Laiali Jurdi El Chaar

**Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio
sobre o sistema renina-angiotensina em
núcleos autonômicos de ratos normotensos
e hipertensos**

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

São Paulo
2012

Laiali Jurdi El Chaar

**Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio
sobre o sistema renina-angiotensina em
núcleos autonômicos de ratos normotensos
e hipertensos**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelin

Versão original

São Paulo
2012

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

Chaar, Lalail Jurdil El.

Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina-angiotensina em núcleos autonômicos de ratos normotensos e hipertensos / Lalail Jurdil El Chaar. – São Paulo, 2011.

Orientador: Lisete Compagno Michelini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle Neural da Circulação / Fisiologia do exercício.

Versão do título para o Inglês: Sequential effects of aerobic training on the renin-angiotensin system in autonomic nuclei of normotensive and hypertensive rats

Descritores: 1. Treinamento aeróbio 2. Hipertensão 3. Sistema renina-angiotensina 4. PVN 5. NTS 6. RVL I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0210/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Laiali Jurdi El Chaar.

Título da Dissertação: Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina-angiotensina em núcleos autonômicos de ratos normotensos e hipertensos.

Orientador(a): Lisete Compagno Michelin.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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

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

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lima Prestes, 2416 - CEP. 08506-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7723 - telefex : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **36** nas fls. **68** 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 **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a expressão de diferentes componentes do sistema renina-angiotensina em vasos sanguíneos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Sebastião Donato Silva Junior, Thais Tessari Zampieri, Laiali Jurdi El Chaar, Tatiana Pereira Mendes, Adriana Ruggeri**, 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 EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)** em **08.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de abril de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEAA - ICB/USP

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e amigos que estiveram sempre comigo por onde andei...

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo que deu suporte a meus estudos desde a graduação e me proporcionou experiências únicas de intercâmbio entre Institutos e pessoas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa pelo apoio financeiro desde os tempos de iniciação, permitindo que nossas idéias se tornem experimentos.

À Prof^a. Lisete Compagno Michelinini que permitiu que eu fizesse minha iniciação científica e meu mestrado em seu laboratório.

À Prof^a. Luciana Venturini Rossoni, minha primeira professora de Fisiologia de quem recebi ensinamentos que vão muito além da teoria, verdades como a ética que levo comigo até hoje.

À Prof^a. Claudia Moreira dos Santos que é uma lição de vida para mim e de quem sempre lembrarei com extremo carinho.

A meus pais, Rajaa e Moufid, e irmãos, Maiassa, Chady e Omar, que desde sempre me incentivaram a seguir com a cabeça erguida mesmo com os obstáculos e de quem senti muitas saudades durante o tempo que me dediquei aos estudos.

Aos meus amigos de dança: Mariana Antonieta, Victor Braga, Matheus Moraes, Marvin Chambi, Márcio Rocha dos Santos, Renata Araujo, Thiago Collucci, Rogéria Silva, Leon Risso e tantos outros. Companheiros de viagens e de danças, meu muito obrigada pelos momentos felizes que me proporcionam sempre.

A todos os meus amigos e familiares que mesmo espalhados pelo Brasil e pelo mundo, levo em meu coração aonde quer que eu vá.

À Bruna Bosco Mello, Fernanda Reimberg, Sahar Mohammed El Malt e Élcio Pantaleão Ribeiro Junior, amigos de muitos anos que me viram aos prantos e risadas e sempre estiveram comigo pela caminhada.

À Juliana Magdalon e Vivian Paschoal, amigas de mestrado e futuras companheiras de doutorado pelo apoio e ombro amigo de sempre.

À Tatiana Pereira Alves e Álvaro Junior Martins Batista pelo companheirismo e ajuda durante os experimentos funcionais, análise e divulgação dos dados. Sem vocês não teria conseguido.

À Rosangela Eichler e Ana Maria Peracoli Campos, brilhantes pesquisadoras que foram fundamentais para a realização das técnicas de PCR e Imunofluorescência contidas neste trabalho, que sempre estiveram dispostas não só a tirar dúvidas, mas também apoiar em tudo.

\

A meus colegas e amigos de ICB pelas trocas de experiência nas disciplinas cursadas, congressos e experimentos.

Aos professores Maria Helena Catelli de Carvalho, Angelo Rafael Carpinelli, e Rui Curi por terem cedido seus laboratórios para a realização dos experimentos de Biologia Molecular contidos nesta dissertação.

Aos professores Martin Flanagan e Sara Joice Shammah Lagnado por terem cedido seus laboratórios para a realização dos experimentos de Imunofluorescência contidos nesta dissertação.

E a todos aqueles que um dia torceram por mim.

Obrigada!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

"Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades."

Gilberto Freyre

RESUMO

CHAAR, L. J. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina-angiotensina em núcleos autonômicos de ratos normotensos e hipertensos**. 2011, 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A hipertensão arterial encontra-se intimamente relacionada com hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA). Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que: a) a elevação da pressão arterial (PA) era acompanhada da ativação da angiotensina II plasmática e tecidual; b) a expressão de RNAm de angiotensinogênio e receptores AT_1 em áreas bulbares encontravam-se aumentadas na hipertensão induzida por coarctação e na hipertensão espontânea (SHR) em ratos; c) o treinamento aeróbio de baixa intensidade (T) de 12 semanas mostrou-se eficaz em reduzir a expressão de angiotensinogênio (Aogen) no núcleo do trato solitário (NTS) de SHR. Não há, no entanto, informações relativas aos efeitos seqüenciais do treinamento sobre a expressão de outros componentes do SRA bem como em outras áreas centrais de controle autonômico. No presente projeto avaliamos em SHR e seus controles normotensos (WKY) a seqüência temporal dos efeitos do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre: 1) as respostas funcionais (pressão arterial, PA e frequência cardíaca, FC), 2) a expressão de RNAm de Aogen e receptores AT_1 (AT_1R) nos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN), do trato solitário (NTS) e na região rostro-ventrolateral do bulbo (RVL), 3) a expressão protéica de Aogen e AT_1R nos mesmos núcleos. Ratos WKY e SHR, com 3 meses, foram submetidos a T (50-60% da capacidade máx.; 5 dias/sem; 1 h/dia) ou mantidos sedentários (S) por 0, 1, 2, 4, 8 ou 12 semanas. Nos diferentes tempos experimentais os ratos foram cateterizados para o registro da PA e FC basais, e, a seguir perfundidos com salina (coleta de 'punches' do PVN, NTS e RVL para se determinar a expressão do Aogen e AT_1R pelo RT-PCR em tempo real) ou PFA 4% (cortes seqüenciais das áreas de interesse para Imunofluorescência para Aogen e AT_1R com co-localização de NeuN em neurônios). SHR (vs WKY) apresentaram PA e FC elevadas (174 ± 2 vs 123 ± 2 mmHg; 385 ± 7 vs 326 ± 4 b/min) e maior expressão gênica de AT_1R no NTS (+67%, $p < 0,05$). T aumentou a capacidade física e causou bradicardia de repouso em ambos os grupos, mas a PA foi reduzida apenas nos SHR (queda de 6,5% de T_8 à T_{12} , $p < 0,05$). Nos SHR, T reduziu a expressão de RNAm do Aogen no PVN (-34% em T_2) e NTS (-30% em T_4), reduzindo também a expressão de RNAm de AT_1R apenas em T_{12} (-56% e -39%, respectivamente para PVN e NTS). Nos WKY, T determinou redução da expressão gênica de Aogen e AT_1R no RVL a partir de T_8 (-49% e -58%, respectivamente). A imunofluorescência para Aogen e AT_1R indicou a localização destas proteínas no PVN, NTS e RVL, confirmando qualitativamente as alterações de conteúdo induzidas pelo T em SHR e WKY. Em síntese, nossos dados indicam que a queda de PA e a instalação da bradicardia de repouso (efeitos benéficos do treinamento aeróbio de baixa intensidade) são progressivos e aparecem mais precocemente nos SHR que nos WKY. Além disso, são acompanhadas/ precedidas de redução da expressão gênica e protéica de Aogen no PVN e NTS dos SHR e da redução da expressão gênica e protéica de Aogen e AT_1R no RVL dos WKY, as quais contribuem para a adaptação dos parâmetros cardiovasculares induzida pelo exercício repetitivo.

Palavras-chave: Treinamento aeróbio. Hipertensão. Sistema renina-angiotensina. PVN. NTS. RVL.

ABSTRACT

CHAAR, L. J. **Sequential effects of aerobic training on the renin-angiotensin system in autonomic nuclei of normotensive and hypertensive rats.** 2011. 89 p. Masters thesis (Human Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Hypertension is closely related to hyperactivity of the renin-angiotensin system (RAS). Previous data from our laboratory showed that: a) the elevation of blood pressure (BP) was accompanied by activation of plasma and tissue angiotensin II b) mRNA expression of angiotensinogen and AT₁ receptors in bulbar areas were increased in hypertension induced by aortic coarctation and in spontaneously hypertensive rats (SHR), c) the low-intensity aerobic training (T) for 12 weeks was effective in reducing the expression of angiotensinogen (Aogen) in the nucleus of the solitary tract (NTS) of SHR. There is no, however, information regarding the sequential effect of training on the expression of other components of the RAS, as well as in other areas involved in the central autonomic control. In this project, we evaluate in SHR and their normotensive controls (WKY) time-course changes of low intensity aerobic training on: 1) the functional responses (blood pressure, BP and heart rate, HR), 2) the expression of Aogen and AT₁ receptor (AT₁R) mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), in the nucleus of solitary tract (NTS) and in rostroventrolateral region of the medulla (RVLM), 3) the protein expression of AT₁R and Aogen in the same areas. Male WKY and SHR, aged 3 months, were trained T (50-60% of maximal exercise capacity, 5 days / wk, 1 h / day) or kept sedentary (S) for 0, 1, 2, 4, 8 or 12 weeks. At the different experimental times rats were cannulated for baseline BP and HR recordings and then perfused with saline (collection of 'punches' the PVN, NTS and RVLM to determine the expression of Aogen and AT₁R by real time RT-PCR) or 4% PFA (sequential sections of areas of interest for Aogen and AT₁R immunofluorescence with NeuN co-localization). SHR (vs. WKY) had high BP and HR (174 ± 2 vs 123 ± 2 mmHg, 385 ± 7 vs 326 ± 4 b/min) and increased gene expression of AT₁R in the NTS (+67%, $p < 0.05$). T increased physical capacity and caused bradycardia at rest in both groups (T₄ in the SHR, T₈ in the WKY), but the BP was reduced only in SHR (fall of 6.5% from T₈ to T₁₂, $p < 0.05$). In the SHR, T reduced the expression of Aogen mRNA within the PVN (-34% in T₂) and NTS (-30% in T₄), but AT₁R mRNA expression was reduced only in T₁₂ (-56% and -39%, respectively for PVN and NTS). In WKY, T caused decrease of both Aogen and AT₁R gene expression in the RVLM (-49% and -58% respectively, at T₈). In brain slices immunofluorescence for Aogen and AT₁R indicated the location of these proteins in the PVN, NTS and RVLM, confirming qualitatively the mRNA content changes induced by T in SHR and WKY. In summary, our data indicate that the fall of BP and the installation of bradycardia at rest (the beneficial effects of low intensity aerobic training) are progressive and appear earlier in SHR than in WKY. Moreover, they are accompanied / preceded by reduced gene and protein expression of Aogen in the NTS and PVN of the SHR and reduced gene and protein expression of AT₁R and Aogen in RVLM of WKY, which contribute to the adaptive changes of cardiovascular parameters induced repetitive exercise.

Key words: Exercise training. Hypertension. Renin-angiotensin system. PVN. NTS. RVLM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das vias do reflexo central do controle do sistema nervoso autônomo cardiovascular.....	22
Figura 2. Desempenho na esteira durante testes máximos dos grupos WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	44
Figura 3. Comparação do ganho de desempenho (semana 12 – semana 0) nos grupos SHR e WKY ao final dos protocolos.....	45
Figura 4. Alteração ao longo do tempo dos valores basais de pressão arterial média (PAM) em WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	45
Figura 5. Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM) nos grupos WKY e SHR ao final dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	47
Figura 6. Alteração dos valores basais de frequência cardíaca (FC) em WKY e SHR ao longo dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	48
Figura 7. Comparação dos valores basais de frequência cardíaca (FC) nos grupos WKY e SHR ao final dos protocolos experimentais de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	49
Figura 8. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT ₁ R (C e D) no PVN de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	51
Figura 9. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT ₁ R (B) no PVN de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S12) ou treinamento (T12).....	52
Figura 10. Imunofluorescência na região do PVN (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna à esquerda) e SHR (coluna à direita).....	53
Figura 11. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	54
Figura 12. Imunofluorescência na região do PVN (400x) para AT ₁ R (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0 e T12) em WKY (coluna à esquerda) e SHR (coluna à direita).....	55
Figura 13. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para AT ₁ R (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	56
Figura 14. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT ₁ R (C e D) no NTS de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	58

Figura 15. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT ₁ R (B) no NTS de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S) ou de treinamento (T).....	59
Figura 16. Imunofluorescência na região do NTS (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).....	60
Figura 17. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	61
Figura 18. Imunofluorescência na região do NTS (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).....	62
Figura 19. Imunofluorescência em maior ampliação na região do NTS para AT ₁ R (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	63
Figura 20. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT ₁ R (C e D) no RVL de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	64
Figura 21. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT ₁ R (B) no NTS de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S) ou de treinamento (T).....	65
Figura 22. Imunofluorescência na região do RVL (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).....	66
Figura 23. Imunofluorescência em maior ampliação na região do RVL para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	67
Figura 24. Imunofluorescência na região do RVL (400x) para AT ₁ R (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).....	68
Figura 25. Imunofluorescência em maior ampliação na região do RVL para AT ₁ R (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais.....	32
Tabela 2. Sequência de primers para HPRT, Angiotensinogênio e receptor AT ₁ para RT-PCR em Tempo.....	39
Tabela 3. Desempenho na esteira (km/h) durante testes máximos nas semanas 0, 6 e 12 em WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	45
Tabela 4. Alteração ao longo do tempo dos valores basais de PAM em WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	47
Tabela 5. Alteração sequencial dos valores basais de FC em WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	49
Tabela 6. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT ₁ R (C e D) no PVN de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	51
Tabela 7. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen e AT ₁ R no NTS de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	58
Tabela 8. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen e AT ₁ R no RVL de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
Aogen	Angiotensinogênio
Aogen	Angiotensinogênio
AP	Área postrema
AT _{1a}	Receptor angiotensinérgico do subtipo Ia
AT ₁ R	Receptor angiotensinérgico do subtipo I
AT2	Receptor angiotensinérgico do subtipo II
CC	Canal central
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Ct	<i>“Threshold”</i>
CVL	Região caudo ventrolateral do bulbo
dATP	DesoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	DesoxiCitidina Trifosfatada
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	DesoxiGuanosina Trifosfatada
DMV	Dorsal motor do vago
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dTTP	DesoxiTimidina Trifosfatada
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FC	Frequência cardíaca
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
IML	Coluna intermédio lateral da medula espinhal
MAS	Receptor MAS
NA	Núcleo ambíguo
NO	Óxido nítrico
NTS	Núcleo do trato solitário

PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RAS	Renin angiotensina system
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
RVL	Região rostro ventrolateral do bulbo
RVLM	Rostral ventrolateral medulla
S ₀	Sedentário por 0 semanas
S ₁₂	Sedentário por 12 semanas
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SRA	Sistema renina-angiotensina
T ₁	Treinado por 1 semana
T ₂	Treinado por 2 semanas
T ₄	Treinado por 4 semanas
T ₈	Treinado por 8 semanas
T ₁₂	Treinado por 12 semanas
T	Treinamento aeróbio
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio
WKY	Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 Controle neural do sistema cardiovascular e o sistema renina-angiotensina...	20
1.2 Sistema renina-angiotensina e hipertensão.....	24
1.3 O treinamento aeróbio na prevenção e tratamento da hipertensão.....	26
1.4 O treinamento aeróbio e o sistema renina-angiotensina.....	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais experimentais.....	32
3.1.1 Grupos experimentais.....	32
3.2 Adaptação a esteira, testes de esforço máximo e treinamento aeróbio...32	
3.3 Confeção e implantação das cânulas arteriais	34
3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	35
3.5 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em Tempo Real.....	35
3.5.1 Coleta do tecido encefálico.....	35
3.5.2 Extração do RNA total.....	36
3.5.3 Síntese do cDNA	37
3.5.4 Escolha do gene constitutivo.....	37
3.5.5 Padronização das reações e dos primers.....	38
3.5.6 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT- PCR).....	39
3.5.7 Cálculo da expressão gênica.....	40
3.6 Imunofluorescência.....	41
3.6.1 Coleta do tecido encefálico.....	41
3.6.2 Pós-fixação do encéfalo	41
3.6.3 Cortes coronais dos núcleos autonômicos.....	41
3.6.5 Pré-tratamento dos cortes.....	42
3.6.5 Reação de imunofluorescência.....	42
3.7 Análise estatística dos dados.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Efeitos do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira nos grupos WKY e SHR.....	44

4.2 Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a PAM e FC.....	46
4.3 Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a expressão gênica e protéica de Aogen e do receptor AT ₁ em áreas de controle autonômico.....	50
4.3.1 Efeitos no PVN.....	50
4.3.1.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT ₁ R.....	50
4.3.1.2 Localização protéica de Aogen e AT ₁ R no PVN.....	52
4.3.2 Efeitos no NTS.....	57
4.3.2.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT ₁ R.....	57
4.3.2.2 Localização protéica de Aogen e AT ₁ R no NTS.....	59
4.3.3 Efeitos no RVL.....	64
4.3.3.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT ₁ R.....	64
4.3.3.2 Localização protéica de Aogen e AT ₁ R no RVL.....	65
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A hipertensão arterial é uma doença complexa e multifatorial, de alta incidência, atingindo 15-20% da população adulta e mais de 50% da população idosa (LOUTZENHISER; BIDANI; CHILTON, 2002; MANCIA; GRASSI, 1998; MUNTNER et al., 2002; SMIDT et al., 2005; TAYLOR et al., 2007; WHELTON et al., 2002). A hipertensão é caracterizada pela elevação da pressão arterial (PA) para valores acima de 140/90 mmHg de PA sistólica e diastólica, respectivamente (CHOBANIAN et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Além disso, a hipertensão está associada à alta morbidade e mortalidade e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas, como o infarto do miocárdio, a arteriosclerose, a doença coronariana crônica, a doença arterial periférica, o acidente vascular cerebral e a insuficiência renal crônica, razão pela qual tem sido bastante estudada nas últimas décadas (LOUTZENHISER; BIDANI; CHILTON, 2002; MANCIA; GRASSI, 1998; MUNTNER; ROCCELLA; WHELTON, 2002). Segundo estimativas de órgãos internacionais e do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são as causas de morte mais freqüente da população (LOUTZENHISER; BIDANI; CHILTON, 2002; MANCIA; GRASSI, 1998; MUNTNER; ROCCELLA; WHELTON, 2002). Apenas uma pequena porcentagem de hipertensos desenvolve hipertensão secundária, de etiologia conhecida, enquanto que a grande maioria dos hipertensos (entre 90-95%) não apresenta etiologia conhecida, sendo a hipertensão classificada como primária ou essencial (CARRETERO; OPARIL, 2000; FOLKOW, 1982; HARRAP, 1988; WILLIAMS, 1994;).

Já é conhecido que independentemente da etiologia, a fase crônica da hipertensão é mantida principalmente por um aumento na resistência periférica total, com débito cardíaco próximo dos valores normais (GUYTON et al.; 1995). Também foi proposto que a hipertensão é caracterizada por várias anormalidades na microcirculação de tecidos, tais como o aumento da razão parede/luz arteriolar e diminuição da densidade de vasos, e por hiperatividade do sistema nervoso simpático que altera o controle vasomotor, os quais contribuem para a manutenção de uma resistência periférica total elevada (AMARAL; MICHELINI, 2011; CHENG; DASKALAKIS; FALKNER, 2010; INTENGRAN; SCHIFFRIN, 2000; LAURENT; BRIET; BOUTOUYRIE; 2005; MARTINEZ-LEMON; HILL; MRININGER, 2009; MULVANY, 2002; 2009; YASMIN; SHAUGHNESSY, 2008).

A hiperatividade do SRA também tem sido indicada como um dos principais fatores determinantes no desenvolvimento e/ou na manutenção da hipertensão (BUNNEMANN et al., 1992; FERRARIO, 2006; GIRONACCI et al., 2007; LI et al., 2008; REID, 1992; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004).

1.1 Controle neural do sistema cardiovascular e o sistema renina-angiotensina

São muitos os mecanismos que contribuem para manter a PA constante, sendo didaticamente agrupados em duas grandes classes: 1) regulação a curto e médio prazo, ou regulação momento a momento da PA, a qual inclui os mecanismos neurais e hormonais comandados pelos barorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares e outros receptores, e; 2) regulação a longo prazo, que envolve a regulação da volemia e do leito vascular (MICHELINI, 2008).

Os barorreceptores arteriais, localizados na aorta e na bifurcação das carótidas, são os principais responsáveis pela regulação reflexa momento a momento da PA. Com a variação cíclica da pressão intravascular, a parede do vaso se deforma, estimulando os barorreceptores nela localizados (mecanorreceptores), gerando potenciais de ação que são conduzidos ao núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo dorsal, através de neurônios aferentes. No NTS, neurônios de segunda ordem distribuem estas informações à núcleos bulbares de integração primária que determinam a ativação dos nervos autonômicos parassimpáticos e simpáticos, bem como a liberação de diferentes hormônios.

Parte dos neurônios de segunda ordem do NTS projeta-se e excita o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e o núcleo ambíguo (NA), onde se localizam os corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração. Estes quando estimulados aumentam o tônus vagal para este órgão e reduzem a FC. Ao mesmo tempo, outros neurônios de segunda ordem do NTS projetam-se e excitam a região caudo ventrolateral do bulbo (CVL) que contém neurônios GABAérgicos que se projetam e inibem a região rostro ventrolateral do bulbo (RVL). No RVL situam-se neurônios pré-motores simpáticos que se projetam aos neurônios pré-ganglionares na coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML), os quais fazem sinapse com os neurônios pós-ganglionares que inervam coração e vasos (MICHELINI, 2008, Figura 1). Simultaneamente à ativação parassimpática, há também redução do tônus simpático ao coração e vasos. Este é o chamado arco-reflexo básico ou alça primária do controle cardiovascular.

Além da alça primária do controle cardiovascular, outros circuitos suprabulbares integram e modulam o controle reflexo da circulação (DAMPNEY, 1994; MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI; STERN, 2009). As informações aferentes que chegam ao NTS também são direcionadas e ascendem, via neurônios catecolaminérgicos, a áreas de modulação suprabulbares, em especial o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (KALIA et al., 1985a,b,c; SAWCHENKO; SAWSON, 1981).

O PVN é uma importante região autonômica de integração de respostas vegetativas, comportamentais e hormonais (DAMPNEY, 1994; PALKOVITS, 1980; SAWCHENCKO; SWANSON, 1982), desempenhando papel na modulação do barorreflexo e na gênese do tônus simpático (PATEL; SCHIMID, 1988).

Os neurônios catecolaminérgicos ascendentes do bulbo ao hipotálamo projetam-se a diferentes grupamentos neuronais do PVN, fazendo sinapse com neurônios magnocelulares do PVN, que se projetam à neurohipófise e estão envolvidos na secreção de ocitocina e vasopressina plasmáticas. Além disso, os neurônios catecolaminérgicos projetam-se também a neurônios parvocelulares ocitocinérgicos e vasopressinérgicos pré-autonômicos, que por sua vez se projetam ao NTS, DMV, NA e RVL, além da IML (BUIJS et al., 1978; NILAVER et al., 1980; SAWSON, 1982; SOFRONIEW; SCRELL, 1981; SAWCHENKO) e estão envolvidos na modulação do controle autonômico do coração e vasos, os efetores do sistema cardiovascular.

Este circuito neuronal (NTS/CVL → PVN → NTS/DMV/NA/RVL) constitui a chamada alça secundária ou suprabulbar de modulação do controle cardiovascular, cuja função é realizar ajustes finos da regulação bulbar, ajustando o controle autonômico e a resposta circulatória a diferentes situações funcionais e patológicas, como, por exemplo, o exercício físico e a hipertensão (MICHELINI, 2007a,b MITCHELL, 1990; ROWELL, 1992; ROWELL; O' LEARY, 1990).

Figura 1. Representação esquemática das vias do reflexo central do controle do sistema nervoso autônomo cardiovascular.

NTS: núcleo do trato solitário; RVL: bulbo rostral lateral; SNA: sistema nervoso autônomo. As setas direcionadas às áreas bulbares representam a modulação supra-bulbar do reflexo barorreceptor.

FONTE: Figura adaptada (MICHELIN; MORRIS, 1999).

Além das respostas neurais, os barorreceptores controlam ainda a liberação de vários hormônios plasmáticos como as catecolaminas, a angiotensina II, a aldosterona, a vasopressina e a ocitocina, que atuam como coadjuvantes na manutenção dos níveis basais de PA (MICHELINI, 2008).

Classicamente, o SRA corresponde a um complexo sistema hormonal regulador de várias funções biológicas, destacando-se o controle da PA e do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo (CROWLEY et al., 2006). A ativação do SRA plasmático inicia-se com a liberação da renina, uma enzima proteolítica sintetizada e estocada nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais e liberada para a circulação frente a estímulos específicos. Dentre os principais estímulos para a liberação de renina citam-se a queda da pressão de perfusão da arteríola aferente, redução da carga filtrada de sódio e estimulação simpática. A liberação da renina, constituindo-se na primeira etapa da cascata bioquímica da síntese das diferentes angiotensinas e é estritamente controlada. Sua ação é altamente específica ao seu substrato, o angiotensinogênio (Aogen, uma alfa2 globulina plasmática sintetizada no fígado e liberada para a circulação). O Aogen é clivado pela renina liberando o

decapeptídeo angiotensina I, que por perda de dois aminoácidos terminais é convertido no octapeptídeo angiotensina II (Ang II), sendo esta conversão catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A cascata bioquímica do SRA leva também à formação de outros peptídeos com seqüências menores de aminoácidos como a angiotensina III, a angiotensina IV e a angiotensina 1-7 (Ang 1-7), que têm também ações biológicas periféricas e centrais. A Ang 1-7, por exemplo, é sintetizada pela ação da ECA 2, apresentando ações biológicas sistêmicas opostas às da Ang II. Enquanto a Ang II possui ação vasoconstritora, proliferativa e trófica, a ação da Ang-1-7 é vasodilatadora, antiproliferativa e antitrófica, contribuindo para um balanço adequado entre os efeitos de aumento e diminuição dos níveis de pressão do SRA. Este balanço é de extrema importância, uma vez que desequilíbrios com predominância da Ang II em detrimento da Ang 1-7 podem conduzir a diferentes doenças cardiovasculares, como, por exemplo, a hipertensão arterial (VARAGIC et al., 2008).

A Ang II, o principal efector do SRA, tem suas ações mediadas pelos receptores AT_1 e AT_2 (VARAGIC et al., 2008). O receptor AT_1 (AT_1R) é altamente expresso nos diferentes tecidos, exercendo um importante papel no controle da função cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico. Agindo via receptores AT_1 , a Ang II potencializa o simpático, induz vasoconstrição, remodelamento da matriz extracelular, promove a retenção de sódio e água, facilita diferentes ações do sistema nervoso central, além de induzir a proliferação celular, a inflamação e a coagulação (KEIDAR; KAPLAN; GAMLIEL-LAZAROVICH, 2007). Por outro lado, a Ang II, agindo em receptores AT_2 (altamente expressos na vida fetal, mas presentes em pequena densidade em alguns tecidos do indivíduo adulto), induz vasodilatação e liberação de óxido nítrico e bradicinina, exercendo um papel protetor do sistema cardiovascular. Estudos recentes têm demonstrado que efeitos do AT_2R , localizado centralmente, também podem contribuir no controle cardiovascular (STECKELINGS; OBERMULLER; BOTTARI, 2005). Frente à maior densidade dos AT_1R , o principal efeito da Ang II é, portanto, o de aumentar a volemia e a PA. Por sua vez, a Ang 1-7 agindo em receptor MAS (SANTOS, 2003) facilita a função endotelial, aumentando os níveis de NO e reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, o que contribui para a redução da PA.

Em adição ao clássico SRA circulante, o desenvolvimento de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia celular e molecular evidenciou

a existência de SRA completamente operacional em diferentes tecidos como o coração, os rins, os vasos sanguíneos e, inclusive, o cérebro (FERRARIO et al., 1997, 2006). Diversos componentes do SRA como Aogen, ECA, ECA2, catepsina, tonina, Ang II, Ang 1-7 e receptores AT₁, AT₂ e MAS já foram detectados no tecido encefálico (CAMPBELL; HABENERI, 1986; DZAU et al., 1987, 1988). Evidências experimentais recentes têm indicado o envolvimento dos SRA em diferentes tecidos na homeostase cardiovascular, e, no caso de hiperatividade destes, no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca (OBATA et al., 2000; TOUYZ, 2005).

1.2 Sistema renina-angiotensina e hipertensão

O SRA plasmático e o SRA tecidual desempenham papéis fundamentais na regulação cardiovascular, protegendo o organismo contra quedas da PA e redução da volemia. No entanto, quando ativados em excesso contribuem para o estabelecimento/manutenção da hipertensão arterial e de outras patologias cardiovasculares (BUNNEMANN et al., 1992; COX; BISHOP, 1991; FERRARIO et al., 2006; HOFFMAN; PHILLIPS; SCHMID, 1977; MCKINLEY et al., 2003; MORISHITA, 2000; NISHIMURA, 1992; RE, 1987; 2001; 2004; REID et al., 1992; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004; SINGH; MEHTA, 2003; STECKELINGS et al., 1992).

Há aumento significativo de todos os componentes do SRA, e em especial da Ang II, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR, um modelo animal para estudo da hipertensão espontânea ou primária no homem) quando comparados a controles normotensos (WKY) de mesma idade e sexo (LI et al., 2008; VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003). Além disto, a Ang II é o peptídeo do SRA que predomina no coração, rins e cérebro na hipertensão induzida por coarctação da aorta (GIRONACCI et al., 2007; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004), SHR e outros modelos de hipertensão (BUNNEMANN et al., 1992; FERRARIO, 2006; REID, 1992). Isto sugere a maior participação da Ang II nos mecanismos desencadeantes da hipertensão nestes modelos experimentais. Também no sistema nervoso central de hipertensos predominam as ações da Ang II, determinando, dentre outros efeitos, o aumento acentuado do simpático, a depressão do funcionamento do reflexo barorreceptor, a liberação aumentada de vasopressina

pela neurohipófise e a indução da sede (DIBONA et al., 1995; GAO et al., 2005; MCKINLEY et al., 2003; SANTOS et al., 1995; 1998).

Trabalhos utilizando o modelo de hipertensão por coarctação subdiafragmática da aorta demonstraram que a elevação da PA era acompanhada por ativação da Ang II plasmática e tecidual, com intensa depressão do controle reflexo da frequência cardíaca (MICHELINI; OLIVEIRA; SANTOS, 1992; SANTOS et al., 1995) e controle reflexo do simpático periférico (BEZERRA et al., 2001). Estes déficits eram causados por prejuízo da sinalização aferente pelos barorreceptores, a qual caracteriza-se por aumento da variabilidade e redução do ganho do nervo depressor aórtico (SANTOS et al., 1998) e por prejuízo da integração central no NTS (MICHELINI; BONAGAMBA, 1990). Em conjunto, estes fatores determinavam intensa hipertonía simpática para a periferia e predomínio simpático sobre a atividade vagal do coração (BEZERRA et al., 2001). Interessantemente todos estes efeitos da coarctação eram mediados pela maior disponibilidade de Ang II plasmática e tecidual e não pela elevação da PA *per se* porque foram completamente revertidos quando a hipertensão por coarctação desenvolveu-se em presença de bloqueio crônico dos receptores AT₁ com losartan (BEZERRA et al., 2001; SANTOS et al., 1995; 1998).

As alterações cardiovasculares observadas na hipertensão por coarctação encontravam-se correlacionadas com o aumento da expressão de RNAm de angiotensinogênio (Aogen) e do receptor AT_{1a} em áreas bulbares de controle cardiovascular (SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004). Além disto, tanto os efeitos funcionais quanto o aumento da expressão de RNAm do Aogen e do AT₁ induzidos pela hipertensão foram completamente bloqueados pelo tratamento crônico com losartan (BEZERRA et al., 2001; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004; SANTOS et al., 1995, 1998). Foi observado também que o tratamento crônico com losartan reduzia significativamente a expressão basal de RNAm do Aogen encefálico, resultando em hipoatividade de todo o SRA encefálico, a qual foi acompanhada da correção de várias disfunções cardiovasculares induzidas pela hipertensão por coarctação (BEZERRA et al., 2001; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004; SANTOS et al., 1995; 1998). Dados da literatura também mostraram que a injeção intracerebroventricular de inibidores da ECA amenizava a hipertensão de ratos SHR (PHILLIPS; KIMURA, 1988; TAKAHASHI et al., 1991).

Estes trabalhos em conjunto indicam claramente que o estabelecimento da hipertensão arterial é acompanhado de hiperatividade do SRA em diferentes tecidos periféricos, e em especial no tecido encefálico, em que níveis endógenos elevados de Ang II determinam hipertonia simpática a qual, por sua vez, perpetua a hipertensão. Indicam também que a redução dos níveis de PA encontra-se associada à redução da atividade do SRA (SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004; VEERASINGHAM et al., 2003).

1.3 O treinamento aeróbio na prevenção e tratamento da hipertensão

A redução da PA de indivíduos hipertensos reduz a morbidade e mortalidade, melhorando substancialmente a qualidade de vida (CHOBANIAN et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004). O tratamento clássico da hipertensão inclui diversas terapias farmacológicas como o uso de diuréticos, simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais de cálcio, e diferentes inibidores do SRA, como os inibidores da renina e da ECA, além de bloqueadores dos receptores AT₁ da Ang II (CHOBANIAN et al., 2003; PAULIS; UNGER, 2010).

Observações recentes também têm indicado que, além da terapia com fármacos, o tratamento da hipertensão deve incluir modificações no estilo de vida, dentre as quais se destacam a restrição da ingestão de sal e álcool, a perda de peso corporal, e principalmente a realização de atividade física regular (CHOBANIAN et al., 2003; CLÉROUX; FELDMAN; PETRELLA, 1999; PESCATELLO et al., 2004). Realmente, o sedentarismo aparece em estatísticas brasileiras como fator de risco freqüente de diversas doenças cardiovasculares como hipertensão, diabetes, doenças coronarianas, cerebrais e renais (DUNCAN et al., 1993). Por outro lado, a prática regular de exercícios físicos apresenta diversos efeitos benéficos para a saúde, o que tem sido extensivamente confirmado pela literatura experimental (AMARAL; MICHELINI, 2011; SMIDT et al., 2005; TAYLOR et al., 2007) e clínica (CHOBANIAN et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004). Diversos estudos têm demonstrado que quanto maior o nível de aptidão física, menor o risco cardiovascular (BLAIR et al., 1995; CHOBANIAN et al., 2003).

O treinamento aeróbio de baixa à moderada intensidade (TF) tem sido amplamente indicado como terapia coadjuvante à terapia farmacológica no tratamento da hipertensão e de outras doenças crônicas. A prática regular de

exercícios físicos induz adaptações vasculares e cardíacas que aumentam a capacidade funcional do sistema cardiovascular e reduzem a PA. De fato, vários estudos populacionais têm demonstrado a potencialidade do exercício aeróbio regular em reduzir a PA de hipertensos (CHOBANIAN et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004). No entanto, a magnitude da redução da PA parece ser dependente da intensidade do exercício. Demonstrou-se que o treinamento de baixa a moderada intensidade (até 65% do VO_2 max) apresenta grande eficiência em reduzir os níveis pressóricos, enquanto os exercícios de alta intensidade (>85% VO_2 max) não promovem redução significativa da PA (GAVA et al., 1995; PESCATELLO et al., 2004; VÉRAS-SILVA et al., 1997).

Trabalhos experimentais e clínicos utilizando o treinamento aeróbio de baixa intensidade têm demonstrado a eficiência desta terapêutica não-farmacológica em não só reduzir os níveis pressóricos, mas também reverter ou diminuir muitos dos déficits cardiovasculares induzidos pela hipertensão (AMARAL et al., 2000; 2001; 2008; AMARAL; MICHELINI, 2011; CHOBANIAN et al., 2003; COIMBRA et al., 2008; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; PESCATELLO et al., 2004; VÉRAS-SILVA et al., 1997). Dentre os ajustes cardiovasculares benéficos que condicionam a queda da PA em hipertensos, citam-se: 1) redução da frequência e/ou débito cardíaco, associados ao remodelamento do coração (CLAUSEN, 1977; TIPTON et al., 1999; VÉRAS-SILVA et al., 1997); 2) redução da resistência vascular periférica associada à redução da razão parede/luz de arteríolas e à redução da resistência muscular esquelética (AMARAL; MICHELINI, 2011; AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003); 3) aumento da condutância da microcirculação, representada pela angiogênese capilar (AMARAL et al., 2000; 2008; COIMBRA et al., 2008; FRANÇA; MICHELINI, 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; MICHELINI, 2001) e pela neoformação de vênulas em músculos exercitados (AMARAL et al., 2001; AMARAL; MICHELINI, 2011; FRANÇA; MICHELINI, 2001); 4) predominância de fatores relaxantes sobre os contráteis derivados do endotélio (HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004); 5) redução da resistência à insulina (MIKINES et al., 1989); 6) alteração do balanço autonômico, com redução do tônus simpático e facilitação do tônus vagal (BURGER et al., 1998; DI CARLO; BISHOP, 1992; GRASSI et al., 1994; MICHELINI, 2007a). Mesmo nos indivíduos normotensos, em que o treinamento aeróbio não é acompanhado de queda da PA, há uma importante alteração no balanço autonômico ao coração e vasos,

acompanhada de angiogênese em músculos exercitados (AMARAL et al., 2000, 2001, 2008; COIMBRA et al., 2008; FRANÇA; MICHELINI, 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; MICHELINI, 2007a; MICHELINI; STERN, 2009).

Dentre os ajustes centrais que contribuem para melhora do controle autonômico da circulação citam-se: 1) aumento da sensibilidade do nervo depressor aórtico em sinalizar as alterações de PA ao NTS (BRUM et al., 2000); 2) aumento da sinalização noradrenérgica aferente a neurônios pré-autonômicos do PVN (HIGATANIGUCHI et al., 2007); 3) plasticidade neuronal em neurônios do PVN, caracterizada por aumento da ramificação dendrítica e da área de superfície (MICHELINI; STERN, 2009); 4) aumento da excitabilidade intrínseca de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do PVN que se projetam ao tronco cerebral (JACKSON et al., 2005); 5) facilitação da modulação ocitocinérgica e vasopressinérgica ao NTS e DMV (MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007; SOUZA et al., 2001); 6) redução do tônus simpático vasomotor (CERONI et al., 2009); 7) aumento do tônus vagal ao coração (HIGA et al., 2002; MICHELINI; STERN, 2009). Estes ajustes, por facilitarem o funcionamento das alças bulbar e suprabulbar, melhoram o controle autonômico da circulação, facilitando a redução da FC basal (em normotensos e hipertensos treinados) e a redução da atividade simpática periférica e a queda da PA (em hipertensos treinados). As alterações periféricas e centrais induzidas pelo treinamento aumentam a capacidade funcional do sistema cardiovascular.

1.4 O treinamento aeróbio e o sistema renina-angiotensina

Poucos são os estudos que se dedicaram a investigar os efeitos do treinamento aeróbio sobre a atividade do SRA plasmático e tecidual. Em um trabalho pioneiro Hespel et al. (1988) mostraram em adultos saudáveis que a atividade da renina plasmática correlacionava-se negativamente com o aumento da atividade física. Demonstrou-se também que a habilidade do treinamento em reverter déficits induzidos pela insuficiência associava-se a redução da hiperatividade do SRA (GADEMAN et al., 2007; KAR; GAO; ZUCKER, 2010; WAN, et al., 2007). A potencialidade do treinamento aeróbio em bloquear a hiperatividade do SRA cardíaco foi também observada na hipertensão espontânea (FERNANDES et al., 2011; GOMES FILHO et al., 2008).

Interessante foi a observação de que ratos hipertensos espontâneos submetidos ao treinamento aeróbio apresentavam muitos ajustes centrais similares aos atribuídos ao bloqueio crônico com losartan, como a redução de FC basal (MICHELINI et al., 1992; SANTOS et al., 1995; 1998), alteração do balanço autonômico com aumento do tônus vagal e redução do simpático cardíaco e periférico (BEZERRA et al., 2001; SANTOS et al., 1995), sugerindo a ativação de mecanismos similares pelo bloqueio do SRA e pelo treinamento. Uma hipótese provável é de que a redução dos níveis pressóricos subsequente ao treinamento aeróbio fosse devido à redução da atividade do SRA tecidual, em especial do SRA encefálico, de hipertensos. Mousa et al. (2008) já demonstraram o envolvimento do SRA encefálico na insuficiência cardíaca em coelhos e o treinamento aeróbio reduzia a expressão gênica e protéica de receptores AT_1 no RVL, melhorando os déficits cardiovasculares induzidos por esta patologia.

Nesta linha de raciocínio, trabalho de nosso laboratório também demonstrou que a queda da PA subsequente ao treinamento aeróbio de baixa intensidade era acompanhada de redução significativa da expressão do RNAm de Aogen em áreas bulbares de controle cardiovascular como o NTS e a área postrema, com correlação positiva entre a redução da expressão de Aogen e a queda da PA (FÉLIX; MICHELINI, 2007). Não observaram-se no entanto alterações significativas na expressão de receptores AT_{1a} nestas áreas bulbares nos hipertensos treinados (FÉLIX; MICHELINI, 2007). Interessante foi também a observação de que as alterações do SRA encefálico subsequentes ao treinamento aeróbio eram em tudo similares às descritas para a expressão do SRA encefálico nos hipertensos tratados com losartan (SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004), sugerindo que ambos, o treinamento aeróbio e o tratamento farmacológico, eram igualmente eficazes em reduzir a hiperatividade do SRA encefálico em hipertensos, reduzindo a expressão de seu precursor e contribuindo para a queda da PA observada. Não se sabe, no entanto, se os efeitos do treinamento sobre o SRA encefálico são restritos ao NTS ou ocorrem também em outras áreas importantes na modulação do controle cardiovascular como o PVN e RVL e, se outros componentes do SRA, além do Aogen, podem ser modulados pelo treinamento aeróbio de baixa intensidade. Também não se conhece a seqüência temporal com que estes eventos se instalam. É, portanto, nossa proposição neste trabalho investigar os efeitos seqüenciais do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre a expressão gênica e protéica de

diferentes componentes do SRA em diferentes áreas cerebrais envolvidas com o controle autonômico do sistema cardiovascular.

2 OBJETIVOS

Utilizando-se ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (WKY), submetidos a treinamento aeróbio de baixa intensidade ou sedentarismo, objetivou-se avaliar os efeitos sequenciais do treinamento em diferentes componentes do SRA encefálico em áreas de controle autonômico, como o PVN, NTS e RVL.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliar os efeitos sequenciais do treinamento (semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 12) e sedentarismo sobre os valores basais de PA e FC (estudos funcionais);
- 2) Determinar no bulbo dorsal (DBS, abrangendo o NTS e DMV e área postrema), bulbo ventral (VBS, abrangendo o RVL) e hipotálamo (englobando o PVN) a expressão de RNAm para Aogen e receptores AT₁R, utilizando-se da técnica de RT-PCR em Tempo Real;
- 3) Identificar por imunofluorescência a expressão de Aogen e AT₁R e a localização destes nas diferentes áreas de controle autonômico, utilizando a dupla marcação com NeuN para identificação dos núcleos de neurônios;
- 4) Comparar ao longo do tempo as alterações funcionais com as alterações na expressão do SRA encefálico induzidas pelo treinamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR), provenientes do Biotério Central ICB/USP, com 2 meses de idade, e pesando entre 170-200g no início dos protocolos. Os ratos foram alojados em caixas Plexiglas (4-5 por caixa) e mantidos em ciclo de claro/escuro 12h/12h, com controle da temperatura ambiental (21-22 °C), ração e água fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Ciência Biomédicas em 22.09.09 cujo protocolo foi registrado sob nº 118 nas fls. 75 do livro 02 com validade de 3 anos.

3.1.1 Grupos experimentais

Para avaliar as alterações seqüenciais induzidas pelo treinamento nos parâmetros funcionais na expressão gênica e protéica do SRA nas diferentes áreas cerebrais, WKY e SHR sedentários e treinados foram avaliados em diferentes tempos experimentais: no início (semana 0 – S₀), durante o treinamento (semanas 1, 2, 4 e 8 – T₁, T₂, T₄ e T₈) e ao final dos protocolos (semana 12 – S₁₂ e T₁₂). Foram, portanto, utilizados 14 grupos experimentais.

Tabela 1. Grupos experimentais.

Grupos Sedentários		Grupos Treinados	
WKY _S	SHR _S	WKY _T	SHR _T
WKY S ₀	SHR S ₀	WKY T ₁	SHR T ₁
		WKY T ₂	SHR T ₂
		WKY T ₄	SHR T ₄
		WKY T ₈	SHR T ₈
WKY S ₁₂	SHR S ₁₂	WKY T ₁₂	SHR T ₁₂

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

3.2 Adaptação à esteira, testes de esforço máximo e treinamento aeróbio

Os animais foram previamente selecionados pela habilidade de andar/correr em esteira ergométrica programável (KT 3000, Inbramed, Porto Alegre, R. S., Brasil) adaptada para ratos com raias de alumínio e tampão de acrílico, pintadas na parte anterior de preto, criando um ambiente que atrai os ratos durante a corrida e propicia que o treinamento seja realizado sem a necessidade do uso de choques elétricos.

Foi realizada uma fase inicial de adaptação à esteira (1-2 semanas, 5-10 minutos por dia, com velocidades baixas variando de 0,3 a 0,6 km/h e zero grau de inclinação). Após esta fase de adaptação, foi realizado o primeiro teste de esforço máximo, na esteira ergométrica, que serviu de base para separação dos animais WKY e SHR nos grupos de sedentários (S) e treinados (T), mantendo-se a mesma média de velocidade máxima entre os grupos. Foram excluídos dos protocolos os ratos que não correram.

Os ratos foram submetidos a 3 testes máximos na esteira ergométrica programável. O teste era iniciado com velocidade de 0,3 km/h, com aumentos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do rato, indicada pelo momento em que ele não consegue mais correr. O primeiro teste, no início do protocolo de treinamento, foi utilizado para determinar a capacidade aeróbia de cada animal, para se alocar animais com igual desempenho aos grupos experimentais (sedentário e treinado) e para se determinar a intensidade do treinamento. O segundo foi realizado na 6ª semana de treinamento para se determinar a nova capacidade máxima e readaptar-se o protocolo de T. O terceiro teste foi realizado ao final do protocolo (12ª semana) para a comparação do ganho de desempenho entre os grupos sedentários e treinados e para se quantificar a eficácia do treinamento nos grupos SHR e WKY. Os animais sedentários também realizaram os testes de esforço máximo nos mesmos períodos que os animais treinados.

Para o treinamento, foi utilizado protocolo de treinamento anteriormente padronizado (DUFLOTH et al., 1997; BRAGA et al., 2000), realizado 5 vezes/semana, 1h/dia por 1, 2, 4, 8 ou 12 semanas, sempre com 0% de inclinação. O valor de “endurance” utilizado foi equivalente à 50-60% da intensidade máxima atingida nos testes de esforço máximo. Os grupos sedentários foram mantidos sem treinamento por período equivalente ao T de 12 semanas, sendo, no entanto,

manuseados todos os dias e colocados para andar/correr na esteira uma vez por semana, por 10 minutos a 0,5-0,7 km/h para adaptação ao manuseio e à esteira. Isto foi feito com o objetivo de manter os sedentários em condições próximas às dos animais treinados.

3.3 Confeção e implantação das cânulas arteriais

As cânulas para implantação na artéria femoral esquerda foram confeccionadas com dois segmentos de Tygon. A parte proximal, a ser introduzida na luz vascular, era mais fina (diâmetro interno = 0,28 mm x diâmetro externo = 0,61 mm e com 3 cm de extensão) e foi soldada a outro segmento mais grosso (diâmetro interno = 0,50 mm x diâmetro externo = 1,50 mm com 12 cm de comprimento). Os dois segmentos foram fundidos sob calor, com auxílio de um guia de aço inoxidável, preservando a luz interna do catéter. As cânulas foram preenchidas com solução salina heparinizada (1%-20 UI/ml) e mantidas ocluídas com pino de metal inoxidável.

Ao completar os períodos previamente definidos, sedentários nas semanas 0 e 12 e treinados nas semanas 1, 2, 4, 8 e 12 (Tabela 1) foram pesados e anestesiados com ketamina/xilazina (100 mg/kg de cloridrato de ketamina - ketalar, parke-davis e 20 mg/kg de cloridrato de xilasina - rompum, bayer, im). Foi feita uma incisão na pata esquerda e em seguida a localização e isolamento da artéria femoral. Foi feita uma pequena incisão na artéria para se introduzir a extremidade mais fina da cânula, já preenchida com salina heparinizada, no sentido cranial. A cânula foi amarrada ao vaso com linha de sutura. A extremidade mais espessa da cânula foi exteriorizada através do tecido subcutâneo e fixada com uma sutura na região dorsal do pescoço. As incisões ventral e dorsal foram suturadas e higienizadas com água oxigenada e iodo. Os ratos receberam analgésico (cetoprofeno 1%, 2mg/kg) e antibiótico (pentabiótico). Após a canulação, os ratos foram colocados em caixas individuais com livre movimentação. Foi esperado um período de 24h para recuperação completa da cirurgia, antes de qualquer procedimento experimental.

3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Todos os registros funcionais foram realizados 26-28 horas após a última sessão de treinamento (nos grupos T) e 24 horas após a canulação arterial. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão, que por sua vez, foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (transdutor ADInstruments acoplado ao amplificador Power Lab-AD instruments e ao computador e polígrafo Gould TA 4000). Após um período de 15 à 25 minutos para estabilização do animal ao ambiente de registro foram registradas as pressões arteriais sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca por um período de 30 à 40 minutos (valores basais ou de repouso).

3.5 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real

3.5.1 Coleta do tecido encefálico

Após os registros funcionais, os ratos foram anestesiados com overdose de anestésico (300 mg/kg de ketamina e 60 mg/kg de xilasina). Imediatamente após a parada respiratória, foi feita uma incisão na linha mediana do tórax, a fim de se expor o coração. Os animais destinados ao PCR em tempo real (7-10 ratos/grupo) foram submetidos à perfusão transcardíaca com salina via ventrículo esquerdo, em que um catéter flexível foi introduzido no ápice do ventrículo esquerdo até a emergência da aorta. Foi feita uma pequena incisão no átrio direito para extravasamento do sangue/salina. A perfusão foi realizada com solução salina (~100 ml por 5 min em bomba peristáltica - Manostar Corporation, EUA), sob níveis de pressão semelhantes aos registrados nos animais conscientes.

Após a perfusão, o animal foi decapitado. Em seguida, foi realizada a remoção de toda a calota craniana para rápida retirada do encéfalo, que foi imediatamente transferido para uma “placa de petri” forrada com papel filtro, umedecida com solução salina e mantida em gelo seco, para evitar-se a ação de RNAses, uma vez que estas possuem atividade acima de 14 °C. Após o congelamento do cérebro, foram feitas fatias coronais (~1000 µm de espessura) do tronco cerebral e do hipotálamo. Foram obtidas duas secções (entre 12,70 e 13,70 e entre 13,70 e 14,70 mm em relação ao bregma, rostral e caudal ao óbex, contendo o RVL ventralmente e o NTS medial e caudal dorsalmente. Além disso, foi obtida uma secção do

hipotálamo (entre 1,40 e 2,40 mm caudal ao bregma) contendo o PVN. Após a identificação dos núcleos de interesse nas porções ventral (envolvendo basicamente o RVL) e dorsal do bulbo (envolvendo o NTS, DMV e área postrema) e o hipotálamo (envolvendo basicamente o PVN), foram removidos “punches” com agulha romba (gauge 20”) de modo a padronizar o volume de cada amostra (~1,5 a 2 mg), além de ser feita uma melhor delimitação do núcleo de interesse. Cada núcleo de interesse foi armazenado em “eppendorf” livre de RNAses contendo 500 µl de TRIzol®, e imediatamente acondicionado em gelo seco. Após cada coleta, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para processamento posterior.

3.5.2 Extração do RNA total

Todas as amostras coletadas tiveram o RNA total extraído utilizando-se o protocolo do TRIzol® Reagent (Invitrogen, São Paulo, S .P., Brasil, Cat. No. 15596-026) segundo o manual do fabricante. O TRIzol® é um reagente comercial a base de fenol com a propriedade de lisar as células, além de estabilizar e proteger o RNA de enzimas presentes na própria célula.

As amostras foram retiradas do freezer -80 °C, somente no momento da extração, sendo sempre mantidas em gelo. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando-se sonicador (Vibra Cell, EUA). A mistura resultante foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. A seguir foi acrescentado 0,2 ml de clorofórmio (CHCl₃) para desproteinização (fase de separação). O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (fase de precipitação), lavado com etanol 75% (fase de lavagem) e dissolvido com H₂O ultra pura previamente tratada com DEPC 0,01% (dietilpirocarbonato - fase de diluição). O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro (“Nanodrop 3300” - Thermo scientific, Bremen, Alemanha) nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. Cada amostra teve 1 µl corrido em gel de agarose (2%) com brometo de etídio para assegurar que o RNA manteve-se íntegro após passar pelo processo de coleta e extração.

3.5.3 Síntese do cDNA

Amostras de 2 µg de RNA foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (nº. cat. 18068-015-Invitrogen) seguindo o protocolo padrão fornecido pelo fabricante. O uso da DNase tem por objetivo eliminar qualquer contaminação das amostras com DNA genômico. Posteriormente, foram acrescentados à solução anterior 1 µL de EDTA para neutralizar a DNase para as próximas etapas de síntese do cDNA. Em seguida, foi acrescentado 1 µL de oligodesoxiribonucleotídeos (oligoDT - 146ng – Invitrogen), que se combinam à fita simples de RNA para que a enzima Transcriptase Reversa reconheça um sítio de início de transcrição. As soluções foram então levadas ao termociclador por 10 minutos a 70 °C. Em seguida, foram colocadas em gelo para a adição de solução tampão para a enzima transcriptase reversa (kit Improm II, Promega, EUA) e dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados – Nº.Cat. 10297-018 - Invitrogen). Os Desoxirribonucleotídeos Fosfatados dNTP's são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina): dATP (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada) e dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada). Novamente, a solução resultante foi levada ao termociclador por 5 minutos a 25 °C seguindo 60 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C. Terminada a reação, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.5.4 Escolha do Gene Constitutivo

O gene endógeno, ou constitutivo, trata-se de um gene expresso continuamente e em todas as células do organismo. Para o presente estudo foi escolhido um gene que não tivesse alteração perante tempo, atividade física, hipertensão e área autonômica estudada. Para isso, foram selecionadas 4 amostras cujas quantificações obtidas de RNA total foram semelhantes pelo aparelho “Ultrospec 3100 pro”. Para estudo do gene endógeno mais adequado, foi utilizada uma amostra de cada diferente variante do experimento: animal normotenso sedentário no tempo inicial do experimento (WKY S₀), animal normotenso treinado no tempo final do experimento (WKY T₁₂), animal hipertenso e sedentário no tempo inicial do experimento (SHR S₀) e por fim um animal hipertenso e treinado no tempo

final do experimento (SHR T₁₂). Este experimento-piloto foi repetido para todos os núcleos centrais estudados com diferentes opções de genes constitutivos (β -actina, GAPDH e HPRT) (ZAMPIERI, 2011).

O gene testado que apresentou menor variação perante as condições estudadas neste projeto foi o gene da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT ou HGFRT). A HPRT, enzima altamente expressa em encéfalos de mamíferos, é uma purina que catalisa a conversão de hipoxantina e guanina em seus respectivos mononucleotídeos (GILSBACH et al., 2006; MELDGAARD et al., 2006; TOKUYAMA et al., 1999). Grande parte das purinas resultantes da degradação do DNA endógeno é reaproveitada para síntese de novos nucleotídeos. O HPRT é um gene constitutivamente expresso com níveis notavelmente altos no encéfalo de mamíferos (GILSBACH et al., 2006; MELDGAARD et al., 2006; TOKUYAMA et al., 1999), o que permite utilizá-lo com segurança como gene constitutivo para o presente estudo, uma vez que não apresentou variações significativas frente às condições estudadas neste estudo (hipertensão, treinamento e tempo, e área encefálica) em comparação a outros genes comumente usados como endógenos (β -actina e GAPDH).

3.5.5 Padronização das reações e escolha dos primers

Foram realizados diversos testes para testar o melhor método de extração (sonicador contra pistilo) e foi escolhido o sonicador. Também foram feitos testes que confirmaram o efeito da DNase em degradar o DNA genômico sem degradar a amostra.

Os primers foram desenhados através do programa Primer-BLAST encontrado no portal do PubMed. Foram realizados diversos testes para verificar a eficiência do par de primers desenhado para angiotensinogênio e quatro diferentes pares de primers para o receptor AT₁, para a escolha do mais adequado (Tabela 2). Para o AT₁ foi escolhido o primer utilizado por LU et al. (2009).

Para cada primer, realizaram-se curvas de padronização com várias diluições de amostra (concentrada, 1:5, 1:10 e 1:20) para se escolher a concentração que possuísse maior eficiência.

Nos núcleos cerebrais analisados (PVN, NTS e RVL) o primer para o HPRT mostrou eficiência entre 0,97 e 1,09 e R² >0,99, mostrando-se adequado à

realização de RT-PCR. Foram realizadas também curvas de padronização dos primers para angiotensinogênio e AT₁. Os primers para angiotensinogênio escolhidos apresentaram eficiência entre 0,9 e 1,06 e $R^2 > 0,98$ e os de AT₁R eficiência entre 0,99 e 1,12 e $R^2 > 0,98$ nos diferentes núcleos cerebrais abordados neste estudo, mostrando-se, portanto, adequados a realização de RT-PCR.

Tabela 2. Sequência de primers para HPRT, angiotensinogênio e receptor AT₁ para RT-PCR em Tempo Real.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')	Produto
HPRT	TTT GCT GAC CTG CTG GAT TAC	ACT TTT ATG TCC CCC GTT GA	125bp
Aogen	CAC GGA CAG CAC CCT ATT TT	TGT TGT CCA CCC AGA ACT CA	144bp
AT ₁ R	CCT CTA CGC CAG TGT GTT CC	GCC AAG CCA GCC ATC AGC	101bp

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011)

3.5.6 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real

A expressão do RNAm foi estimada mediante RT-PCR em Tempo Real, utilizando o aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett, EUA), que foi desenvolvido para detectar a expressão gênica com alta especificidade e sensibilidade. Esta técnica é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em cada ciclo. Para tal, foi utilizada a técnica de coloração "SYBR Green" (Platinum[®]SYBR[®]green qPCR Super Mix-UDG, cat. n^o. 11733-038 - Invitrogen) que segue o princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), emitindo alto sinal de fluorescência quando ligado ao DNA dupla fita. Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante: 12,5 µL Platinum Mix, 10,5µL água DEPC, 0,5µL de primer forward e 0,5µL de primer reverse, e por fim 1µL de cada amostra. Para minimizar o viés de possíveis diferenças entre os reagentes pipetados em cada corrida foi estudado o gene de interesse juntamente com o gene endógeno nas mesmas amostras, cada um em duplicata. Além disso, em cada corrida realizada foram incluídas amostras de todos os grupos estudados. Uma amostra sem cDNA foi também adicionada em cada ensaio. Em todas as reações foram realizadas

desnaturações iniciais a 52 °C por 2 min e 95 °C por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 15s), anelamento (60 °C, 60s) e extensão (72 °C, 20s). Ao final de cada corrida, a temperatura foi aumentada de 66 °C a 99 °C, em uma proporção de 2 °C/min, e a fluorescência foi mensurada para a construção de uma curva de dissociação. Foram utilizados em média 35 ciclos dependendo do primer. O platô de amplificação foi observado em todas as amostras.

Algumas amostras de todos os grupos experimentais foram corridas em gel de agarose (2%) com o objetivo de confirmar o tamanho do amplicon resultante.

3.5.7 Cálculo da expressão gênica

A imunofluorescência das reações foi analisada em cada ciclo pelo software do próprio equipamento de RT-PCR em Tempo Real (Rotor Gene 6000, Corbett, EUA), de acordo com Ramakers et al., 2003. A expressão relativa do gene foi calculada durante o início da fase exponencial de cada curva no estágio inicial de cada ensaio. Para análise dos dados do RT-PCR foi determinado o “*threshold*” (Ct). Na análise, no mínimo 4 pontos do início da fase exponencial de cada curva foram analisados para se delimitar um limite mínimo e máximo. A média destes valores determina o “*threshold*” para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo. Os resultados dos experimentos de cada grupo foram corrigidos pela expressão do gene de HPRT, utilizado como controle endógeno positivo. Os Cts foram então exportados para o programa Excel, para a determinação do $E^{f^{\Delta\Delta CT}}$ (SCHEFE et al., 2006), que foi novamente exportado para o programa de análises estatísticas STATISTICA 7 (StatSoft, São Caetano do Sul, S. P. Brasil).

3.6 Imunofluorescência

3.6.1 Coleta do tecido encefálico

Após os registros funcionais, os animais destinados aos estudos de imunofluorescência (~4 ratos/grupo) foram profundamente anestesiados (ketamina:xilasina, 300:60 mg /kg, im) e perfundidos, imediatamente após a parada respiratória, com solução salina (~100ml por 5min), seguido do fixador paraformaldeído a 4% (em tampão fosfato a 0,01 M, ~400ml por 30 min). Em seguida, os animais foram decapitados para remoção do encéfalo.

3.6.2 Pós-fixação do encéfalo

O encéfalo foi pós-fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH= 7,4) + 20% sacarose por 10 horas e depois crioprotegido em sacarose 20% em tampão fosfato a 4 °C por 2 à 3 dias. Os encéfalos foram então separados (parte rostral, abrangendo o hipotálamo e parte caudal abrangendo o bulbo dorsal e ventral) envoltos em papel alumínio e armazenados em freezer -80 °C.

3.6.3 Cortes coronais dos núcleos autonômicos

Os blocos correspondentes ao hipotálamo e tronco cerebral foram montados no pedestal do micrótomo de congelamento rotativo (Leica, modelo SM2000, Alemanha), para obtenção de cortes seqüenciais de 30 µm abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse. Os cortes coronais de cada rato foram coletados em 4 diferentes placas de cultura (Falcon 3047) contendo solução “anticongelante” para o armazenamento em freezer (-20 °C). Assim, o espaçamento entre dois poços adjacentes foi de 120 µm. Destes compartimentos foram utilizadas a placa A, para dupla marcação de Aogen e NeuN e a placa B, para dupla marcação de AT₁ e NeuN.

3.6.4 Pré-tratamento dos cortes

A fim de reduzir “background” (fundo), ligações não específicas em geral e de eliminar a atividade da peroxidase endógena, foram realizados três passos de pré-tratamento dos cortes. Após várias lavagens com PB 0,1M, os cortes foram pré-tratados por 10 minutos com 1% de boro-hidreto de sódio (Sigma) em PB a pH 7,4 e em seguida foram feitas 5 lavagens com PB. Então os cortes foram pré-incubados com 1% H₂O₂ em PB contendo 10% de álcool metílico para bloquear a peroxidase endógena e evitar a presença de hemácias nos tecidos a serem estudados. Após várias lavagens em PB, os cortes foram pré-incubados em uma solução contendo 2% de soro normal, correspondendo ao animal que foi produzido o anticorpo secundário, no caso burro, por 30 minutos.

3.6.5 Reação de Imunofluorescência

Os cortes foram então incubados por 48 horas a 4 °C com anticorpos primários para receptores AT_{1A} (Santa Cruz, cat# sc-1173-G, policlonal em cabra) ou Aogen (Epitomics, cat.#: 3208-1, monoclonal em coelho) e NeuN (Chemicon, cat# MAB377, monoclonal em camundongo) para colocalização dos núcleos neuronais, diluídos em PB contendo 2% de soro normal correspondente ao animal em que foi produzido o anticorpo secundário, no caso burro e 0,3% de Triton X-100.

Após várias lavagens em PB 0,1M, os cortes foram incubados com anticorpos secundários (fluorescina [FITC, Jackson, 1:100 em PB, para marcação de Aogen ou AT₁] e rodamina-conjugados [Alexa 594, Molecular Probes, 1:250 em PB, para marcação do NeuN]) por 60 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram lavados e então colocados em uma placa de Petri contendo PB 0,1 M e, com um pincel, puxados gentilmente para a lâmina, previamente submersas em uma solução de gelatina alumen-cromo, deixando todos os cortes alinhados. As lâminas montadas foram secas ao ar livre em ambiente escuro. Os cortes foram recobertos em meio especial para minimizar o desvanecimento da fluorescência (Molecular Probes). As lâminas foram recobertas com a lamínula, evitando-se a formação de bolhas e seladas com esmalte de unha. As imagens foram capturadas em microscópio (Zeiss Axioimager A1, Munique, Alemanha) objetiva de 40x, resultando em um aumento de 400x e tamanho de 1388 x 1040 pixels, e analisadas

através do software Axiovision (Zeiss), que permite a aquisição de vários canais de fluorescência e a sobreposição destas imagens.

3.7 Análise estatística dos dados

Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. Para a análise estatística dos dados funcionais (teste máximo, PA e FC), assim como dos dados de expressão gênica, foi utilizado o software STATISTICA 7 (StatSoft, Inc) para ANOVA fatorial considerando-se 3 fatores: grupo (WKY e SHR), condição (sedentário e treinado) e tempo (semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 12). Foi utilizado teste *post-hoc de* Fisher. Para as comparações entre S e T ao final dos protocolos utilizou-se ANOVA de 2 fatores. A diferença foi considerada significativa para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira nos grupos WKY e SHR

Foi utilizado um número bastante expressivo de ratos (138 WKY e 161 SHR no início dos protocolos) uma vez que os animais deveriam ser avaliados funcionalmente e sacrificados para a coleta dos tecidos ao longo dos diferentes tempos do treinamento (T) ou sedentarismo (S), ou seja, nas semanas zero, um, dois, quatro, oito e doze.

Os testes de esforço máximo foram realizados antes (na semana 0), durante (na semana 6) e ao final dos protocolos de T ou S (na semana 12). No início dos protocolos, os SHR apresentaram melhor desempenho em esteira quando comparados aos WKY (médias de $1,62 \pm 0,06$ vs $1,00 \pm 0,04$ km/h, SHR vs WKY, $p < 0,05$, Figura 2 e Tabela 3). O melhor desempenho dos SHR foi mantido ao longo das 12 semanas experimentais. O T determinou em ambos os grupos aumentos significativos da velocidade máxima atingida já na 6ª semana ($SHR_T = 2,09 \pm 0,09$ km/h; $WKY_T = 1,32 \pm 0,06$ km/h), com aumentos adicionais na 12ª semana ($SHR_T = 2,40 \pm 0,11$ km/h; $WKY_T = 1,92 \pm 0,12$ km/h). WKY_S e SHR_S não mantiveram seu desempenho ao longo das 12 semanas de sedentarismo, com quedas a partir da 6ª semana ($SHR_S = 1,09 \pm 0,19$ km/h; $WKY_S = 0,72 \pm 0,14$ km/h), cujos valores se mantiveram até a semana 12 ($SHR_S = 1,01 \pm 0,13$; $WKY_S = 0,77 \pm 0,07$ km/h, Figura 2 e Tabela 3).

Ao final das 12 semanas, tanto os SHR_T quanto os WKY_T apresentaram ganho similar de desempenho ($+0,78 \pm 0,22$ e $+0,88 \pm 0,14$ km/h, entre as semanas 0 e 12, Figura 3), indicando que o treinamento foi igualmente eficaz em melhorar o desempenho dos grupos SHR e WKY. Já os grupos sedentários tiveram perdas menores mas significativas do desempenho entre as semanas 0 e 12 ($-0,30 \pm 0,10$ e $-0,43 \pm 0,16$, para WKY_S e SHR_S respectivamente, Figura 3 e Tabela 3).

Figura 2. Desempenho na esteira durante testes máximos dos grupos WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Testes máximos foram realizados nas semanas 0, 6 e 12. Os símbolos * (vs S), + (vs WKY) e • (vs semana 0) indicam dados significativamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA fatorial para medidas repetidas).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 3. Desempenho na esteira (km/h) durante testes máximos nas semanas 0, 6 e 12 em WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Grupo	WKY _S	WKY _T	SHR _S	SHR _T
semana 0	0,98±0,06 (20)	1,02±0,03 (66)	1,62±0,08 (22) +	1,62±0,04 (74) +
semana 6	0,72±0,14 (10) •	1,32±0,06 (20) •*	1,09±0,19 (11) +•	2,09±0,09 (27) +•*
semana 12	0,77±0,07 (9) •	1,92±0,12 (13) •*	1,01±0,13 (15) •	2,40±0,11 (12) +•*
Ganho	-0,30±0,10 (9) •	+0,88±0,14 (13) •*	-0,43±0,16 (15) •	+0,78±0,22 (12) •*

Os símbolos * (vs S), + (vs WKY) e • (vs semana 0) indicam dados significativamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA fatorial para medidas repetidas).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Figura 3. Comparação do ganho de desempenho (Δ ganho = semana 12 – semana 0) nos grupos SHR e WKY ao final dos protocolos.

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA 2 fatores • indica uma alteração significativa no ganho; * (vs S).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.2 Efeitos seqüenciais do treinamento aeróbio sobre a PAM e FC

Nas semanas zero (S_0), um (T_1), dois (T_2), quatro (T_4), oito (T_8) e doze (S_{12} e T_{12}), durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S), os animais foram anestesiados para canulação da artéria femoral. No dia seguinte à cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro para aquisição dos valores basais de PA e FC.

A Figura 4 e a Tabela 4 ilustram os efeitos do T ou S sobre os valores sequenciais de PAM nos grupos WKY e SHR. Observa-se que os SHR_S quando comparados aos WKY_S apresentavam, já no início dos protocolos, valores bastante elevados de PA, ou seja, encontravam-se na fase estabelecida da hipertensão (174 ± 2 vs 123 ± 2 mmHg, SHR vs WKY, $p < 0,05$). Nos SHR, o T provocou queda significativa da PA a partir da 4ª semana de T (166 ± 2 mmHg nos SHR_T , correspondendo a uma redução de 5%) a qual se manteve na 8ª e 12ª semanas 165 ± 3 e 164 ± 1 mmHg, respectivamente, $p < 0,05$, vs 174 ± 2 mmHg no início dos protocolos, Figura 4 e Tabela 4).

Figura 4. Alteração ao longo do tempo dos valores basais de pressão arterial média (PAM) em WKY e SHR ao longo dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial). + vs WKY; • vs S_0 ; * vs S_{12} .

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 4. Alteração ao longo do tempo dos valores basais de PAM em WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Pressão Arterial	WKY	SHR
S0	123±2 (15)	174±2 (23) +
T1	126±2 (9)	170±3 (13) +
T2	122±1 (15)	170±4 (16) +
T4	123±2 (9)	166±2 (33) +●
T8	124±1 (20)	165±3 (23) +●
T12	121±1 (30)	164±1 (10) +●*
S12	120±1 (30)	176±2 (18) +●

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher). + vs WKY; ● vs S0; * vs S12. FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Os WKY_S apresentavam valores de PAM de 123±2 mmHg no início dos protocolos e nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos S e T ao longo das 12 semanas. Portanto, durante todo o protocolo experimental os SHR S e T sempre apresentaram valores mais elevados de PAM. A comparação entre S e T na 12ª semana revelou não haver diferenças no grupo WKY, mas houve redução significativa da PA nos SHR (de 176±2 para 164±1 mmHg, $p < 0,05$, correspondendo à queda de 7%; Figura 5, Tabela 4).

Figura 5. Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM) nos grupos WKY e SHR ao final dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA de 2 fatores). + vs WKY; * vs S12.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Os SHR_s também apresentaram, no início dos protocolos, FC basal mais elevada que seus controles normotensos (385 ± 7 vs 326 ± 4 b/min nos WKY_s $p < 0,05$, Figura 6 e Tabela 5), e ela se manteve mais elevada ao longo dos protocolos.

Observou-se que o treinamento foi efetivo em reduzir a FC basal em ambos os grupos. A queda da FC apareceu mais precocemente no grupo SHR, na qual se observou redução significativa de 6,5% já a partir da 4^a semana de treinamento (360 ± 6 vs 385 ± 7 em S0). Não houve quedas adicionais da FC basal, que se manteve neste patamar até a 12^a semana de T (357 ± 2 , correspondendo a redução de 7,3%, $p < 0,05$, Figura 6 e Tabela 5).

No grupo WKY, a redução da FC apareceu mais tardiamente, ao redor da 8^a semana de T (309 ± 4 vs 326 ± 4 b/min, correspondendo à queda de 5,2%, $p < 0,05$). Houve ligeira redução da FC basal entre a 8^a e 12^a semanas de T, atingindo ao final do protocolo valores de 294 ± 3 b/min, o que correspondia à redução de 9,8% ($p < 0,05$, Figura 6, Tabela 5).

Figura 6. Alteração dos valores basais de frequência cardíaca (FC) em WKY e SHR ao longo dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher). + vs WKY; • vs S0; * vs S12.
 FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 5. Valores basais de frequência cardíaca (FC) em WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Frequência cardíaca	WKY	SHR
S0	326±4 (15)	385±7 (23) +
T1	338±6 (9)	392±9 (13) +
T2	323±3 (15)	389±15 (16) +
T4	320±9 (9)	360±6 (33) + ●
T8	309±4 (20) ●	358±5 (23) + ● *
T12	294±3 (30) ●	357±2 (10) + ● *
S12	326±6 (30)	380±7 (18) +

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida do pós-teste de Fisher). + vs WKY; ● vs S0; * vs S12. FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

A observação da Figura 6 indica que mesmo se considerando as quedas observadas nos SHR_T a FC basal dos grupos SHR sempre foi mais elevada que a dos grupos WKY S e T. Ao final dos protocolos (Figura 7, Tabela 5), observou-se reduções significativas da FC basal em ambos os grupos treinados (WKY -9,8%; SHR -7%).

Figura 7. Comparação dos valores basais de frequência cardíaca (FC) nos grupos WKY e SHR ao final dos protocolos experimentais de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA de 2 fatores seguida). + vs WKY; * vs S12. FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3 Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a expressão gênica e protéica de Aogen e do receptor AT₁ em áreas de controle autonômico

Após os registros funcionais, cerca de 8 a 10 animais de cada grupo experimental (S₀ e S₁₂, T₁, T₂, T₄, T₈, e T₁₂) foram perfundidos apenas com salina para remoção do encéfalo a fresco, o qual foi imediatamente congelado para a obtenção dos “punches” das áreas dorsal (DBS - abrangendo o NTS e DMV) e ventral (VBS - abrangendo o RVL) do bulbo e do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Amostras de PVN, NTS e RVL, coletadas em Trizol[®], foram processadas para a extração de RNA total, síntese do cDNA e realização do RT-PCR em tempo real.

4.3.1 Efeitos no PVN

4.3.1.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT₁R

As 12 semanas de sedentarismo não alteraram os níveis basais de RNAm de Aogen e de AT₁R no PVN em nenhum dos grupos experimentais. A expressão gênica de Aogen nos WKY sedentários foi de 1,00±0,22 e 0,96±0,13 e nos SHR sedentários de 1,33±0,18 e 1,27±0,11, da semana 0 para a semana 12, respectivamente. A expressão gênica de AT₁R nos WKY sedentários passou de 1,00±0,29 para 1,02±0,18 e nos SHR de 1,16±0,31 para 1,10±0,14, ou seja, manteve-se estável entre as semanas 0 e 12 do sedentarismo (Figura 8 e Tabela 6).

No PVN dos SHR, o treinamento determinou redução significativa da expressão de RNAm de Aogen já a partir de T₂ (de 1,33±0,18 para 0,88±0,22, Figura 8B, correspondente à uma redução de 44%). Esta queda no RNAm de Aogen induzida pelo treinamento manteve-se estável até o final do protocolo, atingindo 0,73±0,16 em T₁₂ (p<0,05, Figura 8B, correspondendo a uma redução de 46%).

Nos WKY o treinamento não foi efetivo em reduzir significativamente a expressão de RNAm de Aogen no PVN. As pequenas alterações não atingiram níveis de significância (P>0,05, Figura 8A).

Quanto à expressão do RNAm do receptor AT₁ no PVN, foi observada que o treinamento determinou redução de sua expressão apenas nos SHR a qual ocorreu de 1,16±0,31 para 0,52±0,02, correspondendo à uma redução de 56%, p<0,05,

Figura 8D e Tabela 6) que ocorreu mais tardiamente que a do gene de Aogen, aparecendo apenas na 12ª semana do T. Nos WKY treinados não houve alterações na expressão gênica do receptor AT₁ no PVN. (Figura 8C, Tabela 6).

Figura 8. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT₁R (C e D) no PVN de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

* ●vs S0; * vs S12 ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida do pós-teste de Fisher).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 6. Expressão relativa de RNAm de Aogen e AT₁R no PVN de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

	Aogen		AT ₁	
	WKY	SHR	WKY	SHR
S0	1,00±0,22	1,33±0,18	1,00±0,29	1,16±0,31
T1	0,98±0,10	1,32±0,26	1,02±0,17	0,97±0,28
T2	0,87±0,03	0,88±0,22 ●	0,99±0,05	0,98±0,18
T4	0,65±0,04	0,85±0,08 ●	0,86±0,19	0,92±0,23
T8	0,66±0,08	0,86±0,19 ●	0,80±0,28	0,88±0,20
T12	0,71±0,13	0,73±0,15 ●*	0,88±0,06	0,52±0,02 ●*
S12	0,96±0,13	1,27±0,11	1,02±0,18	1,10±0,14

Significâncias ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós teste de Fisher). ● vs S0; * vs S12.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Assim, ao final dos protocolos (Figura 9), observamos que o treinamento induziu quedas significativas na expressão de RNAm de Aogen e de AT_1R apenas no PVN dos SHR: houve redução de 43% do Aogen e de 53% do receptor AT_1 . Por outro lado, não se observaram alterações significativas entre WKY_{T12} e WKY_{S12} .

Figura 9. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT_1R (B) no PVN de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S12) ou treinamento (T12).

* vs S12 (p<0,05, ANOVA de 2 fatores).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3.1.2 Localização protéica de Aogen e AT_1R no PVN

Após os registros funcionais, cerca de 3 a 4 animais de cada grupo foram perfundidos e pós-fixados com paraformaldeído 4% + 20% sacarose para posterior processamento do encéfalo pela técnica de Imunofluorescência.

As Figuras 10 e 12 confirmam a expressão protéica de Aogen (Figura 10) e AT_1R (Figura 12) no PVN de WKY e SHR nos diferentes tempos experimentais. A expressão de Aogen nos SHR_S mostrava-se um pouco mais intensa que a apresentada pelos WKY_S pareados por tempo de treinamento ou sedentarismo (Figura 10).

Observou-se também que o treinamento foi acompanhado de redução na densidade de expressão do Aogen no PVN de SHR já detectada a partir da 2ª semana de treinamento, a qual se manteve até a 12ª semana.

Nos WKY a densidade de expressão do Aogen mostrava-se pouco menos intensa que a dos SHR, sem grandes alterações entre os diferentes tempos experimentais (Figura 10).

Figura 10. Imunofluorescência na região do PVN (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna à esquerda) e SHR (coluna à direita).

3V= terceiro ventrículo.
 FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Em maior ampliação (Figura 11) foi possível observar-se que o Aogen localizava-se no corpo celular de neurônios parvocelulares do PVN (identificados pela coloração avermelhada do núcleo (NeuN), estando ainda presente nas terminações neurais.

Figura 11. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) de SHR S0.

3V= terceiro ventrículo.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

A expressão protéica do receptor AT_1 no PVN também confirmou os dados de expressão gênica (Figura 12). Ela mostrava-se bastante densa no PVN de SHR

sedentários, com nítida tendência à redução após 12 semanas de treinamento. A tendência a redução não foi observada nos WKY treinados (Figura 12).

Figura 12. Imunofluorescência na região do PVN (400x) para AT₁R (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0 e T12) em WKY (coluna à esquerda) e SHR (coluna à direita).

PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; 3V: terceiro ventrículo. Co-localização em amarelo.
 FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Em maior aumento (Figura 13) pode-se constatar que o AT₁R foi expresso em neurônios parvocelulares do PVN (identificados pela coloração avermelhada do núcleo).

Figura 13. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para AT₁R (verde) e NeuN (vermelho) de SHR S0.

Co-localização em amarelo.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3.2 Efeitos no NTS

4.3.2.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT₁R

As respostas de expressão gênica do Aogen e AT₁R no NTS seguiram em linhas gerais as respostas observadas no PVN. As 12 semanas de sedentarismo não alteraram os níveis basais de expressão de Aogen e AT₁R tanto nos WKY (Aogen=1,00±0,07 e 0,99±0,14; AT₁R=1,00±0,17 e 1,14±0,15, para as semanas 0 e 12 respectivamente) como nos SHR (Aogen=1,27±0,16 e 1,22±0,14; AT₁R=1,67±0,29 e 1,47±0,13, nas semanas 0 e 12) como ilustrado na Figura 14.

Quando comparados aos WKY_S, SHR_S apresentavam no início dos protocolos, expressão maior de RNAm de AT₁R no NTS (1,67±0,29 vs 1,00±0,17, Figura 14D vs C, $p<0,05$), sem alteração na expressão gênica de Aogen entre grupos.

O treinamento determinou no NTS dos SHR redução significativa do RNAm de Aogen, a partir de T₄ (de 1,27±0,16 para 0,90±0,11, correspondendo a uma redução de 30%, Tabela 7), que se manteve neste patamar até T₁₂ (0,85±0,04, uma redução de 44%, $p<0,05$, Figura 14B). Também a expressão de RNAm de AT₁R no NTS foi reduzida pelo treinamento aeróbio, embora este efeito só se manifestasse mais tardiamente (1,02±0,15 em T₁₂, correspondendo à uma redução de 39%, $p<0,05$, Figura 14D e Tabela 7).

Nos WKY, o treinamento não alterou a expressão de RNAm de Aogen e nem a de AT₁R apresentada pelo NTS.

Figura 14. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT₁R (C e D) no NTS de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

+ vs WKY; • vs S0; * vs S12 ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 7. Expressão relativa de RNAm de Aogen e AT₁R no NTS de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

	Aogen		AT1	
	WKY	SHR	WKY	SHR
S0	1,00±0,07	1,27±0,16	1,00±0,17	1,67±0,29+
T1	1,15±0,15	1,01±0,10	1,44±0,20	1,40±0,11
T2	1,02±0,14	0,95±0,14	1,13±0,17	1,48±0,18+
T4	0,99±0,14	0,90±0,11 •	1,15±0,17	1,40±0,20
T8	0,91±0,10	0,83±0,06 •	1,13±0,14	1,40±0,18
T12	0,79±0,06	0,85±0,04 •*	1,09±0,11	1,02±0,15 •*
S12	0,99±0,14	1,22±0,14	1,14±0,15	1,47±0,13

+ vs WKY; • vs S0; * vs S12 ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

A comparação da expressão relativa de RNAm de Aogen e de AT₁R ao final dos protocolos de T e S (Figura 15) mostrou que o treinamento induziu reduções significativas na expressão de Aogen (-30%) e de AT₁R (-31%), mas apenas no grupo SHR, sem alterações significativas do grupo WKY.

Figura 15. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT₁R (B) no NTS de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S) ou de treinamento (T).

* vs S12 ($p < 0,05$, ANOVA de 2 fatores).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3.2.2 Localização protéica de Aogen e AT₁R no NTS

As figuras 16 e 18 confirmam a expressão de Aogen (Figura 16) e AT₁R (Figura 18) no NTS de WKY e SHR nos diferentes tempos experimentais. Nos animais sedentários a expressão de Aogen mostrava-se pouco mais intensa nos SHR que nos WKY (Figura 16). Interessante observar-se que a expressão protéica de Aogen mostrava-se bastante reduzida em T12 nos SHR, sem alterações visíveis durante o treinamento nos WKY (Figura 16).

Figura 16. Imunofluorescência na região do NTS (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).

CC= canal central; AP= área postrema.
 FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Em maior ampliação (Figura 17) foi possível observar-se que o Aogen no NTS localizava-se densamente em terminações nervosas, estando também presente em alguns neurônios, como indicado pela dupla marcação com NeuN (núcleo).

Figura 17. Imunofluorescência em maior ampliação na região do PVN para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.

CC= canal central; AP= área postrema.
FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Observou-se também que a expressão protéica de AT_1R no NTS comissural de SHR sedentários era mais intensa que a observada nos WKY sedentários. O treinamento determinou menor expressão de AT_1R no NTS comissural dos SHR

observada pela menor densidade de imunofluorescência verde em T12 sem alterações importantes nesta mesma área dos WKY (Figura18).

Figura 18. Imunofluorescência na região do NTS (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita). CC= canal central; AP= área postrema.

CC= canal central; AP= área postrema.
FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Em maior aumento (Figura 19) pode-se constatar que os receptores AT₁R no NTS encontravam-se preferencialmente distribuídos em terminações nervosas, embora sua presença em corpos celulares dos neurônios também pudesse ser detectada.

Figura 19. Imunofluorescência em maior ampliação na região do NTS para AT₁R (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.

CC= canal central; AP= área postrema.
FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3.3 Efeitos no RVL

4.3.3.1 Expressão de RNAm de Aogen e AT_1R

No RVL, observa-se que também a expressão de RNAm de AT_1R encontrava-se pouco mais elevada nos SHR embora sem atingir níveis de significância ($1,23 \pm 0,13$ vs $1,00 \pm 0,38$, SHR vs WKY, $p > 0,05$, Figuras 20C vs 20D e Tabela 8).

O treinamento reduziu a expressão de RNAm de Aogen e de AT_1R apenas nos WKY. Neste grupo, a queda da expressão gênica de Aogen foi observada a partir da 8ª semana de T (de $1,00 \pm 0,17$ para $0,59 \pm 0,10$, S_0 vs T_8 , $p < 0,05$, Figura 20A e Tabela 8) e manteve-se até T_{12} ($0,51 \pm 0,10$). Quanto a expressão de RNAm de AT_1R nos WKY observou-se queda significativa já a partir de T_4 ($0,43 \pm 0,09$ vs $1,00 \pm 0,38$ em S_0 , $p < 0,05$, Figura 20C, Tabela 8) a qual se manteve neste patamar até T_{12} ($0,42 \pm 0,03$, $p < 0,05$, vs S_0).

Nos SHR não se observaram alterações significativas do RNAm de Aogen e AT_1R durante o treinamento (Figura 20 B e D, Tabela 8).

Figura 20. Alterações sequenciais da expressão gênica de Aogen (A e B) e AT_1R (C e D) no RVL de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

• vs S_0 ($p < 0,05$, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher); # ($p = 0,06$).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Tabela 8. Expressão relativa de RNAm de Aogen e AT₁R no RVL de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

	Aogen		AT ₁	
	WKY	SHR	WKY	SHR
S0	1,00±0,17	0,79±0,24	1,00±0,38	1,23±0,13
T1	0,73±0,07	0,72±0,24	0,68±0,07	1,10±0,24
T2	0,71±0,05	0,70±0,12	0,49±0,08 #	1,17±0,14
T4	0,62±0,25	0,49±0,06	0,43±0,09 •	1,19±0,08
T8	0,59±0,10 •	0,44±0,11	0,44±0,08 •	0,88±0,11
T12	0,51±0,10 •	0,51±0,16	0,42±0,03 •	0,85±0,13
S12	0,65±0,04	0,71±0,12	0,69±0,31	1,04±0,13

• vs S0 (p<0,05, ANOVA multifatorial seguida de pós-teste de Fisher); # (p=0,07).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Como houve pequenas reduções (embora não significativas) no conteúdo de RNAm de Aogen e AT₁R no RVL dos WKY mantidos sedentários, a comparação entre sedentários e treinados ao final dos protocolos não revelou alterações significativas nos WKY nem nos SHR (Figura 21).

Figura 21. Comparação da expressão gênica de Aogen (A) e AT₁R (B) no NTS de WKY e SHR após 12 semanas de sedentarismo (S) ou de treinamento (T).

(ANOVA de 2 fatores).

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

4.3.3.2 Localização protéica de Aogen e AT₁R no RVL

As figuras 22 e 24 confirmam no RVL a expressão protéica de Aogen (Figura 22) e AT₁R (Figura 24). No grupo WKY treinado observa-se em T₁₂ uma clara

redução da expressão de Aogen quando comparado a T₂ (Figura 22). Por outro lado, esta alteração não era evidente no grupo SHR treinado.

Figura 22. Imunofluorescência na região do RVL (400x) para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).

NA: núcleo ambíguo.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

A análise da expressão de Aogen com maior ampliação revelou que a expressão protéica de Aogen no RVL concentrava-se preferencialmente nos corpos celulares (Figura 23) dos neurônios aí localizados.

Figura 23. Imunofluorescência em maior ampliação na região do RVL para Aogen (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.

NA: núcleo ambíguo.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

A expressão protéica de AT₁R no RVL (Figura 24) também confirmou o efeito do treinamento em reduzir seu conteúdo nos WKY, pela observação de densidade

reduzida em T12. Nos SHR a mesma tendência foi observada, embora com alterações bem mais sutis (Figura 24).

Figura 24. Imunofluorescência na região do RVL (400x) para AT₁R (verde) e NeuN (vermelho) em diferentes tempos experimentais (S0, T2 e T12) em WKY (coluna esquerda) e SHR (coluna direita).

NA: núcleo ambíguo. Co-localização em amarelo.
 FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

Em maior aumento (Figura 25) pudemos constatar que a presença de receptores AT_1 em neurônios do RVL mostrava elevada densidade de marcação nos núcleos celulares.

Figura 25. Imunofluorescência em maior ampliação na região do RVL para AT_1R (verde) e NeuN (vermelho) do SHR S0.

Co-localização em amarelo.

FONTE: (CHAAR, L. J., 2011).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam a eficácia do treinamento aeróbio de baixa intensidade em induzir a instalação de bradicardia de repouso em normotensos e hipertensos e em reduzir parcialmente a pressão arterial de hipertensos. Os resultados obtidos revelaram ainda várias observações originais, a saber:

- os efeitos benéficos do exercício sobre o sistema cardiovascular instalam-se progressivamente manifestando-se precocemente nos SHR (reduções significativas da PAM e FC após 4 semanas de treinamento) e mais tardiamente nos WKY (bradicardia de repouso significativa a partir da 8ª semana de treinamento);

- considerando-se o SRA em áreas autonômicas do encéfalo, SHR_s caracterizam-se por alterações (não significativas) no conteúdo gênico de Aogen no PVN e NTS (aumentado) e RVL (reduzido), e por intenso aumento da expressão gênica e protéica de AT₁R no NTS;

- os efeitos do treinamento sobre a redução da expressão do precursor do SRA nos SHR aparecem mais precocemente no PVN (2ª semana) e mais tardiamente no NTS (4ª semana), sem alterações significativas no RVL;

- em SHR, os efeitos do treinamento sobre a expressão de receptores AT₁ foram mais tardios, com reduções significativas no PVN e NTS na 12ª semana, sem alterações no RVL. O treinamento não interferiu na expressão de AT₁ no PVN e NTS dos WKY, mas reduziu sua expressão no RVL, a partir da 8ª semana de treinamento;

- há coincidência temporal entre redução da expressão de Aogen no PVN e NTS de SHR e o aparecimento da redução da PA e da bradicardia de repouso neste grupo (4 semanas). Também há coincidência temporal entre a instalação da bradicardia de repouso e a redução significativa da expressão de AT₁R no RVL de WKY (8 semanas). Estas observações sugerem que a redução da atividade do SRA em áreas centrais de controle autonômico pode se constituir em um dos fatores determinantes da manifestação dos efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular.

Uma série de dados clínicos e experimentais são concordantes em afirmar que o treinamento aeróbio de baixa intensidade induz bradicardia de repouso (a qual é inclusive considerada como um marcador de condicionamento físico), sendo

bastante eficaz em reduzir os níveis tensionais e, portanto a morbi-mortalidade de hipertensos (CLAUSEN, 1977; TIPTON, 1999; CHOBANIAN et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004; BLUMENTHAL et al., 2010; SUI; LAMONTE; BLAIR, 2007; AMARAL; MICHELINI, 2011). Nossos dados experimentais confirmam a redução da FC de repouso em normotensos e hipertensos, assim como a queda parcial de PAM em hipertensos. A novidade do presente trabalho diz respeito à identificação da sequência temporal com que estes eventos se instalam a bradicardia de repouso e queda da PA uma vez que estudos anteriores haviam registrado a PA e FC apenas ao final dos protocolos de 12 semanas de treinamento ou sedentarismo (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI., 2003; MARTINS et al., 2005; FELIX; MICHELINI, 2007; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; CERONI et al., 2009; CAVALLERI et al., 2011).

Observamos que a redução da PA e FC induzidos pelo treinamento foram progressivas nos hipertensos e apareceram mais precocemente que a redução da FC observada nos normotensos (4ª semana vs 8ª semana).

Amaral; Zorn; Michelini, 2000, que já haviam mostrado através do método de medida de pressão de cauda em ratos SHR_T que a queda da pressão arterial pós-T se inicia a partir da 4ª semana de T, dado que corrobora com a presente observação.

Trabalho anterior já havia demonstrado a correlação entre a redução da PAM e a redução da expressão de Aogen no NTS de hipertensos treinados (FELIX; MICHELINI, 2007). Nossos resultados mostrando que a expressiva redução do conteúdo de RNAm de Aogen no PVN e NTS de SHR precedem/ocorrem simultaneamente com a redução da PA e da FC neste grupo, sugerem que além da PA também a bradicardia de repouso possa ser condicionada por ajustes do SRA induzidos pelo treinamento em áreas autonômicas centrais. Também a instalação da bradicardia de repouso nos WKY, significativa a partir da 8ª semana, foi coincidente com a redução da expressão de Aogen e de AT₁R no RVL, reforçando a sugestão do envolvimento do SRA central na modulação da FC basal em normotensos treinados. Não temos, no momento, explicação plausível para o fato de ajustes diferenciais do SRA acontecerem em diferentes tempos e em diferentes áreas autonômicas. Esta constatação deverá ser o objetivo de futuros estudos.

Estudos prévios na literatura são concordantes em indicar hiperatividade do SRA na hipertensão e em outras patologias cardiovasculares (HOFFMAN;

PHILLIPS; SCHMID, 1977; RE, 1987; COX; BISHOP, 1991; BUNNEMANN et al., 1992; NISHIMURA, 1992; REID et al., 1992; STECKELINGS et al., 1992; MORISHITA, 2000; RE, 2001; MCKINLEY et al., 2003; SINGH; MEHTA, 2003; RE, 2004; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004; FERRARIO et al., 2006). Dados anteriores de nosso laboratório também demonstraram que: a) a elevação da PA na hipertensão induzida por coarctação subdiafragmática de aorta era acompanhada de ativação da angiotensina II plasmática e tecidual (SANTOS et al., 1995); b) que a expressão de RNAm de angiotensinogênio e receptores AT₁ em áreas bulbares encontrava-se aumentada neste mesmo modelo (SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004), assim como na hipertensão espontânea (FELIX; MICHELINI, 2007).

Os dados relativos à expressão do RNAm de receptor AT₁ no NTS também confirmaram a elevada expressão do SRA encefálico nos SHR, mostrando importante tendência à elevação tanto do AT₁R como do Aogen nas demais áreas autonômicas estudadas sugerindo adicionalmente a importância do SRA em orquestrar as alterações do controle cardiovascular observado em SHR.

Nossos dados mostram adicionalmente que: 1) o treinamento determina no PVN dos SHR intensa redução na expressão de RNAm Aogen já a partir da 2ª semana, com manutenção desta até o final do treinamento; 2) há também nos SHR treinados redução do RNAm de Aogen no NTS, que no entanto se expressa mais tardiamente, a partir da 4ª semana de treinamento; 3) o treinamento determina redução tardia (T₁₂) mas significativa da expressão de RNAm de AT₁R no PVN e NTS dos SHR.

Dados anteriores de nosso laboratório já haviam demonstrado através da técnica de hibridização em situ que havia após 12 semanas de treinamento aeróbio, redução significativa da expressão de RNAm de Aogen no NTS de SHR (FELIX; MICHELINI, 2007). Os dados do presente trabalho ampliam portanto, esta observação anterior, demonstrando que a redução da expressão de Aogen subsequente ao treinamento nos SHR é mais abrangente, aparecendo em diferentes áreas de controle autonômico como o PVN (onde se situam os corpos celulares dos neurônios pré- autonômicos que modulam o funcionamento das áreas bulbares de integração), sendo inclusive bem mais precoce do que originalmente suposto. Houve quedas significativas no PVN a partir da 2ª semana de treinamento e a partir da 4ª semana no NTS.

As alterações na expressão de Aogen no PVN e NTS de SHR induzidas pelo treinamento foram praticamente simultâneas e/ou anteriores à instalação da bradicardia de repouso e à queda da PA, sugerindo uma relação causa-efeito e que a redução da atividade do SRA poderia contribuir para a diminuição da atividade simpática que acompanha o treinamento de SHR (CERONI et al., 2009). Interessante observar-se que em ambas as áreas (PVN e NTS) dos SHR a redução significativa na expressão do receptor AT_1 ocorreu bem mais tardiamente (semana 12) e após a instalação dos efeitos benéficos do treinamento (a partir da semana 4). Esta observação sugere a ocorrência no PVN e NTS dos SHR da ativação/desativação de uma outra via do SRA que não propriamente a redução da expressão de receptores AT_1 (e consequentemente dos efeitos da Ang II) na mediação dos efeitos benéficos do treinamento. A participação do eixo ECA2-Ang 1-7- receptor MAS, o eixo vasodilatador antitrófico e antiproliferativo do SRA (FENG, et al., 2010; FERRARIO, 2011) na mediação destas respostas deverão ser investigados em trabalho futuro.

Nesta linha de raciocínio Xia e Lazartigues (2008) demonstraram em camundongos “knockout” para o gene da ECA2 um aumento pequeno, mas significativo da PA acompanhado de redução da sensibilidade baroreflexa e aumento do simpático. Além disso, Feng et al. (2010), utilizando camundongos transgênicos com expressão aumentada de ECA2 demonstraram a habilidade desta enzima em converter Ang II em Ang-(1-7) e em atenuar a hipertensão neurogênica, o que sugeria a participação do eixo ECA2- Ang-(1-7)- receptor MAS no controle neural da PA.

Entretanto, os efeitos benéficos do treinamento na redução da FC basal dos WKY foram condicionados por redução simultânea da expressão do Aogen e do receptor AT_1 no RVL, sugerindo a importância da redução da atividade do eixo ECA-Ang II- receptor AT_1 , o eixo vasoconstritor, trófico e proliferativo na mediação da bradicardia de repouso de normotensos subsequente ao treinamento. Em outro modelo experimental, o da insuficiência cardíaca, Mousa et al (2008) já haviam relatado redução do conteúdo de AT_1R no RVL de coelhos após treinamento. Em conjunto, estes dados indicam que o treinamento altera a atividade do SRA em áreas de controle autonômico, mas o faz de forma diferencial em normotensos (redução do eixo ECA- Ang II – receptor AT_1) e hipertensos (possível aumento do

eixo ECA2- Ang 1-7 – receptor MAS, modificando preferencialmente a modulação no RVL (normotensos) e PVN e NTS (hipertensos).

Independente de alterações no eixo vasoconstritor e/ou vasodilatador do SRA, os dados do presente trabalho também indicaram um efeito precoce do treinamento em reduzir a síntese do Aogen, o precursor da síntese de angiotensinas, sugerindo uma via preferencial – a da redução do precursor e consequentemente da atividade de todo SRA – através da qual o treinamento pode se contrapor à elevação de PA nos hipertensos e facilitar a instalação de bradicardia de repouso em ambos os grupos. Estudos da literatura já haviam mostrado que o bloqueio da formação do Aogen circulante, através de transfecção com nucleotídeos antisense, provocava queda da PA (TOMITA et al. 1995a,b; WIELBO et al., 1996), enquanto que a administração aguda de Aogen resultava em aumento significativo da PA (BOUNHNIK et al., 1982). Além disso, outros estudos já haviam sugerido que o gene do Aogen é um possível determinante da hipertensão (JEUNEMAITRE et al., 1992; KIMURA et al., 1992; CAULFIELD et al., 1992; KAMITANI et al., 1994). Estas constatações, em conjunto com observações do presente trabalho ressaltam a importância do treinamento em se contrapor a um dos fatores determinantes da hipertensão, reduzindo preferencialmente a proteína precursora do SRA, a qual se reflete diretamente na redução do conteúdo de Ang II.

Em células hepáticas, demonstrou-se que a Ang II auxilia na estabilização do RNAm de Aogen e diminui a sua degradação, contribuindo para o aumento da sua expressão gênica e secreção (KLETT et al., 1996). Estas observações sugerem que a síntese de Aogen, (o precursor de toda a cascata de angiotensinas), bem como o controle de sua secreção são etapas de fundamental importância para a instalação da hipertensão, podendo contribuir quando bloqueados, para a redução da PA.

Estudos prévios também relataram queda da Ang II circulante após treinamento aeróbio (HESPEL et al., 1988; LIU et al., 2000). A Ang II circulante é capaz de ativar os órgãos circunventriculares (desprovidos barreira hematoencefálica), estimulando a liberação de neurotransmissores, e ativando circuitos neuronais em áreas do controle cardiovascular como o PVN (LEBRUN et. al., 1996; FERGUNSON; WASHBURN; LATCHFORD, 2001). Desta forma, pode-se supor que a redução da Ang II circulante induzida pelo treinamento estimularia menos os neurônios dos órgãos circunventriculares, reduzindo a liberação de

neurotransmissores e a própria produção de Ang II local, o que também contribuiria para a redução da PA e FC basais.

6 CONCLUSÕES

Em síntese, nossos dados indicam que a queda de PA e a instalação da bradicardia de repouso (efeitos benéficos do treinamento aeróbio de baixa intensidade) são progressivos e aparecem mais precocemente nos SHR que nos WKY. Além disso, são acompanhadas/precedidas de redução da expressão gênica e protéica de Aogen no PVN e NTS dos SHR e da redução da expressão gênica e protéica de Aogen e AT₁R no RVL dos WKY, as quais contribuem para a adaptação dos parâmetros cardiovasculares induzida pelo exercício repetitivo.

REFERÊNCIAS*

- AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, p. 814-826, 2011.
- AMARAL, S. L.; SANCHEZ, L. S.; CHANG, A. J.; ROSSONI, L. V.; MICHELINI, L. C. Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 424-431, 2008.
- AMARAL, S. L.; SILVEIRA, N. P.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 19, p. 931-940, 2001.
- AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 18, p. 1563-1572, 2000.
- BEZERRA, S. M. M. S.; SANTOS, C. M.; MOREIRA, E. D.; KRIEGER, E. M.; MICHELINI, L. C. Chronic AT1 receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. **Hypertension**, v. 38, p. 569-575, 2001.
- BLAIR, S. N.; KOHL, H. W.; BARLOW, C. E.; PAFFENHAGER, R. S. Jr.; GIBBONS, L. W.; MACERA, C. A. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 273, p. 1093-1098, 1995.
- BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M. A.; SHERWOOD, A.; CRAIGHEAD, L.; LIN, P. H.; JOHNSON, J.; WATKINS, L. L.; WANG, J. T.; KUHN, C.; FEINGLOS, M.; HINDERLITER, A. Effects of the dietary approaches to stop hypertension diet alone and in combination with exercise and caloric restriction on insulin sensitivity and lipids. **Hypertension**, v. 55, p. 1199-1205, 2010.
- BOUHNICK, J.; CLAUSER, E.; STROSBURG, D.; FRENOY, J. P.; MENARD, J.; CORVOL, P. Rat angiotensinogen and des (angiotensin I) angiotensinogen: purification, characterization and partial sequencing. **Biochemistry**, v. 20, p. 7010-7015, 1982.
- BRAGA, D. C.; MORI, E.; HIGA, K.T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L.C. Central oxytocin modulates exercise induced tachycardia. **Ain. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 278, p. R1474-R1482, 2000.
- BRUM, P. C.; DA SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, p. 1018-1022, 2000.
- BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F.W. Intra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell. Tissue Res.**, v. 186, p. 423-433. 1978.

BUNNEMANN, B.; IWAI, N.; METZGER, R.; FUXE, K.; IGANAMI, T.; GANTEN, D. The distribution of angiotensin II AT1 receptor subtype mRNA in the rat brain. **Neurosci. Lett.**, v. 142, p. 155-158, 1992.

BURGER, H. R.; CHANDLER, M. P.; RODENBAUGH, D. W.; DICARLO, S. E. Dynamic exercise shifts the operating point and reduces the gain of the arterial baroreflex in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. R2043-R1048, 1998.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 30-40, 2001.

CAMPBELL, D. J.; HABENER, J. F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of rat. **J. Clin. Invest.**, v. 78, p. 31-39, 1986.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension: Part I: definition and etiology. **Circulation**, v. 101, p. 329-335, 2000.

CAULFIELD, M.; LAVENDER, P.; FARRALL, M.; MUNROE, P.; LAWSON, M.; TURNER, P.; CLARK A. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 169-180, 1992.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, p. R958-R966, 2011.

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

CHAAR, L. J. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina-angiotensina em núcleos autonômicos de ratos normotensos e hipertensos.** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CHENG, C.; DASKALAKIS, C.; FALKNER, B. Alterations in capillary morphology are found in mild blood pressure elevation. **J. Hypertens.**, v. 28, p. 2258-2266, 2010.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, H. L.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCCELLA, E. J. 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. **Hypertension**, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

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

CLÉROUX, J.; FELDMAN, R. D.; PETRELLA, R. J. Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. 4. Recommendations on physical exercise training. Canadian Hypertension Society , Canadian Coalition for High Blood Pressure Prevention and Control, Laboratory Centre for Disease Control at Health Canada, Heart and Stroke Foundation of Canada. **CMAJ**, v. 160, p. S21-S28, 1999.

COIMBRA, R.; SANCHEZ, L. S.; POTENZA, J. M.; ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in females spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 52, p. 514-521, 2008.

COX, B. F.; BISHOP V. S. Neural and humoral mechanisms of angiotensin-dependent hypertension. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. H1284-H1291, 1991.

CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; HERRERA, M. J.; RUIZ, P.; GRIFFITHS, R.; KUMAR, A. P.; KIM, H. S.; SMITHIES, O.; LE, T. H.; COFFMAN, T. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 17985-17990, 2006.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 323-364, 1994.

DIBONA, G. F.; JONES, S. Y.; BROKKS, V. L. Ang II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. R1189-R1196, 1995.

DICARLO S. E.; BISHOP V. S. Onset of exercise shifts operating point of arterial baroreflex to higher pressures. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. H303-H307, 1992.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol.**, v. 43, p. R1271-R1282, 1997.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; POLANCZYK, C. A.; HOMRICH, C. S.; ROSA, R.S.; ACHUTTI, A. C. Fatores de risco para doenças não-transmissíveis em área metropolitana na região sul do Brasil. Prevalência e simultaneidade. **Rev. Saude Publica**, v. 27, p. 43-48, 1993.

DZAU, V. J.; BRODY, T.; ELLISON, K. E.; PRATT, R. E.; INGELFINGER, J. R. Tissue specific regulation of renin expression in the mouse. **Hypertension**, v. 9, p. 36-41, 1987.

DZAU, V. J.; BURT, D. W.; PRATT, R. E. Molecular biology of the renin angiotensin system. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. F563-F573, 1988.

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 solitarius. **Hypertension**, v. 50, p. 780-785, 2007.

FENG, Y.; XIA, H.; CAI, Y.; HALABI, C. M.; BECKER, L. K.; SANTOS, R. A.; SPETH, R. C.; SIGMUND, C. D.; LAZARTIGUES, E. Brain-selective overexpression of human Angiotensin-converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension. **Circ. Res.**, v. 106, p. 373-382, 2010.

FERGUSON, A. V.; WASHBURN, D. L.; LATCHFORD, K. J. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. **Exp. Biol. Med.**, v. 226, p. 85-96, 2001.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N. Y. ; MAGALHAES, F. C. ; FERNANDES, F. B. ; CASARINI, D. E. ; CARMONA, A. K. ; KRIEGER, J. E. ; PHILLIPS, M. I. ; OLIVEIRA, E. M. Aerobic Exercise Training-Induced Left Ventricular Hypertrophy Involves Regulatory MicroRNAs, Decreased Angiotensin-Converting Enzyme-Angiotensin II, and Synergistic Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin (1-7). **Hypertension**, v. 58, p. 182-189, 2011.

FERRARIO, C. M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 7, p. 3-14, 2006.

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, p. 535-541, 1997.

FERRARIO, C. M. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 20, p. 1-6, 2011.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol. Rev.**, v. 62, p. 347-504, 1982.

FRANÇA, T. R.; MICHELINI, L. C. Alterações de reatividade do trem posterior durante e após exercício dinâmico: Efeitos da hipertensão e do treinamento físico. **J. Hipertens.**, v. 3, p. 1009, 2001.

GADEMAN, M. G.; SWENNE, C. A.; VERWEY, H. F.; VAN DER LAARSE, A.; MAAN, A. C.; VAN DE VOOREN, H.; VAN PELT, J.; VAN EXEL, H. J.; LUCAS, C. M.; CLEUREN, G. V.; SOMER, S.; SCHALIJ, M. J.; VAN DER WALL, E. E. Effect of exercise training on autonomic derangement and neurohumoral activation in chronic heart failure. **J. Card. Fail.**, v. 13, p. 294-303, 2007.

GAO, L.; WANG, W.; LI, Y. L.; SCHULTZ, H. D.; LIU, D.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 Receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. H2271-H2279, 2005.

GAVA N. S.; VERAS-SILVA, A. S.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac β -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, p. 1129-1133, 1995.

GILSBACH, R.; KOUTA, M.; BÖNISCH, H.; BRÜSS, M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. **Biotechniques**, v. 40, p. 173-177, 2006.

GIRONACCI, M. M.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M.; GORZALCZANY, S. VERRILLI, M. A.; PASCUAL, M.; TAIRA, C.; PEÑA, C. Increased hypothalamic angiotensin (1-7) levels in rats with aortic coarctation-induced hypertension. **Peptides**, v. 28, p. 1580-1585, 2007.

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

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; CALHOUN, D. A.; MANCIA, G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. **Hypertension**, v. 23, p. 294-301, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. JR.; NORMAN, R. A. JR. The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. eds., **Hypertension: pathophysiology, diagnostic and management**. New York: Raven Press, 1995, p. 1311-1326.

HARRAP, S. B. Causes and effects of high blood pressure: a longitudinal approach to genetic cosegregational analysis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 12, p. S99-S109, 1988.

HESPEL, P.; LIJNEN, V. H. R.; FAGARD, R.; GOOSSENS, W.; LISSENS, W.; MOERMAN, E.; AMERY, A. Effects of physical endurance training on the plasma renin-angiotensin-aldosterone system in normal man. **J. Endocrinol.**, v. 116, p. 443-449, 1988.

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, p. R537-R545, 2002.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol. Ther.**, v. 102, p. 87-96, 2004.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; SILVA, F. C.; SILVA, H. M.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 292, p. R1717-R1727, 2007.

HOFFMAN, W. E.; PHILLIPS, M. I.; SCHMID, P. G. Central angiotensin II-induced responses in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 232, p. H426-H433, 1977.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, p. 312-318, 2000.

JACKSON, K.; SILVA, H. M.; ZHANG, W.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **J. Neurophysiol.**, v. 94, p. 3211-3220, 2005.

JEUNEMAITRE, X.; SOUBRIER, F.; KOTELEVETSEV, Y. V.; LIFTON, R. P.; WILLIAMS, C. S.; CHARRU, A.; HUNT, S. C.; HOPKINS, P. N.; WILLIAMS, R. R.; LALOUEL, J. M.; CORVOL, P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**, v. 71, p. 169-180, 1992.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. **J. Comp. Neurol.**, v. 233, p. 308-332, 1985a.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. **J. Comp. Neurol.**, v. 233, p. 333-349, 1985b.

KALIA, M.; WOODWARD, D. J.; SMITH, W. K. FUXE, K. Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. **J. Comp. Neurol.**, v. 233, p. 350-364, 1985c.

KAMITANI, A.; RAKUGI, H.; HIGAKI, J.; YI, Z.; MIKANI, H.; MIKI, T.; OGIHARA, T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. **J. Hum. Hypertens.**, v. 8, p. 521-524, 1994.

KAR, S.; GAO, L.; ZUCKER, I. H. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v. 108, p. 923-32, 2010.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; GAMLIEL-LAZAROVICH, A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovasc. Res.**, v. 73, p. 463-469, 2007.

KIMURA, S.; MULLINS, J. J.; BUNNEMANN, B.; METZGER, R.; HILGENFELDT, U.; ZIMMERMAN, F.; JACOB, H.; FUXE, K.; GANTEN, D.; KALLING, M. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. **EMBO J.**, v. 11, p. 821-827, 1992.

KLETT, C. P.; ANDERSON, D.; SHOLOOK, M.; GRANGER, J. P. Antisense oligodeoxynucleotides directed against a novel angiotensinogen mRNA-stabilizing protein reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p. R619-R626, 2004.

KLETT, C. P.; PRINTZ, M. P.; BADER, M.; GANTEN, D.; EGGENA, P. Angiotensinogen messenger RNA stabilization by angiotensin II. **Hypertension**, v. 14, p. S25-S36, 1996.

LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P.; LACOLLEY, P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. **Hypertension**, v. 45, p. 1050-1055, 2005.

LAURENT, S.; BRIET, M.; BOUTOUYRIE, P. Large and small artery cross-talk and recent morbidity-mortality trials in hypertension. **Hypertension**, v. 54, p. 388-392, 2009.

LEBRUN, C. J.; BLUME, A.; HERDEGEN, T.; MOLLENHOFF, E.; UNGER, T. Complex activation of inducible transcription factors in the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats following central angiotensin II administration. **Regul. Pept.**, v. 66, p. 19-23, 1996.

LI, L.; YI-MING, W.; LI, Z. Z.; ZHAO, L.; YU, Y. S.; LI, D. J.; XIA, C. Y.; LIU, J. G.; SU, D. F. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacol. Res.**, v. 58, p. 196-201, 2008.

LIU, J. L.; IRVINE, S.; REID, I. A.; PATEL, K. P.; ZUCKER, I. H. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: a role for angiotensin II. **Circulation**, v. 102, p. 1854-1862, 2000.

LOUTZENHISER, R.; BIDANI, A.; CHILTON, L. Renal myogenic response kinetic attributes and physiological role. **Circ. Res.**, v. 90, p. 1316-1324, 2002.

LU B, YANG XJ, CHEN K, YANG DJ, YAN JQ. Dietary sodium deprivation evokes activation of brain regional neurons and down-regulation of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-conversion enzyme mRNA expression. **Neuroscience**, v. 164, p. 1303-1311, 2009.

MANCIA, G.; GRASSI, G. Antihypertensive treatment: past, present and future. **J. Hypertension**, v. 16, p. 1-7, 1998.

MARTINEZ-LEMOIS, L. A.; HILL, M. A.; MEININGER, G. A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology**, v. 24, p. 45-57, 2009.

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

MCKINLEY, M. J.; ALBINTON, A. L.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MY, C. N.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; MENDELSON, F. A. O.; CHAI, S. Y. The brain rennin angiotensin system: location and physiological roles. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 35, p. 901-918, 2003.

MELDGAARD, M., FENGER, C., LAMBERTSEN, K. L., PEDERSEN M. D., LABEDY, R., FINSEN, B. Validation of two reference genes for mRNA levels studies of murine disease models in neurobiology. **J. Neurosci.**, v. 156, p. 101-110, 2006.

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

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic preautonomic neurons on circulatory control: Reflex mechanisms and changes during exercise. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, p. 369-376, 2007a.

MICHELINI, L. C. Oxytocin into the NTS: a new modulator of cardiovascular control during exercise. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 940, p. 206-220, 2001.

MICHELINI, L. C. Regulação da Pressão Arterial: Mecanismos Neuro-hormonais. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MICHELINI, L. C. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 9, p. 214-221, 2007b.

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

MICHELINI, L. C.; OLIVEIRA, M.; SANTOS, M. Baroreceptor reflex control of heart rate during development of coarctation hypertension. **Hypertension**, v. 19, p. 159-163. 1992.

MICHELINI, L. C.; MORRIS M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular response to exercise. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 897, p. 198-211, 1999.

MICHELINI, L. C.; MORRIS, M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 897, p. 198-211, 1999.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp. Physiol.**, v. 94, p. 947-960, 2009.

MIKINES, K. J.; SONNE, B.; TRONIER, B.; GALBO H. Effects of training and detraining on dose-response relationship between glucose and insulin secretion. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. E588-E596, 1989.

MITCHELL, J. H. Neural control of the circulation during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 22, p. 141-154, 1990.

MORISHITA, R.; GIBBONS, G. H.; TOMITA, N.; ZHANG, L.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T.; DZAU V. J.. Antisense oligodeoxy-nucleotide inhibition of vascular angiotensin-converting enzyme expression attenuates neointimal formation: evidence

for tissue angiotensin-converting enzyme function. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 915-922, 2000.

MOUSA, T. M.; LIU, D.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v. 104, p. 616–624, 2008.

MULVANY, M. J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News Physiol. Sci.**, v. 17, p. 105-109, 2002.

MUNTNER, P. H. E. J.; ROCCELLA, E. J.; WHELTON, P. K. The impact of JNC-VI guidelines on treatment recommendations in the us population. **Hypertension**, v. 39, p. 897-902, 2002.

NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E. A.; WITKINS, J.; MICHAELS, J.; HOFFMAN, D.; SILVERMAN, A. J. Magnocellular hypothalamic projection to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. **Neuroendocrinology**, v. 30, p. 150-158, 1980.

NISHIMURA, M. L.; MILSTED, A.; BOLCK, C. H.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C.M. Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension. **Hypertension**, v. 20, p. 158-167, 1992.

OBATA, J.; NAKAMURA, T.; TAKANO, H.; NAITO, A.; KIMURA, H.; YOSHIDA, Y.; SHIMIZU, F.; GUO, D. F.; INAGAMI, T. Increased gene expression of components of the renin-angiotensin system in glomeruli of genetically hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 18, p. 1247-1255, 2000.

PALKOVITS, M. The anatomy of central cardiovascular neurons. In: FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, B.; HÖKFELT, T. eds. **Central adrenalin neurons: basic aspects and their role in cardiovascular functions**. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 3-17.

PATEL, K. P.; SCHIMID, P. G. Role of paraventricular nucleus (PVN) in baroreflex-mediated changes in lumbar sympathetic nerve activity and heart rate. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 22, p. 211-219, 1988.

PAULIS, L.; UNGER, T. Novel therapeutic targets for hypertension. **Nat. Rev. Cardiol.** v. 7, p. 431-441, 2010.

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

PHILLIPS M. I.; KIMURA B. Brain angiotensinogen in the developing spontaneously hypertensive rat. **J. Hypertens.**, v. 6, p. 607-612, 1988.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci. Lett.**, v. 339, p. 62-66, 2003.

RE, R. N. Mechanisms of disease: local rennin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc.**, v. 88, p.19-38, 2004.

RE, R. N. The clinical implication of tissue rennin angiotensin systems. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 16, p. 317-327, 2001.

RE, R. N. The renin-angiotensin systems. **Med. Clin. North. Am.**, v.71, p. 877-895, 1987.

REID, I. A. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. E763-E778, 1992.

ROWELL L. B. Reflex control of the circulation during exercise. **Int. J. Sports Med.**, v. 13, p. S25-S27, 1992.

ROWELL, L. B.; O' LEARY, D. S. Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. **J. Appl. Physiol.**, v. 69, p. 407-418, 1990.

SANGALETI, C. T.; CRESCENZI, A.; MICHELINI, L. C. Endogenous angiotensin and pressure modulate brain angiotensinogen and AT1A mRNA expression. **Hypertension**, v. 43, p. 317-323, 2004.

SANTOS, C. M.; MOREIRA, E. D.; KRIEGER, E. M.; MICHELINI, L. C. Chronic AT1 receptor blockade alters aortic nerve activity in hypertension. **Hypertension**, v. 31, p. 973-977, 1998.

SANTOS, C. M.; PONTIERI, V.; LEOMIL NETO, M.; MICHELINI, L. C. Losartan improves baroreflex control of heart rate of coarcted hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. H812-H818, 1995.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 8258-8263, 2003.

SAWCHENKO P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 205, p. 260-272, 1982.

SAWCHENKO, P.; SWANSON, L. W. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. **Science**, v. 214, p. 685-687, 1981.

SCHEFE, J. H.; LEHMANN, K. E.; BUSCHAMANN, I. R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **J. Mol. Med.**, v. 84, p. 901-910, 2006.

SINGH, B. M.; MEHTA, J. L. Interactions between the rennin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. **Arch. Int. Med.**, v. 163, p. 1296-1304, 2003.

SMIDT, N.; VET, H. C. W.; BOUTER, L. M.; DEKKER, J. Effectiveness of exercise therapy: A bets- evidence summary of systematic reviews. **Aust. J. Physiother.**, v. 51, p. 71-85, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. 6ª Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 95, p. 1-51, 2010.

SOFRONIEW, M. V.; SCHRELL, U. Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 22, p. 211-217, 1981.

SOUZA, C. G.; MICHELINI, L.C.; FIOR-CHADI, D. R. Receptor changes in the nucleus tractus solitarii of the rat after exercise training. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, p. 1471-1476, 2001.

STECKELINGS, U. M.; KASCHIMA, E. UNGER, T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. **Peptides**, v. 26, p. 1401-1409, 2005.

STECKELINGS, U. M.; OBERMULLER, N.; BOTTARI, S. P.; QADRI, F.; VELTMAR, A.; UNGER, T. Brain angiotensin: receptors, actions and possible role in hypertension. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 70, p. S23-S27, 1992.

SUI, X.; LAMONTE, M. J.; BLAIR, S. N. Cardiorespiratory fitness and risk of nonfatal cardiovascular disease in women and men with hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 20, p. 608-615, 2007.

TAKAHASHI, S.; FUKAMIZU, A.; HASEGAWA, T.; YOKOYAMA, M.; NOMURA, T.; KATSUKI, M.; MURAMAKI, K. Expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice and cultured cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 180, p. 1103-1109, 1991.

TANG, H.; PAVEL, J.; SAAVEDRA, J. M.; BRIMIJOIN, S. Type-1 angiotensin receptors are expressed and transported in motor and sensory axons of rat sciatic nerves. **Neuropeptides**. v. 43, p. 81-92, 2009.

TAYLOR, N. F.; DODD, K. J.; SHIELDS, N.; BRUDER, A. Therapeutic exercise in physiotherapy practice is beneficial: a summary of systematic reviews 2002-2005. **Aust. J. Physiother.**, v. 53, p. 7-16, 2007.

TIPTON, C. M. Exercise training for treatment of hypertension: a review. **Clin. J. Sports Med.**, v. 9, p. 104, 1999.

TOKUYAMA, W.; HASHIMOTO, T.; LI, Y. X. O.; KUNO, H.; MIYADHITA, Y. Quantification of neurotrophin-3 mRNA in the rat hippocampal subregions using the RT-PCR-based coamplification method. **Brain. Res. Brain Res. Protoc.**, v. 4, p. 407-414, 1999.

TOMITA, N.; MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; AOKI, M.; NAKAMURA, Y.; MIKAMI, H.; FUKAMIZU, A.; MURAKAMI, K.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T. Transient decrease in high blood pressure in vivo transfer of antisense oligodeoxynucleotides against rat angiotensinogen. **Hypertension**, v. 26, p. 131-136, 1995a.

TOMITA, N.; MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; TOMITA, S.; AOKI, M.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T. Role of angiotensinogen in blood pressure regulation in normotensive rats: application of a "loss of function" approach. **J. Hypertens.**, v. 13, p. 1767-1774, 1995b.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. **Antiox. Redox Signal**, v. 7, p. 1302-1314, 2005.

VARAGIC, J.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C.M. New angiotensins. **J. Mol. Med.**, v. 86, p. 663-671, 2008.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 191-202, 2003.

VÉRAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N. S.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 273, p. H2627-H2631, 1997.

WAN, W.; POWERS, A. S.; LI, J.; ERIKSON, J. M.; ZHANG, J. Q. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. **Am. J. Med. Sci.** v. 334, p. 265-273, 2007.

WHELTON, S. P.; CHIN, A.; XIN, X.; HE, J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Ann. Int. Med.**, v. 136, p. 493-503, 2002.

WIELBO, D.; SIMON, A.; PHILLIPS, M. I.; TOFFOLO, S. Inhibition of hypertension by peripheral administration of antisense oligodeoxynucleotides. **Hypertension**, v. 28, p. 147-151, 1996.

WILLIAMS, A. M. An osteopathic cardiologist's review of hypertension: beyond the Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **J. Am. Osteopath Assoc.**, v. 94, p. 833-847, 1994.

XIA, H.; LAZARTIGUES, E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. **J. Neurochem.**, v. 107, p.1482-1494, 2008.

YASMIN, O'SHAUGHNESSY, K. M. Genetics of arterial structure and function: towards new biomarkers for aortic stiffness? **Clin. Sci.**, v. 114, p. 661-677, 2008.

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