-368, 2011.

PENG, Y. J.; NANDURI, J.; RAGHURAMAN, G.; WANG, N.; KUMAR, G. K.; PRABHAKAR, N. R. Role of oxidative stress-induced endothelin-converting enzyme activity in the alteration of carotid body function by chronic intermittent hypoxia. **Exp. Physiol.**, v. 98, n. 11, p. 1620-1630, 2013.

PENG, Y. J.; OVERHOLT, J. L.; KLINE, D.; KUMAR, G. K.; PRABHAKAR, N. R. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 17, p. 10073-10078, 2003.

PETERSON, J. R.; BURMEISTER, M. A.; TIAN, X.; ZHOU, Y.; GURUJU, M. R.; STUPINSKI, J. A.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Genetic silencing of Nox2 and Nox4 reveals differential roles of these NADPH oxidase homologues in the vasopressor and dipsogenic effects of brain angiotensin II. **Hypertension**, v. 54, n.5, p. 1106-1114, 2009.

PHILLIPS, M. I.; FELIX, D. Specific angiotensin II receptive neurons in the cat subfornical organ. **Brain Res.**, v. 109, n. 3, p. 531-540, 1976.

POLSON, J. W.; DAMPNEY, R. A.; BOSCAN, P.; PICKERING, A. E.; PATON, J. F. Differential baroreflex control of sympathetic drive by angiotensin II in the nucleus tractus solitarii. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, n. 5, p. R1954-1960, 2007.

PRZYBYLSKI, J.; TRZEBSKI, A.; PRZYBYSZEWSKI, A. Circulatory responses to acute hypoxia in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Acta Physiol. Pol.**, v. 31, n. 5, p. 463-468, 1980.

QI, J.; ZHANG, D. M.; SUO, Y. P.; SONG, X. A.; YU, X. J.; ELKS, C.; LIN, Y. X.; XU, Y. Y.; ZANG, W. J.; ZHU, Z.; KANG, Y. M. Renin-angiotensin system modulates neurotransmitters in the paraventricular nucleus and contributes to angiotensin II-induced hypertensive response. **Cardiovasc. Toxicol.**, v. 13, n. 1, p. 48-54, 2013.

RADÁK, Z.; CHUNG, H. Y.; NAITO, H.; TAKAHASHI, R.; JUNG, K. J.; KIM, H. J.; GOTO, S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. **FASEB J.**, v. 18, n. 6, p. 749-750, 2004.

REARDON, C.; DUNCAN, G. S.; BRÜSTLE, A.; BRENNER, D.; TUSCHE, M. W.; OLOFSSON, P. S.; ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J.; MAK, T. W. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 4, p. 1410-1415, 2013.

REYES, E. P.; ABARZÚA, S.; MARTIN, A.; RODRÍGUEZ, J.; CORTÉS, P. P.; FERNÁNDEZ, R. LPS-induced c-Fos activation in NTS neurons and plasmatic cortisol increases in septic rats are suppressed by bilateral carotid chemodenervation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 758, p. 185-190, 2012.

RODRIGUEZ-PALLARES, J.; REY, P.; PARGA, J. A.; MUÑOZ, A.; GUERRA, M. J.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Brain angiotensin enhances doPA médiainergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. **Neurobiol. Dis.**, v. 31, n. 1, p. 58-73, 2008.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. **J. Neurochem.**, v. 67, n. 2, p. 662-668, 1996.

ROQUE, F. R.; BRIONES, A. M.; GARCÍA-REDONDO, A. B.; GALÁN, M.; MARTÍNEZ-REVELLES, S.; AVENDAÑO, M. S.; CACHOFEIRO, V.; FERNANDES, T.; VASSALLO, D. V.; OLIVEIRA, E. M.; SALAICES, M. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **Br. J. Pharmacol.**, v. 168, n.3, p. 686-703, 2013.

ROSAS-BALLINA, M.; OLOFSSON, P. S.; OCHANI, M.; VALDÉS-FERRER, S. I.; LEVINE, Y. A.; REARDON, C.; TUSCHE, M. W.; PAVLOV, V. A.; ANDERSSON, U.; CHAVAN, S.; MAK, T. W.; TRACEY, K. J. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98-101, 2011.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 11, p. 775-787, 2011.

SAKAI, K.; AGASSANDIAN, K.; MORIMOTO, S.; SINNAYAH, P.; CASSELL, M. D.; DAVISSON, R. L.; SIGMUND, C. D. Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 4, p. 1088-1095, 2007.

SANO, H.; OKAMOTO, H.; KITABATAKE, A.; IIZUKA, K.; MURAKAMI, T.; KAWAGUCHI, H. Increased mRNA expression of cardiac renin-angiotensin system and collagen synthesis in spontaneously hypertensive rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 178, n. 1-2, p. 51-58, 1998.

SERRA, A. J.; SANTOS, M. H.; BOCALINI, D. S.; ANTÔNIO, E. L.; LEVY, R. F.; SANTOS, A. A.; HIGUCHI, M. L.; SILVA, J. A.; MAGALHÃES, F. C.; BARAÚNA, V. G.; KRIEGER, J. E.; TUCCI, P. J. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. **J. Physiol.**, v. 588, p. 2431-2442, 2010.

SHAN, Z. Z.; DAI, S. M.; SU, D. F. Arterial baroreflex deficit induced organ damage in sinoaortic denervated rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 38, n. 3, p. 427-437, 2001.

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, n. 7, p. H980-986, 2013.

SHI, P.; DIEZ-FREIRE, C.; JUN, J. Y.; QI, Y.; KATOVICH, M. J.; LI, Q.; SRIRAMULA, S.; FRANCIS, J.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M. K. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 56, n.2, p. 297-303, 2010.

SHI, Z.; GAN, X. B.; FAN, Z. D.; ZHANG, F.; ZHOU, Y. B.; GAO, X. Y.; DE, W.; ZHU, G. Q. Inflammatory cytokines in paraventricular nucleus modulate sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 203, n. 2, p. 289-297, 2011.

SHU, H. F.; WANG, B. R.; WANG, S. R.; YAO, W.; HUANG, H. P.; ZHOU, Z.; WANG, X.; FAN, J.; WANG, T.; JU, G. IL-1 β inhibits IK and increases [Ca²⁺]_i in the carotid body glomus cells and increases carotid sinus nerve firings in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n.12, p. 3638-3647, 2007.

SIMMS, A. E.; PATON, J. F.; PICKERING, A. E.; ALLEN, A. M. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? **J. Physiol.**, v. 587, p. 597-610, 2009.

SINDLER, A. L.; DELP, M. D.; REYES, R.; WU, G.; MULLER-DELP, J. M. Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. **J. Physiol.**, v. 587, p. 3885-3897, 2009.

SINNAYAH, P.; LAZARTIGUES, E.; SAKAI, K.; SHARMA, R. V.; SIGMUND, C. D.; DAVISSON, R. L. Genetic ablation of angiotensinogen in the subfornical organ of the brain prevents the central angiotensinergic pressor response. **Circ. Res.**, v. 99, n. 10, p. 1125-1131, 2006.

SONKODI, S.; JOÓ, F.; MAURER, M. The permeability state of the blood-brain barrier in relation with the plasma renin activity in early stage of experimental renal hypertension. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 51, n. 5, p. 448-452, 1970.

SØRENSEN, M. V.; PEDERSEN, S.; MØGELVANG, R.; SKOV-JENSEN, J.; FLYVBJERG, A. Plasma high-mobility group box 1 levels predict mortality after ST-segment elevation myocardial infarction. **JACC Cardiovasc. Interv.**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2011.

SPIER, S. A.; DELP, M. D.; MEININGER, C. J.; DONATO, A. J.; RAMSEY, M. W.; MULLER-DELP, J. M. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. **J. Physiol.**, v. 556, p. 947-958, 2004.

SPIER, S. A.; DELP, M. D.; STALLONE, J. N.; DOMINGUEZ, J. M.; MULLER-DELP, J. M. Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI₂ and nitric oxide. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 292, n. 6, p. H3119-3127, 2007.

SRIRAMULA, S.; CARDINALE, J. P.; FRANCIS, J. Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63847, 2013.

SRIRAMULA, S.; CARDINALE, J. P.; LAZARTIGUES, E.; FRANCIS, J. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 92, n. 3, p. 401-408, 2011.

STERN, J. E.; SONNER, P. M.; SON, S. J.; SILVA, F. C.; JACKSON, K.; MICHELINI, LC. Exercise training normalizes an increased neuronal excitability of NTS-projecting neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in hypertensive rats. **J. Neurophysiol.**, v. 107, n. 10, p. 912-921, 2012.

SU, D. F.; MIAO, C. Y. Arterial baroreflex function in conscious rats. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 23, n. 8, p. 673-679, 2002.

SUNG, Y. H.; KIM, S. C.; HONG, H. P.; PARK, C. Y.; SHIN, M. S.; KIM, C. J.; SEO, J. H.; KIM, D. Y.; KIM, D. J.; CHO, H. J. Treadmill exercise ameliorates doPA médiainergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. **Life Sci.**, v. 91, n. 25-16, p. 1309-1316, 2012.

TABET, F.; SCHIFFRIN, E. L.; CALLERA, G. E.; HE, Y.; YAO, G.; OSTMAN, A.; KAPPERT, K.; TONKS, N. K.; TOUYZ, R. M. Redox-sensitive signaling by angiotensin II involves oxidative inactivation and blunted phosphorylation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells from SHR. **Circ. Res.**, v. 103, n. 2, p. 149-158, 2008.

TAI, M. H.; WANG, L. L.; WU, K. L.; CHAN, J. Y. Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 4, p. 450-462, 2005.

TAKAGISHI, M.; WAKI, H.; BHUIYAN, M. E.; GOURAUD, S. S.; KOHSAKA, A.; CUI, H.; YAMAZAKI, T.; PATON, J. F.; MAEDA, M. IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarius attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 298, n.1, p. R183-190, 2010.

TAN, P. S.; KILLINGER, S.; HORIUCHI, J.; DAMPNEY, R. A. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, n. 6, p. R2267-2278, 2007.

TAN, Z. Y.; LU, Y.; WHITEIS, C. A.; SIMMS, A. E.; PATON, J. F.; CHAPLEAU M. W.; ABOUD, F. M. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. **Circ. Res.**, v. 106, n. 3, p. 536-545, 2010.

TANG, D.; KANG, R.; CHEH, C. W.; LIVESEY, K. M.; LIANG, X.; SCHAPIRO, N. E.; BENSCHOP, R.; SPARVERO, L. J.; AMOSCATO, A. A.; TRACEY, K. J.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 38, p. 5299-5310, 2010.

TIMMINS, J.M.; OZCAN, L.; SEIMON, T.A.; LI, G.; MALAGELADA, C.; BACKS, J.; BACKS, T.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N.; ANDERSON, M.E.; TABAS, I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 10, p. 2925-2941, 2009.

TONEY, G. M.; PORTER, J. P. Effects of blockade of AT1 and AT2 receptors in brain on the central angiotensin II pressor response in conscious spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 6, p. 581-589, 1993.

TONEY, G. M.; PORTER, J. P. Functional roles of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II pressor response in conscious young spontaneously hypertensive rats. **Dev. Brain Res.**, v. 71, n. 2, p. 193-199, 1993.

TSAI, C. Y.; SU, C. H.; BAUDRIE, V.; LAUDE, D.; WENG, J. C.; CHANG, A. Y.; CHAN, J. Y.; ELGHOZI, J. L.; CHAN, S. H. Visualizing oxidative stress-induced depression of cardiac vagal baroreflex by MRI/DTI in a mouse neurogenic hypertension model. **NeuroImage**, v. 82, p. 190-199, 2013.

UENO, M.; SAKAMOTO, H.; LIAO, Y. J.; ONODERA, M.; HUANG, C. L.; MIYANAKA, H.; NAKAGAWA, T. Blood-brain barrier disruption in the hypothalamus of young adult spontaneously hypertensive rats. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 122, n. 2, p. 131-137, 2004.

VARAGIC, J.; FROHLICH, E. D. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 34, v. 11, p. 1435-1442, 2002.

VITAL, S. A.; TERAOKA, S.; NAGAI, M.; GRANGER, D. N. Mechanisms underlying the cerebral microvascular responses to angiotensin II-induced hypertension. **Microcirculation**, v. 17, n. 8, p. 641-649, 2010.

VIVEKANANTHAN, D. P.; BLACKSTONE, E. H.; POTHIER, C. E.; LAUER, M. S. Heart rate recovery after exercise is a predictor of mortality, independent of the angiographic severity of coronary disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, n. 5, p. 831-838, 2003.

WAKI, H.; BHUIYAN, M. E.; GOURAUD, S. S.; TAKAGISHI, M.; HATADA, A.; KOHSAKA, A.; PATON, J. F.; MAEDA, M. Acute reductions in blood flow restricted to the dorsomedial medulla induce a pressor response in rats. **J. Hypertens.**, v. 29, n. 8, p. 1536-1545, 2011.

WAKI, H.; LIU, B.; MIYAKE, M.; KATAHIRA, K.; MURPHY, D.; KASPAROV, S.; PATON, J. F. Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1321-1327, 2007.

WANG, G.; ANRATHER, J.; GLASS, M. J.; TARSITANO, M. J.; ZHOU, P.; FRY, K. A.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C. Nox2, Ca²⁺, and protein kinase C play a role in angiotensin II-induced free radical production in nucleus tractus solitarius. **Hypertension**, v. 48, n. 3, p. 482-489, 2006.

WANG, G.; COLEMAN, C. G.; GLASS, M. J.; ZHOU, P.; YU, Q.; PARK, L.; ANRATHER, J.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C. Angiotensin II type 2 receptor-coupled nitric oxide production modulates free radical availability and voltage-gated Ca²⁺ currents in NTS neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 302, n. 9, p. R1076-1083, 2012.

WANG, G.; SARKAR, P.; PETERSON, J. R.; ANRATHER, J.; PIERCE, J. P.; MOORE, J. M.; FENG, J.; ZHOU, P.; MILNER, T. A.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. COX-1-derived PGE₂ and PGE₂ type 1 receptors are vital for angiotensin II-induced formation of reactive oxygen species and Ca²⁺ influx in the subfornical organ. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 305, n. 10, p. H1451-1461, 2013.

WANG, L.; OPLAND, D.; TSAI, S.; LUK, C. T.; SCHROER, S. A.; ALLISON, M. B.; ELIA, A. J.; FURLONGER, C.; SUZUKI, A.; PAIGE, C. J.; MAK, T. W.; WINER, D. A.; MYERS, M. G. JR.; WOO, M. Pten deletion in RIP-Cre neurons protects against type 2 diabetes by activating the anti-inflammatory reflex. **Nat. Med.**, v. 20, n. 5, p. 484-492, p. 2014.

WANG, S.; PATON, J. F.; KASPAROV, S. Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarius. **Exp. Physiol.**, v. 92, n.2, p. 371-382, 2007.

WANG, W. Z.; GAO, L.; PAN, Y. X.; ZUCKER, I. H.; WANG, W. AT₁ receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the interaction between the baroreflex and the cardiac sympathetic afferent reflex in anesthetized rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n.3, p. R1137-1145, 2007.

WEI, S. G.; YU, Y.; ZHANG, Z. H.; FELDER, R. B. Angiotensin II upregulates hypothalamic AT1 receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 296, n. 5, p. H1425-1433, 2009.

WEI, S. G.; ZHANG, Z. H.; BELTZ, T. G.; YU, Y.; JOHNSON, A. K.; FELDER, R. B. Subfornical organ mediates sympathetic and hemodynamic responses to blood-borne proinflammatory cytokines. **Hypertension**, v. 62, n. 1, p. 118-125, 2013.

WEI, S. G.; ZHANG, Z. H.; YU, Y.; WEISS, R. M.; FELDER, R. B. Central actions of the chemokine stromal cell-derived factor 1 contribute to neurohumoral excitation in heart failure rats. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 991-998, 2012.

WHALEY-CONNELL, A.; GOVINDARAJAN, G.; HABIBI, J.; HAYDEN, M. R.; COOPER, S. A.; WEI, Y.; MA, L.; QAZI, M.; LINK, D.; KARUPARTHI, P. R.; STUMP, C.; FERRARIO, C.; SOWERS, J. R. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 293, n. 1, p. E355-363, 2007.

WHALEY-CONNELL, A.; HABIBI, J.; REHMER, N.; ARDHANARI, S.; HAYDEN, M. R.; PULAKAT, L.; KRUEGER, C.; FERRARIO, C. M.; DEMARCO, V. G.; SOWERS, J. R. Renin inhibition and AT(1)R blockade improve metabolic signaling, oxidant stress and myocardial tissue remodeling. **Metabolism**, v. 62, n. 6, p. 861-872, 2013.

WU, K. L.; CHAN, S. H.; CHAN, J. Y. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. **J. Neuroinflammation**, v. 9, n.1, p. 212, 2012.

WUSTMANN, K.; KUCERA, J. P.; SCHEFFERS, I.; MOHAUPT, M.; KROON, A. A.; DE LEEUW, P. W.; SCHMIDLI, J.; ALLEMANN, Y.; DELACRÉTAZ, E. Effects of chronic baroreceptor stimulation on the autonomic cardiovascular regulation in patients with drug-resistant arterial hypertension. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 530-536, 2009.

XIA, F.; WANG, C.; JIN, Y.; LIU, Q.; MENG, Q.; LIU, K.; SUN, H. Luteolin Protects HUVECs from TNF- α -induced Oxidative Stress and Inflammation via its Effects on the Nox4/ROS-NF- κ B and MAPK Pathways. **J. Atheroscler. Thromb.** In press, 2014.

XIA, H.; SUDA, S.; BINDOM, S.; FENG, Y.; GURLEY, S. B.; SETH, D.; NAVAR, L. G.; LAZARTIGUES, E. ACE2-mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function. **PLoS One**, v. 6, n.7, p. 22682, 2011.

XIE, H. H.; MIAO, C. Y.; LIU, J. G.; SU, D. F. Effects of long-term treatment with candesartan on organ damages in sinoaortic denervated rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, n. 2, p. 325-331, 2003.

XU, B.; ZHENG, H.; PATEL, K. P. Enhanced activation of RVLM-projecting PVN neurons in rats with chronic heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 302, n. 8, p. H1700-1711, 2012.

XU, H.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; MCBRIDE, F.; LIU, B.; HEWINSON, J.; TOWARD, M.; HENDY, E. B.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A. F.; GIANNOTTA, M.; WAKI, H.; ASCIONE, R.; PATON, J. F.; Kasparov S. Upregulation of junctional adhesion molecule-A

is a putative prognostic marker of hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 96, n. 3, p. 552-560, 2012.

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, n. 5, p. H1328-1338, 2010.

XU, Y.; GAO, Q.; GAN, X. B.; CHEN, L.; ZHANG, L.; ZHU, G. Q.; GAO, X. Y. Endogenous hydrogen peroxide in paraventricular nucleus mediates sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **Exp. Physiol.**, v. 96, n.12, p. 1282-1292, 2011.

XUE, B.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; GUO, F.; HAY, M.; JOHNSON, A. K. PVN adenovirus-siRNA injections silencing either NOX2 or NOX4 attenuate aldosterone/NaCl-induced hypertension in mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 302, n. 3, H733-741, 2012.

YAMAMOTO, E.; KATAOKA, K.; DONG, Y. F.; NAKAMURA, T.; FUKUDA, M.; TOKUTOMI, Y.; MATSUBA, S.; NAKO, H.; NAKAGATA, N.; KANEKO, T.; OGAWA, H.; KIM-MITSUYAMA, S. Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 633-638, 2009.

YAMAZATO, M.; FERREIRA, A. J.; YAMAZATO, Y.; DIEZ-FREIRE, C.; YUAN, L.; GILLIES, R.; RAIZADA, M. K. Gene transfer of angiotensin-converting enzyme 2 in the nucleus tractus solitarius improves baroreceptor heart rate reflex in spontaneously hypertensive rats. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 12, n. 4, p. 456-461, 2011.

YAMAZATO, M.; YAMAZATO, Y.; SUN, C.; DIEZ-FREIRE, C.; RAIZADA, M. K. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 926-931, 2007.

YANAI, H.; BAN, T.; TANIGUCHI, T. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. **Trends. Immunol.**, v. 33, n.12, p. 633-640, 2012.

YANG, H.; ANTOINE, D. J.; ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 93 n. 6, p. 865-873, 2013.

YANG, H.; LUNDBÄCK, P.; OTTOSSON, L.; ERLANDSSON-HARRIS, H.; VENEREAU, E.; BIANCHI, M. E.; AL-ABED, Y.; ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J.; ANTOINE, D. J. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). **Mol. Med.**, v. 18, p. 250-259, 2012.

YI, C. X.; AL-MASSADI, O.; DONELAN, E.; LEHTI, M.; WEBER, J.; RESS, C.; TRIVEDI, C.; MÜLLER, T. D.; WOODS, S. C.; HOFMANN, S. M. Exercise protects against high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. **Physiol. Behav.**, v. 106, n. 4, p. 485-490, 2012.

YOUNG, C. N.; CAO, X.; GURUJU, M. R.; PIERCE, J. P.; MORGAN, D. A.; WANG, G.; IADECOLA, C.; MARK, A. L.; DAVISSON, R. L. ER stress in the brain subfornical organ mediates angiotensin-dependent hypertension. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 11, p. 3960-3964, 2012.

YU, Y.; XUE, B. J.; ZHANG, Z. H.; WEI, S. G.; BELTZ, T. G.; GUO, F.; JOHNSON, A. K.; FELDER, R. B. Early interference with p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 842-849, 2013.

YU, Y.; ZHONG, M. K.; LI, J. SUN, X. L.; XIE, G. Q.; WANG, W.; ZHU, G. Q. Endogenous hydrogen peroxide in paraventricular nucleus mediating cardiac sympathetic afferent reflex and regulating sympathetic activity. **Pflugers Arch.**, v. 454, n. 4, p. 551-557, 2007.

YUAN, N.; ZHANG, F.; ZHANG, L. L.; GAO, J.; ZHOU, Y. B.; HAN, Y.; ZHU, G. Q. SOD1 gene transfer into paraventricular nucleus attenuates hypertension and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. **Pflugers Arch.**, v. 465, n. 2, p. 261-270, 2013.

ZAMPIERI, T.F. **Efeitos sequenciais do treinamento físico sobre a plasticidade de vias ocitocinérgicas centrais em ratos normotensos e hipertensos.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ZHANG, M.; MAO, Y.; RAMIREZ, S. H.; TUMA, R. F.; CHABRASHVILI, T. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 852-858, 2010.

ZHANG, Y.; YU, Y.; ZHANG, F.; ZHONG, M.K.; SHI, Z.; GAO, X.Y.; WANG, W.; ZHU, G.Q. NAD(P)H oxidase in paraventricular nucleus contributes to the effect of angiotensin II on cardiac sympathetic afferent reflex. **Brain Res**, v. 1082, n.1, p.132-141, 2006.

ZHANG, Z. H.; WEI, S. G.; FRANCIS, J.; FELDER, R. B. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 284, n. 4, p. R916-927, 2003.

ZHONG, M. K.; GAO, J.; ZHANG, F.; XU, B.; FAN, Z. D.; WANG, W.; ZHU, G. Q. Reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla modulate cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 197, n.4, p. 297-304, 2009.

ZHOU, J. R.; ZHANG, L. D.; WEI, H. F.; WANG, X.; NI, H. L.; YANG, F.; ZHANG, T.; JIANG, C. L. Neuropeptide Y induces secretion of high-mobility group box 1 protein in mouse macrophage via PKC/ERK dependent pathway. **J. Neuroimmunol.**, v. 260, n. 1-2, p. 55-59, 2013.

ZHUO, J. L.; FERRAO, F. M.; ZHENG, Y.; LI, X. C. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. **Front. Endocrinol. (Lausanne)**, v. 4, p. 166, 2013.

ZHUO, J. L.; LI, X. C. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1551-1565, 2011.

ZIMMERMAN, M. C.; DUNLAY, R. P.; LAZARTIGUES, E.; ZHANG, Y.; SHARMA, R. V.; ENGELHARDT, J. F.; DAVISSON, R. L. Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. **Circ. Res.**, v. 95, n. 5, p. 532-539, 2004.

ZIMMERMAN, M. C.; LAZARTIGUES, E.; LANG, J. A.; SINNAYAH, P.; AHMAD, I. M.; SPITZ, D. R.; DAVISSON, R. L. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. **Circ. Res.**, v. 91, n. 11, p. 1038-1045, 2002.

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, n. 2, p. 201-216, 2004.

ZIMMERMAN, M. C.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Superoxide médiate angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 717-723, 2005.

APÊNDICE – Artigo publicado

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Time-Dependent Effects of Training on Cardiovascular Control in Spontaneously Hypertensive Rats: Role for Brain Oxidative Stress and Inflammation and Baroreflex Sensitivity

Gustavo S. Masson¹, Tassia S. R. Costa¹, Lidia Yshii², Denise C. Fernandes³, Pedro Paulo Silva Soares⁴, Francisco R. Laurindo³, Cristoforo Scavone², Lisete C. Michelini^{1*}

1 Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Vascular Biology Laboratory, Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Department of Physiology & Pharmacology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

Abstract

Baroreflex dysfunction, oxidative stress and inflammation, important hallmarks of hypertension, are attenuated by exercise training. In this study, we investigated the relationships and time-course changes of cardiovascular parameters, pro-inflammatory cytokines and pro-oxidant profiles within the hypothalamic paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rats (SHR). Basal values and variability of arterial pressure and heart rate and baroreflex sensitivity were measured in trained (T, low-intensity treadmill training) and sedentary (S) SHR at weeks 0, 1, 2, 4 and 8. Paraventricular nucleus was used to determine reactive oxygen species (dihydroethidium oxidation products, HPLC), NADPH oxidase subunits and pro-inflammatory cytokines expression (Real time PCR), p38 MAPK and ERK1/2 expression (Western blotting), NF- κ B content (electrophoretic mobility shift assay) and cytokines immunofluorescence. SHR-S vs. WKY-S (Wistar Kyoto rats as time control) showed increased mean arterial pressure (172 ± 3 mmHg), pressure variability and heart rate (358 ± 7 b/min), decreased baroreflex sensitivity and heart rate variability, increased p47^{phox} and reactive oxygen species production, elevated NF- κ B activity and increased TNF- α and IL-6 expression within the paraventricular nucleus of hypothalamus. Two weeks of training reversed all hypothalamic changes, reduced ERK1/2 phosphorylation and normalized baroreflex sensitivity (4.04 ± 0.31 vs. 2.31 ± 0.19 b/min/mmHg in SHR-S). These responses were followed by increased vagal component of heart rate variability (1.9-fold) and resting bradycardia (-13%) at the 4th week, and, by reduced vasomotor component of pressure variability (-28%) and decreased mean arterial pressure (-7%) only at the 8th week of training. Our findings indicate that independent of the high pressure levels in SHR, training promptly restores baroreflex function by disrupting the positive feedback between high oxidative stress and increased pro-inflammatory cytokines secretion within the hypothalamic paraventricular nucleus. These early adaptive responses precede the occurrence of training-induced resting bradycardia and blood pressure fall.

Citation: Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PP, et al. (2014) Time-Dependent Effects of Training on Cardiovascular Control in Spontaneously Hypertensive Rats: Role for Brain Oxidative Stress and Inflammation and Baroreflex Sensitivity. PLoS ONE 9(5): e94927. doi:10.1371/journal.pone.0094927

Editor: Henning Ulrich, University of São Paulo, Brazil

Received: October 28, 2013; **Accepted:** March 20, 2014; **Published:** May 1, 2014

Copyright: © 2014 Masson et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, research grant 09/54299-1), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, research Grant 304060/2011-9) and Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, fellowship to GSM). L.C. Michelini is a research fellow from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: michelin@usp.br

Introduction

Baroreflex dysfunction, reflecting primarily an impairment in the vagal efferent component of the baroreceptor reflexes, is an important and common characteristic of arterial hypertension, closely related to sympathetic hyperactivity and activation of tissue and plasma renin-angiotensin systems (RAS), increased blood pressure variability, capillary rarefaction and end-organ damage, all of which lead to an increased mortality risk [1,2]. Reduced baroreflex sensitivity (BrS) and heart rate (HR) variability are strong predictors of cardiac mortality and have been used as prognostic tools not only in hypertensive subjects, but also in post-myocardial infarction and renal failure patients [1,3–5].

Several studies have shown that overactivity of tissue RAS increases angiotensin II availability, thereby activating nicotinamide adenine dinucleotide diphosphate (NADPH) oxidase and augmenting oxidative stress and the secretion of pro-inflammatory cytokines (PICs) [6–8]. Increased levels of PICs, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6, were identified in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and other autonomic brain areas of hypertensive and heart failure rats [9–11]. Studies have also shown that PVN PICs increase sympathoexcitatory activity [9,12] and that IL-6 microinjected into the nucleus tractus solitarius caused a pronounced reduction in BrS [13]. Central TNF- α inhibition reduced the expression of angiotensin type 1 receptor (AT₁R),