KATIA BURGI

AJUSTES DA ATIVIDADE SIMPÁTICA PERIFÉRICA
PROMOVIDOS PELO TREINAMENTO AERÓBIO EM
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: EFEITOS DA
REMOÇÃO SELETIVA DOS BARORECEPTORES
ARTERIAIS

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Fisiologia Humana).

São Paulo
2012

KATIA BURGI

AJUSTES DA ATIVIDADE SIMPÁTICA PERIFÉRICA
PROMOVIDOS PELO TREINAMENTO AERÓBIO EM
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: EFEITOS DA
REMOÇÃO SELETIVA DOS BARORECEPTORES
ARTERIAIS

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelinini

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

Burgi, Katia.

Ajustes da atividade simpática periférica promovidos pelo treinamento aeróbio em normotensos e hipertensos: efeitos da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais / Katia Burgi. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof^a Dr^a Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Ajustes periféricos e centrais do controle cardiovascular na hipertensão e normotensão: efeitos do treinamento físico.

Versão do título para o inglês: Training-induced adjustments of peripheral sympathetic activity in normotensive and hypertensive rats: effects of sinoaortic denervation.

1. Treinamento físico 2. Hipertensão 3. Barorreceptor 4. Desnervação sinoaórtica I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB038/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Katia Burgi.

Título da Tese: Ajustes da atividade simpática periférica promovidos pelo
treinamento aeróbio em normotensos e hipertensos: efeitos
da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais.

Orientador(a): Lisete Compagno Michelini.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 014 nas fls. 54 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Lisete Compagno Michelin, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Ajustes da atividade simpática periférica promovidos pelo treinamento físico em normotensos e hipertensos: efeitos da remoção seletiva dos baroreceptores arteriais"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Katia Burgi , Marina Tuppy , Maria Tereza Jordão** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **29.04.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de abril de 2008.

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

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

Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima. "

(Louis Pasteur)

***DEDICO ESTA TESE A MINHA MÃE WINTJE JACOB
APERLOO BURGI E A MEU PAI RODOLFO BURGI, SEM OS
QUAIS NÃO HAVERIA MOTIVAÇÃO ALGUMA
PARA SEGUIR EM FRENTE.***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Lisete Compagno Michelini, por ter acreditado em mim e me dado à oportunidade de trabalhar ao seu lado e acima tudo pela grande contribuição para minha formação tanto científica como ser humano.

Ao Alexandre Ceroni por todo apoio tanto técnico quanto pessoal, essa tese não ficaria pronta sem a sua ajuda. Muuuuuito obrigada.

À prima/irmã/amiga Marina por toda a ajuda, amizade e apoio.

Ao pessoal da Secretaria, José Maria e Biblioteca do ICB I, pelos valiosos auxílios recebidos.

À grande amiga Tereza por todo apoio e amizade!!!!!! Muito obrigada gorda!!!!!! Obrigada pelo bom humor matinal e pelas vaaaarias rizadas!!

A mais nova integrante do laboratório, Josi, que em pouco tempo cativou meu coração e se tornou uma grande amiga, obrigada pela ajuda tanto científica como pessoal e claro pelas váaaaaarias cervejas!!!!

Ao meu marido/amigo/companheiro Robson Stalyn por todo apoio, carinho, compreensão e pelos momentos que se dispôs da minha presença para que eu cumprisse esta etapa. Te amo!!!

Aos meus pais por todo apoio que sempre me deram. Nunca chegaria até aqui sem o incentivo de vocês. Muuuuuito obrigada.

Aos meus irmãos, Karina e Patrick pelo carinho e amizade que sempre tiveram por mim.

A FAPESP, pelo grande auxílio financeiro que propiciou a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram me incentivando e apoiando, nesta jornada.

Obrigada por tudo!!!!!!

RESUMO

BURGI, K. Ajustes da atividade simpática periférica promovidos pelo treinamento aeróbio em normotensos e hipertensos: Efeitos da remoção seletiva dos baroreceptores arteriais. 2012. 71 f. Phd thesis (Doutorado em Fisiologia – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Hipertensão arterial frequentemente associada à elevada morbimortalidade é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. Por outro lado o treinamento aeróbio de baixa intensidade (T) ao reduzir a pressão arterial (PA) de hipertensos e a frequência cardíaca (FC) de hipertensos e normotensos tem-se mostrado um importante coadjuvante no tratamento da hipertensão e na melhoria do controle autonômico. No presente trabalho investigamos em ratos hipertensos espontâneos (SHR) e seus controles normotensos (WKY) os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática a diferentes territórios, bem como os efeitos da remoção seletiva dos baroreceptores arteriais sobre a atividade simpática. SHR e WKY foram submetidos à desnervação sino-aórtica (SAD) ou cirurgia fictícia (SHAM) e alocados aos grupos T (50-60% da capacidade máxima, 1 hora/dia, 5 dias/semana) ou mantidos sedentários (S) por 3 meses. Ao final dos protocolos foram cronicamente canulados para registro da PA e FC basais e teste da eficácia da desnervação sino-aórtica (fenilefrina e nitroprussiato de sódio *iv*). Foram a seguir profundamente anestesiados para a obtenção dos tecidos cardíaco, renal, muscular esquelético (músculos locomotores e não locomotores) e vascular, que foram processados pela imunofluorescência (reatividade para a Tirosina-Hidroxilase, THir) e HPLC (dosagem de noradrenalina, NOR). Outros grupos de SHR e WKY, S e T, foram utilizados para registro da atividade dos nervos simpáticos lombar (LSNA) e renal (RSNA). SHR vs WKY apresentavam elevada PAM e FC basais (180 ± 2 mmHg e 359 ± 6 b/min, correspondendo a elevações de 38% e 16% respectivamente), aumento da RSNA ($62 \pm 4\%$), elevado conteúdo de NOR nos rins (+34%), coração (+17%) e supra-renal (+26%), bem como maior THir em arteríolas do coração e rins (+62% e +66%, respectivamente). O T determinou aumento similar no desempenho em esteira de SHR e WKY de ambos os grupos, SAD e SHAM. Nos grupos SHAM o T foi acompanhado de reduções significativas da FC (289 ± 5 e 323 ± 7 b/min nos WKY_T e SHR_T) e da PAM apenas nos SHRT (162 ± 5 mmHg). T também determinou nos WKYT redução da LSNA (-75%), do conteúdo de NOR nas artérias femorais (-48%) e da THir em arteríolas de músculos locomotores (-45%), do conteúdo de NOR no coração e rins (~20%), bem como na expressão de THir em arteríolas cardíacas e renais (-19% e -43%, respectivamente). Nos SHR o T determinou reduções do conteúdo de NOR no coração (-43%), rins (-24%), supra-renal (-38%) e aorta (-41%), que foram acompanhadas de redução da expressão de THir em arteríolas do coração (-47%) e rins (-19%), mas houve aumento do conteúdo de NOR em artérias femorais (+56%) e músculo sóleo (+25%), os quais também foram acompanhados de alterações proporcionais na expressão de THir em arteríolas musculares esqueléticas exercitadas (em média +55%, sem alteração nas arteríolas do músculo temporal). Concordante com estes resultados os SHRT também apresentaram elevação da LSNA quando comparados aos SHRS (+25%), a qual foi acompanhada de normalização da razão parede/luz de arteríolas musculares esqueléticas. A SAD aboliu todos os efeitos desencadeados pelo T nos WKY e SHR. Nossos dados demonstraram que as adaptações induzidas pelo T no simpático periférico são tecido-específicas e dependem da linhagem experimental: redução do simpático ao coração e rins de WKY e SHR, com redução da atividade simpática ao músculo esquelético nos WKY treinados, mas aumentado nos SHR treinados, os quais apresentam simultaneamente extenso remodelamento vascular. Nossos dados demonstraram ainda, que as adaptações do simpático induzidas pelo T dependem da integridade dos baroreceptores arteriais.

Palavras-chave: Treinamento físico. Hipertensão. Atividade Simpática. Músculo Esquelético. Rim. Coração. Imunohistoquímica. Eletroneuronografia. Cromatografia Líquida de Alta Performance.

ABSTRACT

BURGI, K. Training-induced adjustments of peripheral sympathetic activity in normotensive and hypertensive rats: Effects of sinoaortic denervation. 2012. ...f. PhD thesis (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade São Paulo, São Paulo, 2011.

Hypertension is often associated with high morbidity and mortality and is an important risk factor for cardiovascular disease. On the other hand, the low-intensity aerobic training (T) reduces arterial pressure (AP) of hypertensive individuals and heart rate (HR) in normotensive and hypertensive patients. T has shown to be an important adjuvant in the treatment of hypertension since it improves autonomic control. In the present study we investigate in spontaneous hypertensive rats (SHR) and their normotensive controls (WKY) the effects of exercise training on sympathetic activity to different territories and the effects of the selective removal of arterial baroreceptors on sympathetic activity. SHR and WKY were subjected to sinoaortic denervation (SAD) or sham surgery (SHAM) and submitted to T (50-60% of maximum capacity, 1 hour / day, 5 days/week) or kept sedentary (S) for 3 months. At the end of the protocols the rats were chronically cannulated for recording baseline AP and HR and to test the effectiveness of sinoaortic denervation (phenylephrine and sodium nitroprusside iv). All groups were then deeply anesthetized for harvesting the heart, kidneys, skeletal muscles (locomotor and non-locomotor) and vessels, which were processed for immunofluorescence (tyrosine hydroxylase immunoreactivity, THir) and HPLC (norepinephrine content, NOR). Other groups of SHR and WKY S and T, SHAM and SAD were used to record the lumbar sympathetic nerve activity (LSNA) and renal sympathetic nerve activity (RSNA). SHR vs. WKY showed higher basal MAP and HR (180 ± 2 mmHg and 359 ± 6 b/min, representing increases of 38% and 16% respectively), increased RSNA ($+62 \pm 4\%$), high NOR content in kidney (+34%), heart (+17%), adrenal (+26%) and greater THir in arterioles of the heart and kidneys (+62% and +66%, respectively). T determined a similar increase in the treadmill performance of SHR and WKY of both SAD and SHAM groups. In the SHAM group, T was accompanied by significant reductions in HR (289 ± 5 and 323 ± 7 b/min in WKYT and SHRT) and MAP only in SHRT (162 ± 5 mmHg). In the WKYT, it was also accompanied by decreases of LSNA (-75%), NOR content in the femoral arteries (-48%) and THir in the locomotor muscles arterioles (-45%), as well as reduction in NOR content in the heart and kidneys (~20%), THir in the heart and kidney arterioles (-19% and -43% respectively). In the SHR, T caused NOR content reduction in the heart (-43%), kidneys (-24%), adrenal (-38%) and aorta (-41%) which was accompanied by reduced expression of THir in arterioles of the heart (-47%) and kidneys (-19%), but increased NOR content in the femoral arteries (+56%) and soleus muscle (+25%). These changes in trained SHR were also accompanied by proportional changes in THir in arterioles of exercised skeletal muscle (+55% on average), with no change in the arterioles of the temporal muscle. In agreement we also observed elevated LSNA in the SHRT (+25%) when compared with SHRS; these changes were accompanied by normalization of the wall / lumen ratio of the skeletal muscle arterioles. The SAD abolished all the effects triggered by T in both SHR and WKY groups. Our data demonstrated that T-induced changes in peripheral sympathetic innervations are tissue-specific and depend on the experimental strain: reduced sympathetic to the heart and kidneys in WKY and SHR strains, and reduced sympathetic activity to the skeletal muscles in the trained WKY, but increased sympathetic activity in the trained SHR, which showed a simultaneous extensive vascular remodeling after training. Our results also demonstrated that training-induced sympathetic adaptations depend on the integrity of the arterial baroreceptors.

Key Words: Aerobic training. Hypertension. Sympathetic activity. Skeletal muscle. Kidney. Heart. Immunohistochemistry. Electroneuronography. High Performance Liquid Chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema ilustrativo mostrando a alça primária ou bulbar de controle reflexo da PA (receptores, aferências periféricas, áreas bulbares, eferências pelo sistema nervoso autônomo) e a alça suprabulbar ou modulatória do controle cardiovascular (áreas bulbares, projeções catecolaminérgicas ascendentes, núcleos hipotalâmicos, projeções vasopressinérgicas e ocitocinérgicas descendentes ao bulbo). No esquema encontra-se também representado o “comando central” 6

Figura 2- Ilustração das manobras cirúrgicas realizadas durante a desnervação sinoaórtica (SAD) 16

Figura 3- Alterações no desempenho em esteira induzidas pelas cirurgias SHAM e SAD nos grupos WKY e SHR (A). Comparação da redução de desempenho após as cirurgias SHAM e SAD (B). Significâncias ($p < 0,05$) são + *vs* antes da cirurgia; * *vs* WKY; # denota uma alteração significativa. 25

Figura 4- Evolução temporal do desempenho em esteira de WKY e SHR submetidos à SHAM ou SAD. Valores são médias $\pm$ EPM. Significâncias ($p < 0,05$) são * *vs* WKY; + *vs* S; # *vs* semana 0. 26

Figura 5- Comparação do ganho em desempenho em esteira nos ratos WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significância ($p < 0,05$) + *vs* S. 27

Figura 6- Comparação do ganho em desempenho em esteira nos ratos WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significância ($p < 0,05$) + *vs* S 28

Figura 7- Comparação dos efeitos do treinamento aeróbio sobre os valores basais de pressão arterial média (PAM) de WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significâncias ($p < 0,05$) * *vs* WKY; + *vs* S 30

Figura 8- Comparação dos efeitos do treinamento aeróbio sobre valores basais de frequência cardíaca (FC) de WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significâncias ($p < 0,05$) * *vs* WKY; + *vs* S. 30

Figura 9- Registro simultâneo da atividade simpática do nervo lombar (LSNA, eletroneuronografia) e da pressão arterial em 4 animais do grupo SHAM representativos dos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). 32

Figura 10- Comparação dos efeitos do treinamento físico sobre a LSNA (frequência e amplitude do sinal) nos grupos SHAM (painéis a esquerda) e SAD (painéis a direita) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Significância ($p < 0,05$) são * *vs* WKY; + *vs* S. $n = 5-6$ rats/grupo. 33

Figura 11- Registro simultâneo da atividade simpática do nervo renal (RSNA, eletroneuronografia) e da pressão arterial (AP) em 2 ratos representativos dos grupos normotenso sedentário (WKY_S) e hipertenso sedentário (SHR_S) 34

Figura 12- Comparação da atividade simpática basal entre normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) nos territórios lombar (LSNA) e renal (RSNA). $n = 5-6$ ratos/grupo para LSNA; $n = 4$ ratos/grupo para RSNA **Figura 13.** “Print-out” do HPLC para artérias femorais ilustrando a sequência dos picos de noradrenalina (setas), adrenalina e padrão interno em WKY_S e SHR_S do grupo SHAM. 34

Figura 13- “Print-out” do HPLC para artérias femorais ilustrando a sequência dos picos de noradrenalina (setas), adrenalina e padrão interno em WKY_S e SHR_S do grupo SHAM 35

Figura 14- Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) na aorta torácica (painel superior), abdominal (painel intermediário) e artéria femoral (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita). Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs SHAM. 38

Figura 15- Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) no coração (painel superior), no rim (painel intermediário) e nas supra-reenais (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita). Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs SHAM. 39

Figura 16- Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) nos músculos sóleo (painel superior) e Temporal (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita). Significância ($p < 0,05$) é* vs WKY. 40

Figura 17- Comparação da THir entre arteríolas musculares esqueléticas e renais de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) 41

Figura 18- Comparação da imunorreatividade para a TH nos diferentes tecidos analisados de SHR sedentários submetidos à cirurgia fictícia (SHAM). Significâncias ($p < 0,05$) * vs coração; + vs rim. 42

Figura 19- Secções transversais de arteríolas do córtex renal imunorreativas para TH em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T), submetidos à cirurgia SHAM ou SAD 43

Figura 20- Secções transversais de arteríolas do gastrocnêmio vermelho imunorreativas para TH em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T), submetidos à cirurgia SHAM ou SAD 45

Figura 21- Comparação da imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (THir) no coração, rim, músculos sóleo, grácil, gastrocnêmico vermelho (locomotores) e temporal (não-locomotor) em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM. Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY; + vs S. 46

Figura 22- Comparação da expressão de Tirosina Hidroxilase (THir) no rim e músculo gastrocnêmico vermelho em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM e SAD. Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY; + vs S # vs SHAM 47

Figura 23- Comparação da razão parede/luz de arteríolas musculares esqueléticas de WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY, + vs S. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima antes e após as cirurgias SHAM e SAD 24

Tabela 2- Valores absolutos de velocidade máxima atingida (em Km/h) durante os testes de capacidade máxima de WKY e SHR submetidos à SHAM ou SAD nas semanas 0, 6, 12 e o ganho obtido ao final do protocolo de treinamento ou sedentarismo. 26

Tabela 3-Valores absolutos de pressão arterial sistólica, diastólica e média, pressão de pulso e frequência cardíaca nos 8 grupos experimentais submetidos à SHAM ou SAD. 29

Tabela 4- Sensibilidade do reflexo barorreceptor avaliada à partir do cálculo do índice médio de bradicardia (BR) e taquicardia (TR) em WKY e SHR sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. 31

Tabela 5- Valores basais da atividade simpática lombar (LSNA) quantificada em frequência e amplitude do sinal em WKY e SHR sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD 32

Tabela 6- Valores absolutos das concentrações de NOR obtidas pelo HPLC em artérias (aorta torácica aorta abdominal e femoral), coração, rins, supra-renal e musculatura esquelética (sóleo e temporal) de WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. 37

Tabela 7- Valores relativos da imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (THir) no coração, no rim e em arteríolas musculares esqueléticas (sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho e temporal) de WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. 43

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipertensão e treinamento aeróbio	17
1.2 Ajustes autonômicos induzidos pelo treinamento aeróbio	21
1.3 Inervação simpática periférica: morfologia e função	25
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais experimentais	30
3.2 Grupos experimentais	30
3.3 Desnervação sinoaórtica (SAD)	31
3.3 Comprovação da desnervação sinoaórtica.....	32
3.4 Adaptação à esteira, teste de esforço máximo e protocolo de treinamento aeróbio	32
3.5 . Técnica para cateterização arterial	33
3.5.1 Confeção e implantação das cânulas arterial e venosa.....	33
3.6 Registro simultâneo da pressão arterial e frequência cardíaca	34
3.7 Registros eletroneuronográficos dos nervos lombar e renal.....	34
3.7.1 Preparo dos eletrodos de registro	34
3.7.2 Preparo do eletrodo de referência.....	34
3.7.3 Implantação dos eletrodos para registro da atividade simpática	35
3.7.4 Captação, armazenamento e processamento dos sinais de PA e de atividade nervosa simpática	35
3.8 Obtenção de vasos e tecidos	36
3.8.1. Tecidos para o HPLC	37
3.8.2. Tecidos para imunohistoquímica	37
3.9 Técnica do HPLC	38
3.10. Técnica de imunofluorescência	38
3.11 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira.....	40
4.2 Efeitos das cirurgias SHAM e SAD e do treinamento aeróbio sobre a hemodinâmica basal	43
4.3 Efeitos das cirurgias SHAM e SAD e do treinamento aeróbio sobre a atividade simpática lombar (LSNA).....	47
4.4 Comparação da atividade simpática lombar e renal em normotensos e hipertensos sedentários	49
4.5 Efeitos da hipertensão, do treinamento aeróbio e da SAD sobre o conteúdo de noradrenalina (NOR) no leito arterial e em diferentes tecidos	51

4.6 Efeitos da hipertensão, do treinamento aeróbio e da SAD sobre a expressão de THir em arteríolas musculares esqueléticas, do coração e do rim	57
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	74
ANEXOS A- Artigo publicado relacionado à tese.....	82
ANEXOS B- Artigo publicado não relacionado à tese.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão e treinamento aeróbio

A hipertensão arterial é um dos mais importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares e pode ser entendida como uma síndrome multifatorial, de patogênese ainda não totalmente compreendida, em que interações complexas entre fatores genéticos e ambientais causam elevação sustentada da pressão arterial (sistólica ≥ 140 mmHg e diastólica ≥ 90 mmHg) (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

A hipertensão possui alta prevalência e baixas taxas de controle e está freqüentemente associada à alta morbidade e mortalidade, ocorrendo com incidência bastante elevada na população adulta (15-20%) e chegando a atingir porcentagens ainda maiores ($\geq 50\%$) na população idosa. Atualmente a hipertensão afeta aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo inteiro, sendo considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75mmHg de forma linear, continua e independente. Em vários países, assim como em nosso, as doenças cardiovasculares têm sido a principal causa de morte (MANCIA; GRASSI, 1998; 2005; WILLETT, et al.,1999; ISRAELI et al., 2007; HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2010; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

A hipertensão arterial é uma doença crônico-degenerativa não transmissível, de natureza multifatorial assintomática (na grande maioria dos casos), caracterizada por níveis tensionais elevados, comprometendo fundamentalmente o equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores que mantém o tônus vasomotor e levando a uma remodelagem vascular com aumento da parede e redução da luz vascular, a qual promove aumento da resistência vascular local e danos aos órgãos por eles irrigados (III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 1998; CHOBANIAN et al., 2003; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Aceitam-se como normais as cifras inferiores a 80 mmHg da pressão arterial diastólica e a 120 mmHg da pressão arterial sistólica, caracterizando-se como pré-hipertensão os níveis tensionais acima delas e hipertensão estabelecida para valores superiores a 90 e 140 para pressão diastólica e sistólica respectivamente. (CHOBANIAN et al., 2003, VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Apesar de todos os avanços na medicina e na fisiopatologia vascular, ainda se desconhecem os determinantes primários da hipertensão. Em aproximadamente 90% - 95% dos casos o fator determinante do aumento da pressão arterial, permanece desconhecido, sendo a hipertensão classificada como essencial ou primária e, apenas 78 uma pequena porcentagem de hipertensos desenvolve hipertensão secundária, de etiologia conhecida (FOLKOW, 1982; HARRAP et al., 1988; KRIEGER, 1991; CARRETERO; OPARIL, 2000). Uma vez estabelecida, a hipertensão arterial não é mais passível de reversão, exigindo terapia continuada para a redução/controle dos níveis pressóricos. Além disto, a hipertensão encontra-se freqüentemente associada a outras doenças cardiovasculares como a arteriosclerose, a doença coronariana crônica, o infarto agudo do miocárdio, a doença arterial periférica, a insuficiência renal, etc (MANCIA; GRASSI, 1998; CHOBANIAN et al., 2003).

A pressão arterial é a força motriz da circulação, e mantém a perfusão tecidual em níveis adequados e razoavelmente constantes. A pressão arterial pode ser definida por sua dimensão física (força/unidade de área compreendendo a relação entre volume sanguíneo e capacitância vascular) ou funcional, resultante da combinação instantânea entre o retorno venoso, o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco) e a resistência periférica.

A manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de ajustes instantâneos da capacitância venosa, do débito cardíaco e/ou da resistência periférica. Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção dos níveis basais como também na variação momento-a-momento da pressão arterial (PA), regulando o retorno venoso, o débito cardíaco, o calibre e a reatividade vascular, bem como a distribuição de sangue nos diferentes compartimentos da circulação e de fluidos dentro e fora dos vasos. Os mecanismos envolvidos no controle da PA incluem fatores locais (miogênicos, metabólicos, substâncias parácrinas e substâncias de ação vasoconstritora e vasodilatadora liberadas pelo endotélio, além de fatores físicos), mecanismos neuro-hormonais (comandados pelos barorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares, que regulam as respostas neurais e modulam a liberação plasmática de catecolaminas, da renina e angiotensina, da aldosterona e da vasopressina) e mecanismos de controle da ingestão/excreção de água e sais (KORNER et al, 1979; MARK, A.L., 1996 ; KRIEGER et al, 1998; WALLIN, B.G., CHARKOUDIAN, N., 2007).

Nas últimas décadas muitos estudos sobre os mecanismos que controlam a pressão arterial foram realizados, evidenciando inúmeros mediadores e sistemas fisiológicos que, interagindo mantêm a pressão arterial em níveis adequados frente a diferentes situações. É possível, que a hipertensão seja causada por disfunções nestes sistemas de controle da pressão

arterial (KRIEGER, 1991; GRASSI et al., 2010). Dentre os fatores condicionantes da elevação mantida da pressão arterial destacam-se o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, fatores endoteliais e o rim. Modificações nestes sistemas parecem depender de predisposição genética e de fatores ambientais, como a obesidade, o consumo excessivo de álcool, a resistência à insulina, o consumo elevado de sal, o estresse e o sedentarismo (FOLKOW, 1982; VASAN et al., 2002, VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

O sedentarismo constitui um importante fator de risco, estando bem estabelecida a ocorrência de elevada taxa de eventos cardiovasculares e maior taxa de mortalidade em indivíduos com baixo nível de condicionamento físico. Estima-se que a prevalência do sedentarismo na população urbana brasileira seja de 56% nas mulheres e 37% nos homens (FUCHS, 1993; MYERS, 2003). Modificações no estilo de vida, incluindo a prática regular de exercícios físicos, são recomendadas no tratamento da hipertensão arterial.(PESCATELLO et al, 2004; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Pelo exposto acima fica claro que a hipertensão arterial é uma enfermidade complexa, multifatorial e de difícil tratamento. Reduzir/normalizar os níveis de pressão arterial é uma tarefa árdua que tem preocupado os clínicos/pesquisadores há mais de seis décadas. O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é o controle dos níveis pressóricos associado à redução da morbi-mortalidade do paciente hipertenso, aumentada em decorrência dos altos níveis tensionais e de outros fatores agravantes (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

A redução da PA de indivíduos hipertensos, ainda que parcial, tem-se mostrado conduta eficaz para diminuir os riscos de doenças renais, coronárias e cerebrais, contribuindo significativamente para sobrevida e para qualidade de vida desses indivíduos (MANCIA, GRASSI, 2005). Estes achados têm motivado a busca constante de tratamentos eficazes no controle dos níveis pressóricos: diuréticos, vasodilatadores, simpatolíticos, beta-bloqueadores, inibidores da enzima de conversão de angiotensina (ECA), antagonistas de receptores de angiotensina, bloqueadores de canais de cálcio têm sido amplamente utilizados no controle da hipertensão (KAPLAN, 1995; MANCIA, GRASSI, 1998; MANCIA et al., 2005). Mais recentemente outras substâncias farmacologicamente ativas como os bloqueadores de renina e agonistas da angiotensina (1-7) foram também introduzidas no mercado (SAVERGNINI et al., 2010).

Apesar destes avanços na terapêutica medicamentosa, estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado a importância de tratamentos alternativos e/ou complementares aos tratamentos

farmacológicos clássicos no controle dos níveis pressóricos e na redução da morbi-mortalidade. O “tratamento complementar” inclui mudanças no estilo de vida, como redução da ingestão de sal e de álcool, dieta rica em frutas, fibras e minerais, hortaliças e laticínios com baixos teores de gordura, redução do peso corporal e principalmente a prática regular de exercícios físicos aeróbios (KAPLAN, 1995; MANCIA et al., 2005; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Estas observações têm motivado a busca e/ou padronização de protocolos de treinamento aeróbio que se mostrem eficientes em reduzir os níveis pressóricos na hipertensão leve a moderada (ARAKAWA, 1993; KAPLAN, 1995, FLETCHER, BALADY, 2001; WHELTON et al., 2002; CHOBANIAN et al., 2003, MURPHY et al., 2007; FAGARD, CORNELISSEN, 2007).

Atualmente não há dúvidas, quanto aos efeitos benéficos do exercício físico praticado regularmente sobre o controle da pressão arterial na hipertensão primária e secundária. Estudos recentes têm demonstrado que a queda pressórica depende, em grande parte do volume (intensidade X duração) do treinamento físico: enquanto o treinamento físico de baixa intensidade (entre 50-60% do consumo máximo de oxigênio ou VO_2 max) atenua, sobremaneira, a hipertensão arterial, o de alta intensidade ($> 85\% VO_2$ max) não modifica os níveis de hipertensão. (GAVA et al. 1995; VÉRAS-SILVA et al., 1997; FLETCHER & BALADY, 2001; PESCATELLO et al., 2004; FAGARD & CORNELISSEN, 2007; MURPHY, et al., 2007).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a queda da PA de indivíduos hipertensos e em diferentes modelos de hipertensão experimental. Entre eles citam-se: a redução de frequência e débito cardíacos (TIPTON et al., 1999; NEGRÃO et al., 1993); a normalização da razão parede/luz de arteríolas e da resistência muscular esquelética, a qual contribuiu para a redução da resistência periférica total (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003); a redução do tônus simpático e da resistência à insulina (PETERSEN et al. 1980; MIKINES et al. 1989; MEREDITH et al., 1990; GRASSI, 2010); a correção do desbalanço entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, com predomínio dos relaxantes (VANHOUTTE, 1996); o aumento da capacidade física da circulação em territórios exercitados causado por angiogênese capilar e/ou neoformação de vênulas (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO 2003; COIMBRA et al, 2008).

É interessante observar-se que durante o exercício dinâmico há, além dos ajustes da FC e do débito cardíaco, alterações simultâneas na redistribuição de fluxo sanguíneo com grande aumento nos territórios muscular esquelético e cutâneo, com aumento de menor magnitude nos territórios coronariano e cerebral e importante redução dos fluxos renal e esplâncnico (MICHELINI, 2007). Estas alterações hemodinâmicas, repetindo-se ao longo de todo o

protocolo de treinamento, poderiam realmente desencadear/manter vários dos mecanismos acima elencados que contribuem para a redução da PA nos hipertensos.

1.2 Ajustes autonômicos induzidos pelo treinamento aeróbio

Sabe-se que a regulação neural da circulação se faz via arco-reflexo. Mecanorreceptores localizados na crossa da aorta e na bifurcação das carótidas (barorreceptores arteriais) detectam a deformação das artérias causadas pela passagem da onda de pulso, codificando os níveis de PA em frequência de disparos dos potenciais de ação e conduzem estas informações sensoriais ao núcleo do trato solitário (NTS) localizado no bulbo dorsal (MICHELINI, 2008). Neurônios glutamatérgicos do NTS projetam-se e excitam os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados nos núcleos dorsal motor do vago (DMV) e ambíguo (NA), e que se projetam ao coração, determinando, quando estimulados, redução da frequência cardíaca (FC). Outros neurônios do NTS, também glutamatérgicos, projetam-se ao bulbo ventrolateral caudal (CVLM), excitando neurônios gabaérgicos aí localizados que por sua vez projetam-se e inibem neurônios glutamatérgicos que se situam na porção dorsal do bulbo ventrolateral (RVLM, origem dos pré-motores simpáticos), inibindo a atividade simpática para coração e vasos e determinando aumento da capacitância venosa, queda da FC e contratilidade cardíacas, redução da resistência periférica com conseqüente queda da PA (MICHELINI, 2008). Em situações em que a estimulação dos barorreceptores é reduzida (durantes quedas abruptas da PA), não há estimulação do DMV e NA (redução do tônus parassimpático ao coração) e do CVLM (o RVLM e o simpático não serão inibidos), determinando respostas opostas (redução da capacitância venosa, aumento da FC, da contratilidade cardíaca e da resistência periférica), as quais, novamente, corrigem os desníveis da PA. Esta, como ilustrado na Figura 1, constitui a alça primária, ou bulbar de controle cardiovascular.

A alça de controle reflexo, que regula a PA tonicamente, é continuamente modulada por alças de integração suprabulbar (Figura 1), constituídas por projeções catecolaminérgicas do NTS e CVLM a núcleos hipotalâmicos de controle vegetativo e comportamental, entre os quais se destaca o núcleo paraventricular (PVN) (MICHELINI, STERN, 2009). Subnúcleos parvocelulares do PVN que recebem estas projeções ascendentes possuem neurônios pré-autonômicos vasopressinérgicos (VPérgicos) e ocitocinérgicos (OTérgicos) que se projetam novamente a áreas bulbares (NTS, DMV, RVLM) fechando o circuito de controle autonômico da circulação. Estas alças suprabulbares são de fundamental importância para determinar ajustes finos da circulação durante diferentes situações comportamentais (MICHELINI, STERN, 2009).

Figura 1- Esquema ilustrativo mostrando a alça primária ou bulbar de controle reflexo da PA (receptores, aferências periféricas, áreas bulbares, eferências pelo sistema nervoso autônomo) e a alça suprabulbar ou modulatória do controle cardiovascular (áreas bulbares, projeções catecolaminérgicas ascendentes, núcleos hipotalâmicos, projeções vasopressinérgicas e ocitocinérgicas descendentes ao bulbo). No esquema encontra-se também representado o “comando central”.

FONTE: (MICHELINI, MORRIS, 1999)

Além dos mecanismos periféricos que determinam queda da PA (enumerados no item anterior), trabalhos recentes com animais hipertensos e normotensos, também indicaram que o treinamento aeróbico de baixa intensidade é eficaz em promover importantes ajustes em mecanismos centrais de regulação autonômica, contribuindo para um controle eficaz dos parâmetros cardiovasculares e da PA (MICHELINI, STERN, 2009).

Sabe-se que o controle neural do sistema cardiovascular durante o exercício é comandado por 2 mecanismos principais: o “comando central” e o controle autonômico reflexo bulbar (MITCHELL, 1990). O “comando central” é um mecanismo tipo “feed forward” que estabelece o padrão motor para a musculatura em atividade e envolve várias estruturas neurais em diferentes níveis do sistema nervoso central (córtex, hipotálamo, mesencéfalo, bulbo dorsal e ventral, cerebelo, coluna intermédio-lateral). Por sua vez o controle reflexo da circulação é um controle do tipo “feedback”, envolvendo informações aferentes provenientes dos barorreceptores (como também de outros aferentes como os quimiorreceptores, os receptores cardiopulmonares, termorreceptores, aferências provenientes da musculatura esquelética, etc.), integradas a nível bulbar e que modulam, via simpático e parassimpático, os efetores cardiovasculares. Nosso laboratório tem se dedicado nos últimos anos a estudar a interação entre o comando central e os mecanismos reflexos durante o exercício dinâmico e no treinamento físico. (MICHELINI, 1994;

MICHELINI, BONAGAMBA, 1998; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; MICHELINI, 2007; MICHELINI, STERN, 2009)

Trabalhos de nosso e outros laboratórios têm demonstrado que o treinamento aeróbio de baixa intensidade, em ratos normotensos, é bastante eficaz em modular o controle autonômico da circulação uma vez que:

- aumenta o ganho da sinalização aferente pelos barorreceptores arteriais (BRUM et al., 2000)
- desloca a faixa de funcionamento dos barorreceptores arteriais para níveis mais elevados de FC, sem alterar o ganho do reflexo (NEGRÃO et al., 1992), resposta esta, que é reproduzida pela administração exógena de vasopressina no NTS (mimetizando a ativação de projeções VPérgicas a esta área) e completamente bloqueada pelo pré-tratamento com bloqueador de receptores V_1 no NTS de ratos sedentários (MICHELINI, 1994; MICHELINI, BONAGAMBA, 1998; MICHELINI, 2007; MICHELINI, STERN, 2009).
- facilita a sinalização CAérgica ascendente do NTS ao PVN, a principal área de integração neurovegetativa e comportamental do organismo (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; MICHELINI, STERN, 2009).
- aumenta a excitabilidade de neurônios pré-autonômicos do PVN (JACKSON et al, 2005) sem alterar o funcionamento dos neurônios magnocelulares envolvidos com a síntese de VP e ocitocina (OT) plasmáticos (DUFLOTH et al., 1997; BRAGA et al.2000; MICHELINI, STERN, 2009).
- aumenta a atividade de projeções OTérgicas (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001) e VPérgicas (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI, MORRIS, 1999) do PVN ao bulbo (MICHELINI, STERN, 2009).
- facilita, em sedentários e treinados, a instalação da resposta taquicárdica por determinar, durante o exercício dinâmico, intensa ativação das projeções VPérgicas ao tronco cerebral e em especial ao NTS (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI e MORRIS, 1999; MICHELINI, 2007; MICHELINI & STERN, 2009).
- reduz, em indivíduos treinados, a FC basal (bradicardia de repouso) e a resposta taquicárdica ao exercício por facilitar a atividade OTérgica ao complexo solitário-vagal do tronco cerebral (BRAGA et al, 2000; MICHELINI, 2001; 2007; MICHELINI, STERN, 2009).
- reduz a atividade simpática basal aos rins (DICARLO, BISHOP 1988; NEGRÃO et al. 1993).
- diminui a atividade simpática do nervo fibular (GRASSI et. al, 1994).
- altera o balanço autonômico reduzindo o simpático para o coração (ANGELIS et al., 2004).

Com relação aos efeitos do treinamento físico sobre ajustes centrais do controle cardiovascular em indivíduos hipertensos as informações são bem mais escassas. Sabe-se que o treinamento de baixa intensidade provoca nos ratos hipertensos espontâneos (SHR, tido como melhor modelo experimental de hipertensão primária ou hipertensão essencial do homem):

- aumento do ganho da sinalização aferente pelos barorreceptores arteriais (BRUM et al., 2000)
- ligeiro aumento da sinalização CAérgica ascendente do NTS a neurônios OTérgicos do PVN que se projetam ao bulbo dorsal (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007)
- aumento significativo da expressão de RNAm para OT no hipotálamo de SHR treinados, compensando a depressão do sistema OTérgico central presente nos SHR sedentários (vs. normotensos sedentários MARTINS et al., 2005)
- aumento da densidade de fibras imunorreativas para OT no bulbo dorsal, com redução simultânea da elevada FC basal nos SHR treinados (MARTINS et al., 2005). Dados anteriores do nosso laboratório já haviam demonstrado que a OT no complexo solitário-vagal facilitava o tônus vagal para o coração (HIGA et al., 2002), enquanto que a ação da VP no NTS se fazia no sentido de reduzir a inibição simpática para o coração durante elevações transitórias da PA (MICHELINI, 1994; 2007).

Quanto aos efeitos do treinamento físico sobre a inervação autonômica vasomotora de hipertensos, os dados são ainda mais escassos e contraditórios. Enquanto DiCarlo e Bishop (2002) e Negrão et al. (1993) relataram haver, após treinamento, redução da atividade simpática renal durante quedas transitórias da PA e redução do tônus simpático basal aos rins, respectivamente, Buckwalter et al. (1997) demonstraram haver, durante o exercício dinâmico, aumento da vasoconstrição muscular esquelética, por ativação simpática local acompanhada de redução da sensibilidade dos receptores α - adrenérgicos ao agonista endógeno durante o exercício agudo (BUCKWALTER et al., 2001). Identificar em hipertensos (e comparar aos normotensos) os efeitos do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre a atividade simpática periférica (artérias e arteríolas) em diferentes territórios como a musculatura esquelética e rins, é, portanto, uma das propostas do presente trabalho.

Um dado recente de nosso laboratório foi a observação de que a remoção seletiva dos barorreceptores arteriais (desnervação sinoaórtica) determinou bloqueio completo dos ajustes benéficos sobre o sistema cardiovascular induzidos pelo treinamento em hipertensos (CERONI et al., 2009): em ratos desnervados o treinamento aeróbio não foi mais acompanhado por bradicardia de repouso e queda da PA, havendo inclusive aumento da FC e PA basais.

Interessante foi a observação de que enquanto a queda da PA subsequente ao treinamento era, em hipertensos íntegros, acompanhada de redução significativa da atividade simpática para a periferia (inferida pelo componente LF da análise espectral da PA), nos hipertensos desnervados, submetidos ao treinamento e ao sedentarismo, não houve qualquer correlação entre LF e PA (CERONI et al, 2009). Estas observações sugerem que a informação aferente conduzida pelos barorreceptores ao NTS e deste ao PVN pode se constituir no principal mecanismo desencadeante das adaptações centrais ao treinamento aeróbio e que a redução da atividade simpática periférica subsequente ao exercício seria um dos mecanismos condicionantes da queda da PA no hipertenso treinado. Desta forma, uma segunda proposição deste trabalho é a de investigar, em hipertensos sedentários e treinados e seus controles normotensos, os efeitos da desnervação sinoaórtica (SAD, desenvolvida por Krieger em 1964 e recentemente adaptada por Moreira e Krieger de forma a preservar integralmente a inervação simpática eferente - comunicação pessoal) sobre a atividade simpática periférica (musculatura esquelética e rins).

1.3 Inervação simpática periférica: morfologia e função

O conceito de que a origem da hipertensão relaciona-se com alterações no controle simpático ao coração e vasos tem sido desenvolvido durante décadas e tem recebido um importante suporte de pesquisas e estudos clínicos realizados ao longo dos últimos anos. Vários trabalhos demonstraram que a hipertensão arterial é acompanhada de aumento generalizado da atividade simpática (hiperatividade simpática) a qual aumenta o tônus dos vasos de resistência, além de estimular mecanismos tróficos locais que induzem hipertrofia vascular, mantendo cronicamente a hipertensão (FRANCHINI, 1993; ESLER, 1995; JULIUS, 1996; ESLER & KAYE, 2000; WALLING, CHARCOUDIAN, 2007; GUYNET, 2006, GRASSI, 1998, 2010). Outros estudos também demonstraram que o sistema nervoso simpático não só atua nos níveis de pressão arterial, como também contribui para a disfunção diastólica ventricular, para a hipertrofia ventricular esquerda, para o remodelamento e hipertrofia vascular e para a lesão de órgãos alvos (GRASSI, et al, 2008). Não obstante a estas evidências não se conseguiu demonstrar, no entanto, que a hiperatividade simpática isolada fosse capaz de provocar hipertensão arterial (FRANCHINI, 1993).

Conforme enfatizado por Claude Bernard e Walter Cannon, a constância do meio interno do organismo é em grande parte controlada pelo sistema nervoso autônomo (envolvendo divisões simpática e parassimpática), o qual é responsável pelos ajustes rápidos frente às modificações do meio interno. Ajustes instantâneos da atividade cardíaca são mediados

simultaneamente pelo simpático e parassimpático mas as alterações da atividade nos efetores vasculares (artérias, arteríolas, veias e vênulas nos diferentes territórios) são basicamente mediadas pelo simpático.

A divisão simpática do sistema nervoso autônomo é um sistema motor, controlando simultaneamente a atividade do músculo cardíaco, da musculatura lisa vascular arterial e venosa, e, os níveis plasmáticos de diferentes hormônios. A inervação simpática ao sistema circulatório é constituída por: 1) neurônios pré-motores simpáticos localizados no RVLM, neurônios do grupamento noradrenérgico A5 na ponte, e neurônios preautonômicos do PVN, os quais recebem densas aferências dos sistemas de integração vegetativo e comportamental e se projetam à coluna intermédia-lateral; 2) neurônios pré-ganglionares cujos corpos celulares situam-se no núcleo intermédia-lateral da medula espinhal, entre os segmentos T1 e L2, projetando-se via corno anterior aos gânglios paravertebrais e pré-vertebrais (BERNE, LEVY, 1991, MICHELINI, 2008); 3) neurônios pós-ganglionares cujos corpos celulares situam-se nos gânglios simpáticos, fora do eixo cérebro-vertebral, e seus axônios inervam todos os efetores do sistema circulatório: coração, vasos de resistência e vasos de capacitância. Os neurônios pré-motores simpáticos são predominantemente glutamatérgicos, enquanto os pré-ganglionares são colinérgicos e os pós-ganglionares são principalmente noradrenérgicos, podendo co-liberar o neuropeptídeo Y (BEVAN, 1979; 1987). Quando ativados determinam hiperatividade simpática generalizada, vasoconstrição periférica com aumento da resistência periférica e redução da capacitância venosa, as quais conjuntamente, com o aumento débito cardíaco (aumentos da frequência e inotropismo cardíacos) determinam elevação da PA.

Dada a complexidade e a extensão da inervação simpática eferente (a circulação em todos os territórios encontra-se sob controle direto do simpático), a quantificação da atividade simpática não é uma tarefa fácil, tanto que várias técnicas têm sido utilizadas para a sua quantificação: dosagem de catecolaminas plasmáticas e/ou em vasos e tecidos por radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (GOLDSTEIN, 1981; THOMPSON et al., 1995; GAROFALO et al, 1996), simpatectomia e/ou bloqueio ganglionar (JULIEN et al., 1990; SANTA JULIANA et al., 1996; CSIKY et al., 1997), ‘spillover’ de noradrenalina (HASKING et al., 1988; GRASSI, ESSLER, 1999); registro eletroneuronográfico da atividade simpática em diferentes leitos vasculares (LUNDIN et al., 1984; RICKSTEN et al, 1984; IRIGOYEN, KRIEGER, 1998, GUILD et al, 2005), análise espectral da variabilidade da PA e/ou frequência cardíaca (AKSELROD et al., 1981; PAGANI et al., 1986; MALLIANI et al., 1994), análise de imagem associada a imuno-histoquímica (BURGI et al, 2011). Estas técnicas podem fornecer índices gerais da atividade simpática, sem particularizá-la aos diferentes

territórios (dosagem de catecolaminas, bloqueio simpático, análise espectral) ou a registram diretamente, mas em apenas um território, em animais anestesiados (eletroneuronografia). Mesmo uma técnica recente, para registrar direta e continuamente a atividade simpática em animais acordados (GUILD et al, 2005), o faz em apenas 2 diferentes tecidos. Índices da atividade simpática em 3 ou mais territórios pode ser obtida pelo ‘spillover’ de noradrenalina, mas esta técnica não é usualmente empregada em animais de experimentação.

Avanços recentes em técnicas de imagem têm permitido a quantificação do sinal de imuno-histoquímica (HIGA-TANUGUCHI et al, 2007). Sabendo-se que a imunorreatividade para a Tirosina Hidroxilase (TH, enzima que se constitui na etapa limitante da síntese de noradrenalina nos terminais nervosos) tem sido utilizada como um marcador da inervação simpática (SALTZMAN et AL, 1992; DAMON, 2008; SWISSA et al, 2008, LONG, SEGAL, 2009), a combinação da técnica de análise de imagem com a da imunorreatividade para a TH (THir) poderia se constituir em uma ferramenta importante para se quantificar a síntese de noradrenalina nos terminais simpáticos de artérias/arteríolas em diferentes territórios, permitindo uma análise simultânea dos efeitos da hipertensão e da hipertensão associada ao treinamento físico sobre a atividade simpática. Dados preliminares de nosso laboratório associando a técnica de análise de imagem (IMAGE PRO-PLUS) à imuno-histoquímica já haviam demonstrado ser possível mensurar a THir presente nos terminais nervosos de neurônios pós-ganglionares que inervam as arteríolas musculares esqueléticas (BURGI et al.,2011). A grande vantagem foi a possibilidade de se “visualizar” e quantificar a síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático simultaneamente em diferentes territórios. É certo que a THir vascular fornece apenas índice da atividade simpática e apenas num determinado momento, mas o faz simultânea e especificamente em diferentes territórios. Associada à HPLC e ao registro direto da atividade simpática renal em diferentes territórios, fornecerá um quadro mais completo dos efeitos do treinamento físico em animais normotensos e hipertensos com e sem a integridade funcional dos baroreceptores. A técnica da THir deverá, portanto, ser explorada no presente trabalho e confirmada por técnicas tradicionais de quantificação da atividade simpática.

A quantificação da atividade simpática na hipertensão, bem como a análise dos efeitos induzidos pelo treinamento aeróbio de baixa intensidade são essenciais para se entender a etiopatologia da hipertensão essencial, para auxiliar no diagnóstico precoce e no controle adequado dos níveis pressóricos e para reduzir a morbimortalidade.

2 OBJETIVOS

Frente ao que foi exposto depreende-se que pouco se sabe sobre o envolvimento do simpático com a gênese/manutenção da hipertensão essencial ou primária e que há importantes incongruências relativas aos efeitos do treinamento aeróbico sobre a atividade simpática em diferentes territórios em normotensos e hipertensos. Também as técnicas disponíveis para se avaliar a atividade simpática não permitem uma avaliação simultânea do tônus simpático em diferentes territórios. Desta forma, utilizando ratos hipertensos espontâneos (SHR, o melhor modelo experimental da hipertensão essencial no homem) e seus controles normotensos (WKY) pretendemos no presente trabalho avaliar os efeitos do treinamento e do treinamento associado à hipertensão sobre a atividade simpática muscular esquelética e renal, utilizando a imunorreatividade para a TH (THir) associada à análise de imagem. Os resultados experimentais são confirmados nos diferentes tecidos pela detecção da concentração endógena de noradrenalina pela técnica de cromatografia de alta performance (HPLC) e pelo registro direto da atividade simpática para a musculatura esquelética e rins.

Através destes estudos sobre ajustes autonômicos aos vasos de resistência estaremos adicionando informações importantes relativas aos efeitos da hipertensão e do treinamento físico sobre o controle cardiovascular e sobre as alças primária/secundária de regulação neural do sistema cardiovascular.

São, portanto *objetivos específicos* deste trabalho, utilizando-se SHR e WKY submetidos ao treinamento aeróbico de baixa intensidade (T) ou mantidos sedentários (S) por igual período de tempo:

1. avaliar os efeitos do da hipertensão e do treinamento sobre a hemodinâmica basal
2. quantificar através da técnica de HPLC os efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o conteúdo endógeno de noradrenalina nos tecidos muscular esquelético, renal e cardíaco
3. avaliar nos mesmos territórios, através da imunohistoquímica para TH, os efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a síntese/armazenamento de noradrenalina nos terminais nervosos de arteríolas.
4. identificar os efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a atividade simpática basal para musculatura esquelética e território renal (registros eletroneuronográficos).

5. estudar nos WKY e SHR os efeitos da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais sobre a hemodinâmica basal e sobre possíveis alterações induzidas pelo treinamento aeróbio.
6. avaliar nos WKY e SHR os efeitos da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais sobre o padrão de inervação e atividade simpática induzidas pelo treinamento (HPLC, imunohistoquímica para TH, registros eletroneuronográficos).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Um dos maiores obstáculos para se estudar a hipertensão arterial é a reprodutibilidade do modelo experimental para caracterizar as diferentes formas e etiologias da hipertensão arterial do homem. O modelo animal de hipertensão arterial espontânea, o do rato espontaneamente hipertenso (Spontaneously Hypertensive Rat ou SHR) foi desenvolvido por Okamoto e Aoki e é atualmente um dos modelos mais utilizados para estudo da hipertensão arterial essencial. Os SHR foram desenvolvidos por cruzamento genético meticuloso entre machos e fêmeas da linhagem Wistar Kyoto (WKY) que apresentavam níveis mais elevados de pressão de cauda (faixa superior da curva da Gaussian). Após 21 gerações foi possível estabelecer-se uma colônia de ratos que nascem normotensos, mas apresentam em 100% dos descendentes, elevação espontânea da pressão arterial a partir da 4^a.-6^a. semana, a qual se estabiliza em níveis severos de hipertensão entre 10 – 12 semanas de idade (OKAMOTO, AOKI, 1963).

Para este estudo foram utilizados ratos SHR e WKY provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com 2 a 2 1/2 meses de idade, pesando entre 170-200 g no início dos protocolos. O peso corporal foi aferido semanalmente durante todo o período de experimentação. Os animais foram alojados em caixas de Plexiglas (cinco por caixa) no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica e mantidos em ciclo claro/escuro 12/12 horas e controle de temperatura ambiental 23±2 °C, recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética do ICB/ USP (Protocolo no. 014/08, fls 54, livro 2 da Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA, ICB/USP, registrado em 29/04/2008 e com validade prorrogada em 29/03/2011 para 29/04/2014).

3.2 Grupos experimentais

Os ratos WKY e SHR foram submetidos ou não à desnervação sinoaórtica e aos protocolos de treinamento ou sedentarismo. Foram, portanto, formados 8 grupos experimentais, a saber:

Grupos	Intactos (SHAM)	Grupos	Desnervados (SAD)
1	WKY _{SHAM} S	5	WKY _{SAD} S
2	WKY _{SHAM} T	6	WKY _{SAD} T
3	SHR _{SHAM} S	7	SHR _{SAD} S
4	SHR _{SHAM} T	8	SHR _{SAD} T

FONTE: (BURGI, 2012)

3.3 Desnervação sinoaórtica (SAD)

A remoção seletiva dos barorreceptores arteriais ou desnervação sino-aórtica foi realizada pela técnica de Krieger (1964), adaptada por Krieger e Moreira (comunicação pessoal). Visa à secção das aferências barorreceptoras aórticas e carótídeas, preservando íntegro o simpático cervical, o que resulta na perda específica da função barorreflexa.

Para tanto os animais foram anestesiados com ketamina, xilazina e acepromazina (0,7:0,2:0,1 v/v, 0,04-0,08 ml/100 g peso, *i.m*). O procedimento cirúrgico consiste em uma incisão mediana na região cervical anterior, na separação dos músculos pré-traqueais para localização bilateral do feixe vículo-nervoso (artéria carótida, nervo vago e tronco simpático). As fibras barorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático foram isoladas e seccionadas, preservando-se o simpático cervical. A bifurcação da carótida comum foi exposta e dissecada completamente nos dois lados, seccionando-se as fibras carótídeas e destruindo-se o corpúsculo carotídeo. Finalmente, outro contingente de fibras barorreceptoras aórticas que se situa junto ao nervo laríngeo inferior foi interrompido seccionando-se o nervo laríngeo superior. Uma ilustração esquemática das secções neurais realizadas é apresentada na Figura 2. A pele foi suturada, os animais tratados com antibiótico e mantidos em recuperação cirúrgica por cerca de 1 semana.

Figura 2- Ilustração das manobras cirúrgicas realizadas durante a desnervação sinoaórtica (SAD)

FONTE: (MOREIRA E. D, 2011)

3.3 Comprovação da desnervação sinoaórtica

A comprovação da eficiência da desnervação sino-aórtica em eliminar todas as aferências dos barorreceptores arteriais foi feita *a posteriori*, ao final dos protocolos experimentais e após os registros basais de PA e FC, através da administração *iv* de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (0,2–0,8 $\mu\text{g/kg}$). A eficácia da desnervação cirúrgica foi indicada pela ausência de bradicardia e taquicardia reflexas durante elevações e quedas transitórias da PA.

3.4 Adaptação à esteira, teste de esforço máximo e protocolo de treinamento aeróbio

Grupos de WKY e SHR (cerca de 20-25 ratos/grupo) foram selecionados por sua habilidade de andar/correr em esteira (0,4-0,8 km/h, 0% de inclinação, cerca de 10 minutos/dia) durante um período de adaptação que se estendeu por 2 semanas. Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo e apenas os ratos ativos foram utilizados para compor os grupos S e T.

Testes de esforço máximo foram realizados ao final do período de adaptação, 1 a 2 semanas após as cirurgias SAD ou SHAM e imediatamente antes do início dos protocolos de T ou S, no meio e ao final dos protocolos experimentais. O teste inicia-se com a velocidade de 0,3 km/h, com incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até o ponto em que o animal se recusar a

correr (exaustão). Os resultados ao início dos protocolos foram utilizados para se alocar animais com igual desempenho aos grupos S e T (~10 ratos/grupo) e também para o cálculo da velocidade média de “endurance” no grupo T (50-60% da velocidade máxima); o teste de esforço intermediário (6^a. semana) foi utilizado para se ajustar a velocidade de “endurance” e ao final dos protocolos experimentais para se aferir o ganho de desempenho nos vários grupos experimentais.

O protocolo de treinamento, padronizado em nosso laboratório (MELO et al., 2003), consiste de um programa de exercícios repetitivos com intensidade crescente, realizados durante 1 h/dia, 5 dias/semana, iniciando-se com tempos mais curtos e velocidades mais baixas que vão gradativamente aumentando até se atingir aoredor da 2^a.-3^a. semana o tempo máximo diário (1 hora) e a intensidade estabelecida (50-60% da velocidade máxima). Os ratos alocados aos grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas uma vez/semana colocados na esteira (10 min, 0.4-0.7 km/h) para que se acostumem ao manuseio experimental e à esteira. Estes também realizaram os testes de capacidade máxima nos mesmos períodos que os grupos T.

3.5 . Técnica para cateterização arterial

3.5.1 Confeção e implantação das cânulas arterial e venosa

As cânulas foram confeccionadas com tubos de Tygon (Critchley, Austrália), sendo a parte proximal a ser introduzida na luz vascular mais fina (diâmetro interno:externo = 0.28:0.61 mm) com 2 cm de extensão, a qual foi soldada, por aquecimento, à parte distal de maior calibre (diâmetro interno:externo = 0.50:1.50 mm) com aproximadamente 6 cm de comprimento. As cânulas foram preenchidas com solução salina e ocluídas com pino de metal.

Os ratos foram anestesiados com Ketamina /Xilasina /Acepromazina (0,7/0,2/0,1 v/v, 0,4 ml/gr). Foi realizada uma incisão na região ventral direita do pescoço, para o isolamento da carótida e jugular. Após a ligadura da porção distal da carótida com fio de algodão e o clampeamento da porção proximal, realizou-se uma pequena incisão transversal na parede do vaso através da qual a porção mais fina da cânula foi introduzida, em direção à crossa da aorta. A cânula foi firmemente amarrada à artéria na região da junção dos tubos e a parte proximal mais espessa exteriorizada, através do tecido subcutâneo, no dorso do animal onde foi fixada com uma sutura. Procedimento similar foi adotado para a canulação da jugular. As incisões ventral e dorsal do pescoço foram suturadas, procedendo-se à assepsia do local com água oxigenada.

Durante a recuperação anestésica, os ratos foram tratados com antibiótico Pentabiótico Veterinário (18.000 UI/Kg) – Fort Dodge, s.c. e analgésico Biofen (3 mg/kg Cetoprofeno), Biofarm – s.c., e mantidos aquecidos, permanecendo em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, até a realização dos experimentos no dia seguinte.

3.6 Registro simultâneo da pressão arterial e frequência cardíaca

Todos os registros dos parâmetros funcionais foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação na gaiola de registro e obtidos 26-30 horas após a última sessão de exercício e no mínimo 24 horas após a canulação arterial. A PA (pulsátil e média) foi registrada diretamente da aorta torácica, via cânula implantada pela carótida direita, conectada a um transdutor de pressão (Gould P23 XL), acoplado ao pré-amplificador e ao polígrafo (Gould 5900, 8 canais, Cleveland, OH, USA). A frequência cardíaca (FC) foi obtida a partir da contagem dos pulsos de PA, determinada através do tacógrafo (Biotach, Gould). Para obtenção dos valores basais, aguardou-se tempo suficiente (15-30 min) para o desaparecimento da atividade exploratória do animal, antes de se iniciar os registros propriamente ditos. PA e FC de repouso foram contínua e simultaneamente registrados por cerca de 30-40 minutos.

3.7 Registros eletroneuronográficos dos nervos lombar e renal.

3.7.1 Preparo dos eletrodos de registro

Um fio de platina (0,05 mm de diâmetro) foi encapado com tubo de vinil deixando livres segmentos 1 a 3 cm nas extremidades. O fio de platina foi fixado comacrílico ao vinil isolante. Os fios assim preparados foram envolvidos, aos pares, por um anel de vinil formando um eletrodo bipolar. Nas extremidades distais do fio de platina foram soldados pinos de cobre permitindo um encaixe adequado com o conector que liga os eletrodos ao amplificador diferencial de sinal. As extremidades proximais, não isoladas, foram colocadas em contato direto com o nervo a ser estudado.

3.7.2 Preparo do eletrodo de referência

Fios de aço inoxidável foram, como descrito anteriormente, isolados na região central (vinil) mantendo-se as extremidades livres com cerca de 3 cm comprimento. Uma das

extremidades foi posicionada num ponto próximo ao nervo e a outra, já fixada ao pino de contato, foi conectada à entrada de referencia do conector do amplificador diferencial.

3.7.3 Implantação dos eletrodos para registro da atividade simpática

Os ratos foram anestesiados com Ketamina /Xilasina /Acepromazina (0,7/0,2/0,1 v/v, 0,04-0,08 ml/100 g peso, *i.m*) e posicionados em decúbito ventral. O nível da anestesia foi controlado frequentemente pelo reflexo de retirada da pata ao estímulo nocivo. A temperatura retal foi mensurada e mantida ao redor de 37° C (almofada térmica). A traquéia foi isolada para a inserção de um catéter traqueal e outro cateter, preenchido com salina, foi inserido na veia femoral para o bloqueio da atividade simpática ganglionar (injeção de hexametônio) e obtenção do “background” de atividade simpática ao final do experimento. Para o registro da atividade simpática lombar (LSNA) foi realizada uma incisão mediana na região lombar e procedeu-se à separação da musculatura local. Com o auxílio de um estereomicroscópio (MC-M1232, D.F. Vasconcelos, São Paulo, Brasil), o nervo lombar esquerdo foi cuidadosamente isolado (entre L2 e L3) para a implantação do eletrodo bipolar. A extremidade livre dos eletrodos foi colocada em contato direto com as fibras pós-ganglionares simpáticas. Para registro da atividade simpática renal (RSNA) procedeu-se à incisão lateral esquerda para exposição do rim e nervos simpáticos. Através de visualização direta (estereomicroscópio) um feixe de fibras pós-ganglionares foi separado dos plexos nervosos adjacentes à artéria renal e colocado sobre o eletrodo bipolar. Para ambos os registros o eletrodo de referência foi fixado no tecido subcutâneo em região próxima ao eletrodo bipolar e o conjunto nervo-eletrodo foi cuidadosamente isolado com óleo mineral a 37 °C para se evitar o ressecamento da preparação.

3.7.4 Captação, armazenamento e processamento dos sinais de PA e de atividade nervosa simpática

O sinal das fibras pós-ganglionares simpáticas foi amplificado (10 kHz de ganho) por meio de um amplificador diferencial de alta impedância de entrada (5A 22N Differential Amplifier, Tektronix, Oregon, USA) e capturado em um computador equipado com conversor analógico-digital (CODAS, DataQ Instruments, USA). O sinal foi filtrado utilizando-se um filtro passa-banda com frequências de corte superior de 3 KHz e inferior de 100 Hertz, e, gravado

simultaneamente com o sinal de PA a uma frequência de amostragem de 10 kHz. A atividade simpática foi registrada nas seguintes situações (SABINO-SILVA, 2010):

- **Basal:** o registro foi realizado durante 30 minutos com o animal anestesiado;
- **Estimulado:** o registro foi realizado após inserção na cânula traqueal de algodão umidecido com salina, o qual promovia a saturação de CO₂ pulmonar e consequente saturação da atividade simpática. O padrão de atividade simpática estimulada foi considerado como o máximo (100%) da atividade neural;
- **Inibido:** foi administrado o bloqueador ganglionar hexametonio (30mg/kg, i.v) para inibição da atividade simpática e o registro obtido foi considerado como a atividade neural mínima (0%);
- **Determinação do Ruído do sistema:** Após a morte do animal, por excesso de anestésico injetado via veia femoral, foi registrada a atividade simpática durante 15 minutos. O registro deste sinal foi considerado como ruído do sistema, sendo subtraído dos demais valores eletroneuronográficos durante as análises realizadas.

Os valores da atividade simpática lombar e renal foram retificados e analisados “off-line” pelo “software” Spike 2, Cambridge Eletronic Design, Cambrige, UK), utilizando-se o “moving average” (constante de tempo de 100 ms). A atividade nervosa simpática foi expressa como médias de voltagem (mV) e frequência (Hz) na unidade de tempo. Para a avaliação da atividade basal foram selecionados aleatoriamente 2 períodos com a mesma duração, cuja média foi considerada como atividade simpática basal. Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade basal} = [(basal-inibido)] \times 100\% / [(estimulado-inibido)]$$

Análise em preparações multifibras como utilizado no presente estudo constitui-se em uma limitação metodológica uma vez que diferentes números de fibras podem entrar em contato com o eletrodo e assim modificar a magnitude do sinal registrado. No entanto, utilizando-se de normalização dos registros e expressando-se os valores como porcentagem da atividade máxima (100%) e/ou mínima (0%), estas limitações são minimizadas. Este recurso tem sido freqüentemente utilizado com sucesso para análise comparativa da atividade nervosa simpática obtida em preparações multifibras.

3.8 Obtenção de vasos e tecidos

Foram coletados tecidos e vasos à fresco e fixados, de acordo com o processamento ao qual foram submetidos:

- tecidos à fresco foram utilizados para o HPLC
- tecidos fixados foram utilizados para a Imunohistoquímica

3.8.1. Tecidos para o HPLC

Após a obtenção dos registros funcionais, os animais foram profundamente anestesiados (pentobarbital de sódio, 60 mg/kg.), e, imediatamente após a parada respiratória foram posicionados em decúbito dorsal. Procedeu-se a uma incisão mediana ventral ampla estendendo-se do tórax aos membros posteriores direito e esquerdo. O coração foi removido e após o afastamento dos intestinos localizou-se os rins direito e esquerdo com visualização da vascularização regional. As artérias renais foram dissecadas e removidas, assim como os rins e as supra-renais. O tronco vaso-nervoso que compreende as artérias ilíaca e femoral foi delicadamente isolado para remoção das femorais, que foram lavados em salina e armazenados. Removeu-se também a artéria aorta torácica e abdominal. Da pata foi removido o músculo sóleo (músculo locomotor) e da cabeça foi retirado o músculo temporal (controle, não locomotor). Todos os tecidos foram embrulhados em papel alumínio, identificados e mantidos em gelo seco. Os tecidos foram a seguir armazenados a -80°C para posterior detecção da catecolaminas pelo HPLC.

3.8.2. Tecidos para imunohistoquímica

Após os registros funcionais, os animais foram profundamente anestesiados (pentobarbital de sódio, 60 mg/kg.), e, imediatamente após a parada respiratória, perfundidos via ventrículo esquerdo com solução salina tamponada (0.01M PBS, pH 7,4 ~100 ml) seguida do fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato a 0,01 M, ~300-400 ml (Daiger pump, 10-15 ml/min). A pressão de perfusão foi mantida em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes. Da pata foram removidos os músculos sóleo, grácil e gastrocnêmio vermelho (músculos locomotores) e da cabeça foi retirado o músculo temporal (controle, não locomotor). Em seguida foram retirados os rins e o coração. Os tecidos foram pós-fixados em paraformaldeído 4% por 4 horas, crioprotetidos em sacarose 30% em PBS a 4°C por um mínimo de 72 horas e armazenados até processamento.

3.9 Técnica do HPLC

Os tecidos (artérias, músculos, rins, coração e supra-renal) foram homogeneizados individualmente em 2,5 ml de ácido perclórico (HClO_4) 0,2 N acrescido de EDTA 1mM e 1% de metabissulfito de sódio com o homogeneizador do tipo Omni, por 10 segundos, sendo posteriormente centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm, a 5°C (Eppendorf 5804R Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA). Em seguida, transferiu-se 2 ml do sobrenadante para tubos de polietileno largos (10,3 x 2,5cm) de fundo redondo onde se adicionou 50 mg de alumina (A1772-Sigma) ativada por 1h a 110°C, 1 ml de tampão tris 2M pH 8,9 contendo 0,5% de metabissulfito de sódio e 2,5% de EDTA, 20 µl de padrão interno (diluído de acordo com a concentração da amostra a ser dosada). Os tubos foram então tampados e agitados fortemente por 20 minutos em banho tipo DUBNOFF a temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com bomba de vácuo sem aspirar a alumina. A alumina restante foi lavada 2x com 3 ml de solução de lavagem (solução contendo Tris 5mM, metabissulfito de sódio 1 mM e EDTA 0,1mM) e centrifugada após cada lavagem. O sobrenadante foi retirado e eluído em amostras em volumes convenientes (0,2 a 1 ml), agitado durante 10 minutos no Dubnoff e centrifugado a 5000 rpm por 5 min. Novamente o sobrenadante foi retirado e colocado em tubos tipo Eppendorf. As amostras do eluído foram então passadas no HPLC.

O sistema cromatográfico, composto por bomba Waters 510, coluna Resolve C18 (partícula esférica de 5 mm, 3,9 x 150 mm) e detector eletroquímico Waters 464 é operado em modo DC, isocraticamente com fluxo de 1,0 ml/min e potencial de oxidação de +900mV, usando-se, como fase móvel, a solução de tampão fosfato de sódio 70 mM com pH 2,9-3,0 contendo 3 mM de SOS, 0,2mM de EDTA e 5% de metanol. O estoque dos padrões de noradrenalina (1 mM) foi preparado em uma solução de HCL 0,1 M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, aliquotado em tubos de microcentrífuga e mantidos em congelador a -80°C. A alíquota foi diluída em uma solução de ácido perclórico 0,1 M, EDTA 0,02% e Metabissulfito de sódio 0,02%, para obtenção das concentrações necessárias à análise.

3.10. Técnica de imunofluorescência

Secções transversas dos músculos locomotores e não-locomotores, do córtex renal e do ventrículo esquerdo (16 µm, Criostato Leica CM3050) foram coletadas diretamente em

lâminas de vidro gelatinizadas (2-4 cortes/lâmina, 4-8 lâminas/tecido). Os cortes foram incubados com 0,01% de Triton X-100 e 10% de soro de cavalo por 1 hora. As lâminas foram processadas para a Tirosina Hidroxilase (TH, a enzima-chave para a síntese de catecolaminas no terminal nervoso). Anticorpo primário anti-TH (monoclonal, feito em camundongo, na diluição 1:100, Chemicon, catálogo MAB318) diluído em PBS (0,01 M/l) foi aplicado diretamente sobre os cortes nas lâminas, que foram incubadas por 12 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Após 3 lavagens (10 minutos/cada) em PBS, os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo secundário fluorescente (FITC conjugated affinipure goat anti-mouse IgG, Jackson Immuno Research Laboratories, catálogo 115-095-003), diluído em PBS na proporção 1:100. Após três novas lavagens em PBS, as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA) Os controles negativos dos experimentos (sem fluorescência) foram realizados pela omissão do anticorpo primário ou secundário.

Todas as lâminas foram analisadas para localização de secções transversas das arteríolas. Imagens de arteríolas dos músculos esqueléticos, ventrículo esquerdo e córtex renal foram obtidas em microscópio (Nikon Eclipse E 1000, com aumento de 200 X) e capturadas (Camera Leica SN:Q277771). A imunorreatividade para TH (THir) foi analisada em 7-12 arteríolas/tecido pelo programa ImagJ e expressa como porcentagem de área ocupada pelo sinal com intensidade acima do limiar / área total de interesse. THir foi analisada na adventícia e borda médio-adventicial nos quadrantes superior, inferior, direito e esquerdo de cada secção transversa de arteríola utilizando-se de janelas retangulares padrões ($250 \mu\text{m}^2$ para arteríolas do coração e rim e de $75 \mu\text{m}^2$ para as arteríolas musculares esqueléticas). A intensidade do “background” foi calculada em janelas similares posicionadas na luz de cada arteríola e subtraída do valor absoluto de intensidade para se calcular o valor de intensidade resultante/arteríola.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM. O desempenho na esteira nos grupos SHAM e SAD de ambas as linhagens durante os protocolos de treinamento e sedentarismo foi analisado pela ANOVA de 3 fatores para medidas repetidas (tempo). Os dados funcionais de PA, FC e atividade simpática neural, de imunorreatividade para a TH e de concentração de Noradrenalina foram comparados pela análise de variância de 3 fatores: grupo (SAD x SHAM), linhagem (SHR x WKY) e condição (S x T). O post-hoc foi o teste de Newman-Kewls e o nível de significância foi fixado em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados são apresentados em subitens, de acordo com os diferentes objetivos específicos propostos.

4.1 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira

As Tabelas 1 e 2 e as Figuras 3 e 4 apresentam os valores médios absolutos de velocidades máximas atingidas durante os testes de esforço máximo realizados antes e após as cirurgias SHAM e SAD bem como as alterações de velocidades máximas atingidas nos testes máximos realizados durante os protocolos S e T.

Antes e após as cirurgias SHAM e SAD, os SHR apresentaram melhor desempenho em esteira quando comparados a seus respectivos controles WKY ($1,40 \pm 0,03$ a $1,44 \pm 0,03$ Km/h vs. $0,83 \pm 0,02$ a $0,89 \pm 0,02$ Km/h, respectivamente, Tabela 1). Observou-se em ambos os grupos queda discreta do desempenho em esteira nos ratos submetidos à cirurgia SHAM. Por outro lado, a SAD promoveu queda significativa no desempenho dos WKY (de $0,89 \pm 0,02$ para $0,68 \pm 0,02$ Km/h) e SHR (de $1,44 \pm 0,03$ para $1,26 \pm 0,04$ Km/h, Figura 3A). A comparação das quedas de desempenho induzidas pelas cirurgias (Figura 3B) mostrou reduções significativas apenas nos grupos WKY e SHR submetidos à SAD.

Tabela 1- Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima antes e após as cirurgias SHAM e SAD.

Desempenho em Esteira	SHAM		SAD	
	WKY (n=54)	SHR (n=58)	WKY (n=60)	SHR (n=52)
Vel. antes da cirurgia (Km/h)	0.83 ± 0.02	1.40 ± 0.03 *	0.89 ± 0.02	1.44 ± 0.03 *
Vel. após a cirurgia (Km/h)	0.75 ± 0.02	1.38 ± 0.03 *	0.68 ± 0.02 +	1.26 ± 0.04 * +

Valores são média $\pm$ EPM. Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY ; + vs **antes**.

Figura 3- Alterações no desempenho em esteira induzidas pelas cirurgias SHAM e SAD nos grupos WKY e SHR (A). Comparação da redução de desempenho após as cirurgias SHAM e SAD (B).

Significâncias ($p < 0,05$) são + vs antes da cirurgia; * vs WKY; # denota uma alteração significativa.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Conforme observado na Tabela 2 e Figura 4 o T determinou em ambos os grupos SHR e WKY submetidos à SAD ou SHAM melhora significativa no desempenho em esteira ergométrica, observada já na sexta semana de treinamento. Após 12 semanas de treinamento os SHR submetidos à SAD ou à SHAM atingiram velocidades similares de $1,97 \pm 0,05$ e $1,95 \pm 0,05$ Km/h, enquanto os WKY atingiram velocidades menores, mas também similares de $1,39 \pm 0,03$ e

1,34±0,04 Km/h, respectivamente, confirmando o melhor desempenho dos SHR já observado nos ratos intactos antes de qualquer procedimento cirúrgico e/ou experimental (Tabela 2) e que o T foi igualmente eficaz em aumentar o desempenho de animais SHAM e SAD. Nos grupos WKY submetidos à SAD ou SHAM e que foram mantidos sedentários por igual período de tempo, não houve alterações significativas das respectivas velocidades atingidas nos testes de esforço máximo, de forma que ao final das 12 semanas o desempenho dos WKY variava entre 0,69±0,03 e 0,64±0,03 Km/h. Já os SHR SAD sedentários ao final das 12 semanas do protocolo experimental, apresentaram maior perda na capacidade física quando comparados aos respectivos SHAM (0,86±0,03 vs 1,23±0,05 e Km/h, respectivamente, Tabela 2, Figura 4).

Figura 4- Evolução temporal do desempenho em esteira de WKY e SHR submetidos à SHAM ou SAD.

Valores são médias ±EPM. Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs semana 0

Tabela 2- Valores absolutos de velocidade máxima atingida (em Km/h) durante os testes de capacidade máxima de WKY e SHR submetidos à SHAM ou SAD nas semanas 0, 6, 12 e o ganho obtido ao final do protocolo de treinamento ou sedentarismo.

SHAM	WKY s (n=29)	WKY t (n=25)	SHR s (n=31)	SHR t (n=27)
Semana 0	0.74±0.04	0.76±0.04	1.38±0.06*	1.38±0.04*
Semana 6	0.71±0.03	1.34±0.05+#	1.19±0.05*#	1.77±0.06*+#
Semana 12	0.69±0.03	1.39±0.03+#	1.23±0.05*#	1.97±0.05*+#
Ganho	-0,05±0.03	0.64±0.04+	-0,15±0.1	0.59±0.05 +
SAD	WKY s (n=35)	WKY t (n=25)	SHR s (n=28)	SHR t (n=24)
Semana 0	0.65±0.03	0.72±0.04	1.21±0.04*	1.31±0.07*
Semana 6	0.68±0.03	1.24±0.04+#	0.89±0.03*#	1.80±0.06*+#
Semana 12	0.64±0.03	1.34±0.04+#	0.86±0.03*#	1.95±0.05*+#
Ganho	-0.01±0.04	0.62±0.05+	-0,35±0.05	0.64±0.06+

Valores são médias ±EPM. Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs semana zero

A comparação do ganho do desempenho (diferença entre as semanas 12 e 0) entre WKY e SHR, S e T, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD (Figura 5) mostra claramente a eficácia do T em aumentar a capacidade física de todos os grupos treinados com aumentos equivalentes entre WKY_{SHAMT}, WKY_{SADT}, SHR_{SHAMT} e SHR_{SADT} ($p < 0,05$), sem alterações significativas nos grupos sedentários com exceção do grupo SHR_{SADS} que apresentou um prejuízo na sua capacidade física ao final do protocolo ($-0,35 \pm 0,05$). Na comparação entre os grupos treinados é importante notar que, ao final dos protocolos, o desempenho em esteira foi similarmente aumentado em todos os grupos treinados (ganho = semana 12 - semana 0, $p < 0,05$, Figura 5, Tabela 2).

Figura 5- Comparação do ganho em desempenho em esteira nos ratos WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD.

Significância ($p < 0,05$) + vs S.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

4.2 Efeitos das cirurgias SHAM e SAD e do treinamento aeróbio sobre a hemodinâmica basal

A Figura 6 apresenta trechos dos registros hemodinâmicos de pressão arterial pulsátil (PA) e frequência cardíaca (FC) para animais representativos dos 8 grupos experimentais. Os SHR_S do grupo SHAM apresentavam valores mais elevados de PA e FC basais, além de apresentarem uma maior labilidade intrínseca da pressão quando comparados aos respectivos controles WKY. Observou-se também, nos grupos SHAM, que o T reduziu a FC basal (SHR e WKY), a PA (SHR) e a labilidade pressórica (especificamente nos SHR). Por outro lado a SAD aumentou a labilidade pressórica em ambos WKY e SHR, a qual, no entanto encontrava-se um pouco reduzida após o T. Interessante foi a observação que no grupo SHR submetidos à SAD o

treinamento físico perdeu a eficácia em reduzir a PA e FC, ocasionando inclusive aumento parcial de seus valores absolutos.

Figura 6- Comparação do ganho em desempenho em esteira nos ratos WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significância ($p < 0,05$) + vs S

FONTE: (BURGI,K, 2012)

Valores médios absolutos de PA (sistólica, diastólica e média), pressão de pulso e FC de todos os 8 grupos experimentais (WKY_{SHAMS} e WKY_{SHAMT} ; SHR_{SHAMS} e SHR_{SHAMT} , WKY_{SADS} e WKY_{SADT} ; SHR_{SADS} e SHR_{SADT}) são apresentados na Tabela 3. As medidas hemodinâmicas obtidas durante o repouso mostraram que os grupos SHR sedentários, tanto SHAM quanto SAD, exibiam maior PA (sistólica, diastólica e média), maior pressão de pulso e maior FC do que seus respectivos controles normotensos (Tabela 3, Figuras 7 e 8). No grupo SHAM o T foi efetivo em diminuir em 10% os valores basais de FC (de 359 ± 6 para 323 ± 7 bpm) e em 10% a PA média (PAM, de 180 ± 2 para 162 ± 5 mmHg) dos SHR. Nos WKY intactos houve queda de 7% na FC basal (de 310 ± 5 para 289 ± 5 b/min, WKY_{SHAMT} vs WKY_{SHAMS}), sem alteração significativa da PAM (Tabela 3, Figuras 7 e 8). Interessante, foi a observação de que nos grupos submetidos à SAD, o T aumentou a FC basal nos SHR de 347 ± 8 para 375 ± 7 bpm e de 317 ± 7 para 343 ± 6 nos WKY, correspondendo a aumentos de 8% nos 2 grupos experimentais ($p < 0,05$ para ambas as comparações Tabela 3, Figura 8). O T também determinou aumentos significativos da PAM dos SHR desnervados (de 183 ± 2 para 195 ± 4 mmHg, $p < 0,05$, correspondendo a um aumento de 7%), sem alterar significativamente a PAM no grupo WKY (Tabela 3, Figura 7). Quanto à pressão de pulso (Tabela 3), ela se mostrava elevada nos SHR_{SHAM} e SAD (vs seus respectivos controles) e o T não ocasionou alteração destes valores em nenhum dos grupos.

Tabela 3- Valores absolutos de pressão arterial sistólica, diastólica e média, pressão de pulso e frequência cardíaca nos 8 grupos experimentais submetidos à SHAM ou SAD.

<i>SHAM</i>	<i>WKYs (n=22)</i>	<i>WKYt (n=16)</i>	<i>SHRs (n=16)</i>	<i>SHRt (n=17)</i>
Pressão Sistólica (mmHg)	151 ± 1	147 ± 3	$208 \pm 3^*$	$195 \pm 4^*$
Pressão Diastólica (mmHg)	111 ± 1	105 ± 2	$149 \pm 3^*$	$137 \pm 3^*$
Pressão Arterial Média (mmHg)	130 ± 2	126 ± 2	$180 \pm 2^*$	$162 \pm 5^{*+}$
Pressão de Pulso (mmHg)	39 ± 1	43 ± 2	$60 \pm 3^*$	$58 \pm 3^*$
Frequência Cardíaca (bpm)	310 ± 5	$289 \pm 5^+$	$359 \pm 6^*$	$323 \pm 7^{*+}$
<i>SAD</i>	<i>WKYs (n=18)</i>	<i>WKYt (n=15)</i>	<i>SHRs (n=17)</i>	<i>SHRt (n=18)</i>
Pressão Sistólica (mmHg)	160 ± 3	160 ± 4	$214 \pm 2^*$	$222 \pm 4^*$
Pressão Diastólica (mmHg)	119 ± 2	116 ± 3	$159 \pm 2^*$	$170 \pm 3^*$
Pressão Arterial Média (mmHg)	137 ± 2	138 ± 3	$183 \pm 2^*$	$195 \pm 4^{*+}$
Pressão de Pulso (mmHg)	41 ± 2	44 ± 3	$55 \pm 2^*$	52 ± 4
Frequência Cardíaca (bpm)	317 ± 7	$343 \pm 6^+$	$347 \pm 8^*$	$375 \pm 7^{*+}$

Significâncias ($p < 0,05$) são * vs. WKY, + vs. S.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 7- Comparação dos efeitos do treinamento aeróbio sobre os valores basais de pressão arterial média (PAM) de WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM ou SAD.

Figura 8- Comparação dos efeitos do treinamento aeróbio sobre valores basais de frequência cardíaca (FC) de WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM ou SAD. Significâncias ($p < 0,05$) * vs WKY; + vs S.

Significâncias ($p < 0,05$) * vs WKY; + vs S

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Ao final dos registros basais de PA e FC avaliamos o funcionamento do reflexo barorreceptor por injeções de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussito de sódio. Observamos que T melhorou o controle reflexo da FC dos WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM, conforme indicado pelo cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas (Tabela 4): houve aumentos de 44% e 43% nos WKYt vs WKYs e de 36% e 25% nos SHRt vs SHRs respectivamente para bradicardia e taquicardia reflexas. Por outro lado as respostas bradicárdicas e taquicárdicas encontravam-se muito deprimidas após a SAD (Tabela 4), confirmando a eficácia da remoção das aferências dos barorreceptores.

Tabela 4- Sensibilidade do reflexo barorreceptor avaliada à partir do cálculo do índice médio de bradicardia (BR) e taquicardia (TR) em WKY e SHR sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD.

	Índice de sensibilidade (b/min/mmHg)			
	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
SHAM				
BR (bpm/mmHg)	-1.53±0.07	-2.21±0.10 +	-1.05±0.08 *	-1.43±0.07 *+
TR (bpm/mmHg)	-2.28±0.09	-3.26±0.12 +	-1.67±0.11*	-2.09±0.10 *+
SAD				
BR (bpm/mmHg)	-0.23±0.08 #	-0.41±0.10 #	-0.12±0.11 #	-0.20±0.07 #
TR (bpm/mmHg)	-0.32±0.14 #	-0.53±0.09 #	-0.26±0.10 #	-0.23±0.09 #

Valores são médias ± EPM e foram obtidos em 6-9 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0.05$): * vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

4.3 Efeitos das cirurgias SHAM e SAD e do treinamento aeróbio sobre a atividade simpática lombar (LSNA)

Comparamos os efeitos do T associado à SAD sobre a descarga do nervo lombar (registros diretos do simpático que inerva a musculatura esquelética) nos grupos SHR e WKY. A Figura 9 ilustra os registros eletroneuronográficos obtidos em quatro ratos ilustrativos dos grupos WKY_{SHAMS}, WKY_{SHAMT}, SHR_{SHAMS} e SHR_{SHAMT}, mostrando a similaridade da atividade neural para a musculatura esquelética entre normotensos e hipertensos sedentários e os efeitos opostos induzidos pelo T: redução da LSNA nos WKY_T (vs WKY_S) e aumento nos SHR_T (vs SHR_S).

Os dados quantitativos normalizados (em valores percentuais) são apresentados na Figura 10 e Tabela 5. Confirmando a observação qualitativa, não houve diferenças significativas entre os valores basais de LSNA dos SHR_S e WKY_S do grupo SHAM. Nos normotensos deste grupo o T foi acompanhado de marcante redução da LSNA, fosse ela quantificada como frequência ou amplitude do sinal (redução aproximada de 75%, $p < 0,05$, Tabela 5, Figura 10). Por outro lado o T determinou respostas opostas nos SHR_T vs SHR_S submetidos à cirurgia SHAM: houve aumento de 16% na frequência e de 35% na amplitude da LSNA ($p < 0,05$, Tabela 5, Figura 10). A SAD determinou bloqueio destas respostas, havendo inclusive nos WKY reversão da alteração observada após T, com aumentos de 47% e de 127% na frequência e amplitude do sinal, respectivamente. Já nos SHR a resposta ao T mostrava-se completamente bloqueada (Tabela 5, Figura 10).

Figura 9- Registro simultâneo da atividade simpática do nervo lombar (LSNA, eletroneuronografia) e da pressão arterial em 4 animais do grupo SHAM representativos dos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T).

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Tabela 5- Valores basais da atividade simpática lombar (LSNA) quantificada em frequência e amplitude do sinal em WKY e SHR sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD

	LSNA (%)			
	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
SHAM				
Frequência	72±8	18±2 +	75±3	87±4 *+
Amplitude	57±8	15±3 +	60±2	81±6 *+
SAD				
Frequência	64±9	94±2 + #	72±12	65±11 *
Amplitude	33±2 #	75±15 + #	50±14	36±10 *#

Valores são médias ± EPM e foram obtidos em 4-6 ratos/grupo. Significância ($P < 0.05$): * vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 10- Comparação dos efeitos do treinamento físico sobre a LSNA (frequência e amplitude do sinal) nos grupos SHAM (painéis a esquerda) e SAD (painéis a direita) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

Significância ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S. $n = 5-6$ rats/grupo

FONTE: (BURGI, K, 2012)

4.4 Comparação da atividade simpática lombar e renal em normotensos e hipertensos sedentários

Como não observamos nos SHR_{SHAMS} (vs WKY_{SHAMS}) aumento na atividade simpática lombar basal e tem sido proposto na literatura que a hipertensão espontânea cursa com hipertonía simpática, buscamos analisar em outro território - o renal - os efeitos da hipertensão sobre a atividade simpática basal (esta investigação não fazia parte de nossos objetivos iniciais, mas foi incluída no trabalho para se esclarecer a dúvida acima indicada).

A Figura 11 ilustra registros eletroneuronográficos da atividade simpática renal (RSNA) basal obtida em dois ratos representativos dos grupos WKY_{SHAMS} e SHR_{SHAMS} . Observa-se, neste território, que a hipertensão é acompanhada de nítido aumento da RSNA, o que foi confirmado pela análise quantitativa dos dados. Para estes experimentos a atividade simpática basal foi quantificada apenas como a diferença percentual a partir do valor observado após inibição do simpático com hexametônio. A Figura 12 compara para os grupos intactos WKY_S e SHR_S a atividade simpática basal normalizada nos territórios lombar e renal. Os SHR_S

apresentavam frequência de descarga basal do RSNA de $62 \pm 4\%$ (elevação percentual em relação ao valor pós-hexametônio), enquanto que nos WKY_s a frequência basal era de $27 \pm 7\%$, ou seja, a RSNA dos SHR_s mostrava-se 2,3 vezes mais elevada que a dos respectivos WKY_s ($p < 0,05$, Figura 12). Confirmando nossas observações anteriores, a frequência de descarga basal do LSNA foi similar em SHR_s e WKY_s ($37 \pm 4\%$ e $32 \pm 2\%$, respectivamente, $p > 0,05$, Figura 12); estes valores não diferiram significativamente daqueles observados no nervo renal dos WKY_s.

Figura 11- Registro simultâneo da atividade simpática do nervo renal (RSNA, eletroneuronografia) e da pressão arterial (AP) em 2 ratos representativos dos grupos normotenso sedentário (WKY_s) e hipertenso sedentário (SHR_s)

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 12- Comparação da atividade simpática basal entre normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) nos territórios lombar (LSNA) e renal (RSNA). $n = 5-6$ ratos/grupo para LSNA; $n = 4$ ratos/grupo para RSNA.

4.5 Efeitos da hipertensão, do treinamento aeróbio e da SAD sobre o conteúdo de noradrenalina (NOR) no leito arterial e em diferentes tecidos

Para analisarmos os efeitos do T e da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais sobre a inervação simpática em diferentes territórios, quantificamos pelo HPLC nos mesmos grupos de animais, o conteúdo de NOR presente em vasos de condutância (aorta torácica e abdominal), vasos de resistência (artéria femoral), além do coração, rim e supra-renal e nos músculos sóleo (músculo exercitado) e temporal (não exercitado). Como os segmentos das artérias femorais eram bastante diminutos, houve a necessidade de realizarmos a dosagem em “pool” de artérias ($n=5$ /dosagem). Registros ilustrativos do HPLC em artérias femorais para WKY_s e SHR_s do grupo SHAM são apresentados na Figura 13. Observa-se tendência ao aumento da concentração de NOR nos hipertensos sedentários.

Figura 13- “Print-out” do HPLC para artérias femorais ilustrando a sequência dos picos de noradrenalina (setas), adrenalina e padrão interno em WKY_s e SHR_s do grupo SHAM.

A Tabela 6 apresenta os dados quantitativos (valores absolutos das concentrações de NOR) obtidos pelo HPLC na aorta torácica e abdominal, na artéria femoral, nos músculos sóleo e temporal e no coração, rim e supra-renal de todos os grupos experimentais estudados. Na Figura 14 são comparados os efeitos do SAD e do T nas diferentes artérias analisadas (para a

comparação mais efetiva, os valores são apresentados na mesma escala). Observou-se nos grupos SHAM que a concentração absoluta de NOR aumentou das artérias de maior para as de menor calibre, sendo nas femorais 2,3 vezes (nos WKYs) a 2.6 vezes (nos SHR_T) mais elevada que a da aorta torácica. Foi também observado que a concentração de NOR era maior nas artérias dos SHR_S vs WKY_S. Nos grupos SHAM (Tabela 6 e painéis a esquerda da Figura 14) o T reduziu a concentração de NOR da aorta torácica e abdominal dos SHR (-50% e -33%, respectivamente, $p<0,05$) sem a alterar nos WKY. Por outro lado na artéria femoral o T foi acompanhado de aumento de 56% na concentração de NOR nos SHR, mas redução de 48% da mesma nos WKY_T vs WKY_S ($p<0,05$, Tabela 6, Figura 14). Desta forma os SHR_T apresentavam na femoral conteúdo de NOR 5,2 vezes superior ao observado nos WKY_T.

Interessante notar que os efeitos da hipertensão e do T foram praticamente bloqueados e/ou revertidos pelo SAD (Tabela 6, painéis à direita da Figura 14). Após SAD nenhuma alteração significativa foi observada na aorta torácica, observando-se, de forma oposta ao grupo SHAM, aumento do conteúdo de NOR na aorta abdominal de SHR_T vs SHR_S (Figuras 14 painéis superior e intermediário, respectivamente). Quanto à artéria femoral, houve após SAD, completa reversão das respostas ao T apresentadas pelo grupo SHAM: o T determinou pequeno aumento do conteúdo de NOR nos WKY_T vs WKY_S e redução do mesmo nos SHR_T vs SHR_S (Figura 14 painel inferior), de forma que após o T, o grupo SHR_T apresentava concentração de NOR apenas 1,4 vezes superior à dos WKY_T.

No coração (Figura 15, painel superior) a concentração de NOR tecidual mostrou-se mais elevada que a do rim e da supra-renal (Tabela 6, Figura 15, painéis intermediário e inferior, respectivamente). Esta distribuição diferencial de noradrenalina não foi alterada pela SAD. Nos grupos SHAM o T foi acompanhado, seja nos normotensos, seja nos hipertensos, por redução significativa da concentração tecidual de NOR no coração (-22% e -43% para WKY_T e SHR_T vs respectivos controles) e rins (-17% e -24%, respectivamente), com redução do conteúdo de NOR também na supra-renal dos SHR_T vs SHR_S (-38%, Figura 15, painéis à esquerda). Estes efeitos do T foram novamente bloqueados e/ou revertidos pela SAD (Figura 15, painéis à direita): houve bloqueio completo nos rins, supra-renais e coração de ambos normotensos e hipertensos, havendo inclusive no coração de SHR_T aumento de 32% na concentração de NOR tecidual após o T (Tabela 6, Figura 15B, $p<0,05$).

Tabela 6. Valores absolutos das concentrações de NOR obtidas pelo HPLC em artérias (aorta torácica aorta abdominal e femoral), coração, rins, supra-renal e musculatura esquelética (sóleo e temporal) de WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD.

SHAM	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Aorta torácica	124±20 (n=4)	132±30(n=5)	188±12(n=6)*	94±13 (n=5)+
Aorta abdominal	275±19 (n=6)	299±14(n=6)	515±16(n=9)*	347±9(n=5)+
Artéria femoral	284±10(n=10)	149±32(n=10)+	496±52 (n=10)*	775±78(n=10)*+
Coração	446±37 (n=7)	349±24 (n=5)+	523±48 (n=5)*	299±31 (n=5)+
Rim	123±3 (n=6)	102±3 (n=8)+	165±5 (n=9)*	125±6 (n=5)+
Supra-renal	143±10 (n=6)	122±9 (n=6)	180±7 (n=6)*	112±3 (n=5)+
Músculo sóleo	53±8 (n=7)	48±8 (n=5)	68±6 (n=6)	85±7 (n=5)*
Músculo temporal	45±5 (n=6)	42±4 (n=7)	40±4 (n=5)	48±2(n=4)
SAD	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Aorta torácica	130±24 (n=6)	124±18 (n=4)	136±11 (n=4)	143±9 (n=6)
Aorta abdominal	542±16 (n=5) #	466±20 (n=6) #	479±18 (n=6)	724±62 (n=8)*+#
Artéria femoral	156±4 (n=10) #	225±4 (n=10)+	347±11 (n=10)*	323±4 (n=10)*#
Coração	432±24 (n=5)	477±14 (n=4) #	425±30 (n=6)	560±50(n=6)*+#
Rim	122±4 (n=10)	111±6 (n=6)	128±6 (n=6)	143±5(n=8)
Supra-renal	141±8 (n=10)	134±8 (n=4)	144±10 (n=4) #	162±8(n=7) #
Músculo sóleo	73±8(n=5)	53±10(n=6)	77±7(n=5)	91±8(n=6)
Músculo temporal	37±3(n=6)	38±5(n=5)	38±4(n=5)	48±3(n=5)

Valores são médias±EPM. Significâncias ($P<0.05$): * vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 14- Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) na aorta torácica (painel superior), abdominal (painel intermediário) e artéria femoral (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita).

Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 15- Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) no coração (painel superior), no rim (painel intermediário) e nas supra-renaais (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita).

Significâncias ($p < 0,05$) são * vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 16. Comparação do conteúdo de noradrenalina (inferida pelo HPLC) nos músculos sóleo (painel superior) e Temporal (painel inferior) de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) sedentários (S, barras brancas) e treinados (T, barras pretas) submetidos à cirurgia fictícia (SHAM, gráficos à esquerda) ou SAD (gráficos à direita).

Significância ($p < 0,05$) é* vs WKY.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Com relação à dosagem de noradrenalina nos músculos sóleo e temporal (englobando tanto a inervação para arteríolas musculares como a inervação simpática para a musculatura esquelética propriamente dita) observamos nos grupos SHAM que o T foi acompanhado no músculo sóleo de tendência similar à observada nas artérias femorais, mas com alterações de menor intensidade que não atingiram níveis de significância (Tabela 6 e Figura 16, painel superior). A comparação entre SHR_T e WKY_T mostrou elevação significativa da concentração de NOR de 1,8 vezes, no entanto bastante inferior ao aumento de 5,2 vezes observado quando só a concentração da artéria femoral foi considerada (compare as Figuras 14 a 16). Houve após o SAD manutenção destas tendências, sugerindo a ausência de efeitos sobre a musculatura esquelética exercitada após a remoção seletiva dos barorreceptores. Quanto ao músculo temporal (controle, não ativado durante o exercício, Figura 16, painel inferior) nem a hipertensão, nem o T, nem a SAD determinaram quaisquer alterações.

4.6 Efeitos da hipertensão, do treinamento aeróbio e da SAD sobre a expressão de THir em arteríolas musculares esqueléticas, do coração e do rim

Com a finalidade de confirmarmos os efeitos do T e da SAD sobre a inervação simpática propriamente dita nos grupos WKY e SHR, analisamos, através da imunofluorescência, a expressão da TH a enzima-chave para a síntese de NOR nos terminais simpáticos em vasos musculares esqueléticos, no coração e rim de animais intactos (SHAM).

A Figura 17 ilustra a expressão de THir em arteríolas musculares esqueléticas (gastrocnêmio vermelho) e renais, respectivamente. Em todos os tecidos analisados observou-se ser a imunorreatividade mais densa na adventícia e borda médio-adventicial das arteríolas, local onde se localizam as terminações nervosas vasculares e onde as quantificações de THir foram feitas. A lâmina elástica interna das arteríolas também possui uma pronunciada autofluorescência, que, no entanto, não foi considerada em nossas quantificações. Observou-se também que a expressão THir encontrava-se aumentada nas arteríolas de SHR_s vs WKY_s, sendo mais intensa nas arteríolas renais que nas arteríolas do gastrocnêmio (Figura 17).

Figura 17- Comparação da THir entre arteríolas musculares esqueléticas e renais de normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

Inicialmente comparamos a quantificação relativa da imunorreatividade para a TH entre os diferentes tecidos analisados. A Figura 18 compara a expressão relativa de THir no coração, rim e nos diferentes leitos vasculares estudados (sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho e temporal) de SHR sedentários. A densidade de TH apresentava-se reduzida em arteríolas do coração quando comparada aos demais tecidos, sendo que as arteríolas do gastrocnêmio vermelho também apresentavam menor densidade de expressão quando comparado às arteríolas renais

Figura 18- Comparação da imunorreatividade para a TH nos diferentes tecidos analisados de SHR sedentários submetidos à cirurgia fictícia (SHAM)..

Significâncias ($p < 0,05$) * vs coração; + vs rim

FONTE: (BURGI, K, 2012)

As Figuras 19 e 20 ilustram os efeitos do T e do T associado à SAD sobre a expressão de THir em arteríolas dos rins e gastrocnêmio vermelho. Nos rins do grupo SHAM observa-se que o T foi acompanhado de redução da THir em ambos as linhagens (WKY e SHR) e que a SAD aboliu completamente estas respostas (Figura 19). Por outro lado o T determinou nas arteríolas do gastrocnêmio dos grupos SHAM respostas opostas: redução da expressão de THir nos WKY, mas aumento da mesma nos SHR. Similarmente ao observado para as arteríolas renais, a SAD também bloqueou completamente estas respostas (Figura 20).

Os dados quantitativos dos vários tecidos analisados de WKY e SHR submetidos à cirurgia SHAM são apresentados na Tabela 7 e Figura 21. No coração o T foi efetivo em diminuir em 19% os valores da THir (de 21 ± 2 para 17 ± 1 UA) nos WKY e em 47% nos SHR (de

34±3 para 18±1 UA). Nos rins o mesmo padrão de resposta foi observado, ou seja, nos WKY_T e SHR_T o T foi acompanhado de quedas de 43% (de 44±5 para 25±4 UA) e de 19% (de 73±3 para 59±8 UA), respectivamente, *vs* respectivos controles sedentários. Já nas arteríolas dos músculos locomotores (sóleo, grácil, gastrocnêmio) o T foi acompanhado de reduções significativas de aproximadamente 50% da THir dos WKY, mas aumento também significativo de cerca de 54% na THir de arteríolas musculares esqueléticas do grupo SHR ($P<0,05$ *vs* respectivos controles normotensos, Tabela 7, Figura 21). Estas mesmas tendências, porém sem atingir níveis de significância, foram observadas em arteríolas do músculo temporal não-locomotor ($p>0,05$, Tabela 7, Figura 21). Interessante observar-se que o padrão de alteração da THir pela hipertensão e treinamento no grupo SHAM reproduziu fielmente as alterações observadas no conteúdo de NOR da artéria femoral (Figura 14) e no registro direto do LSNA (Figura 9, painéis a esquerda).

Tabela 7. Valores relativos da imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (THir) no coração, no rim e em arteríolas musculares esqueléticas (sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho e temporal) de WKY e SHR, sedentários e treinados, submetidos à cirurgia SHAM ou SAD.

	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
SHAM				
Coração	21±2	17±1 +	34±3 *	18±1 +
Rim	44±5	25±4 +	73±3 *	59±8 *+
m. sóleo	71±5	39±8 +	60±7	93±9 *+
m. grácil	55±1	30±9 +	55±5	87±12 *+
m. gastrocnêmio	66±5	29±2 +	51±1	78±4 *+
m. temporal	67±9	46±6	65±7	82±12
	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
SAD				
Rim	43±2	45±2 #	50±4 #	53±2
m.temporal	44±2 #	42±2 #	45±5	47±2 #

Valores são médias±EPM. Significâncias ($P<0.05$): * *vs* WKY; + *vs* S; # *vs* SHAM
 FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 19- Secções transversais de arteríolas do córtex renal imunorreativas para TH em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T), submetidos à cirurgia SHAM ou SAD

SHAM

SAD

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 20- Secções transversais de arteríolas do gastrocnêmio vermelho imunorreativas para TH em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T), submetidos à cirurgia SHAM ou SAD

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 21- Comparação da imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (THir) no coração, rim, músculos sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho (locomotores) e temporal (não-locomotor) em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM.

Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY; + vs S

FONTE: (BURGI, K, 2012)

Figura 22- Comparação da expressão de Tirosina Hidroxilase (THir) no rim e músculo gastrocnêmico vermelho em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM e SAD.

Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY; + vs S # vs SHAM

FONTE: (BURGI, K, 2012)

A comparação dos efeitos do T em WKY e SHR submetidos à SAD ou SHAM (Tabela 7, Figura 22) mostrou que a desnervação sinoaórtica bloqueou completamente as alterações na expressão de THir em arteríolas renais e musculares esqueléticas induzidos pelo T nos animais SHAM.

4.7 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a geometria de arteríolas musculares esqueléticas

Para melhor entendermos as alterações diferenciais da expressão de THir em arteríolas musculares esqueléticas de WKY e SHR intactos, identificamos as alterações estruturais

induzidas pelo T nestes 2 grupos de animais. Estes valores são comparados na Figura 23. Arteriolas de 20-30 μm de diâmetro interno (da mesma ordem de grandeza daquelas analisadas para a expressão de TH) tiveram o diâmetro interno, o diâmetro externo e a área de secção transversa quantificados para o cálculo da razão parede/luz. Os dados quantitativos (Figura 23) indicam que os SHR_S (vs WKY_S) apresentam hipertrofia da parede caracterizada por elevada razão parede/luz, mas que o treinamento foi acompanhado de completa normalização desta variável nos SHR_T, sem alteração significativa nos WKY_T vs WKY_S. Portanto o aumento da THir em arteriolas musculares esqueléticas dos SHR_T vs SHR_S ocorria simultaneamente à drástica redução da razão parede/luz.

Figura 23- Comparação da razão parede/luz de arteriolas musculares esqueléticas de WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T).

Significâncias ($p < 0.05$) * vs WKY, + vs S.

FONTE: (BURGI, K, 2012)

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são originais em indicar que a SAD reduz agudamente o desempenho dos animais na esteira ergométrica (WKY e SHR), mas não interfere no ganho de desempenho induzido pelo treinamento físico de baixa intensidade, uma vez que ao final dos protocolos, a velocidade máxima atingida pelos SHR e WKY submetidos ou não à remoção seletiva dos barorreceptores foi equivalente. Nossos dados também confirmaram achados anteriores de nosso laboratório relativos ao melhor desempenho em esteira dos SHR quando comparados aos controles normotensos e a eficácia do treinamento físico de baixa intensidade em aumentar igualmente o desempenho de normotensos e hipertensos e sobre a similaridade do desempenho observado no grupo SHAM (VÉRAS-SILVA et al., 1997, AMARAL et al. 2000/2001; MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005;).

Demonstramos também que o treinamento aeróbio foi eficaz em induzir bradicardia de repouso em normotensos e hipertensos íntegros (submetidos à cirurgia fictícia). A redução da frequência cardíaca basal é uma característica marcante do treinamento físico e um indicativo de sua eficácia. Trabalhos anteriores da literatura e de nosso próprio laboratório têm sistematicamente mostrado redução da frequência cardíaca basal em normotensos e hipertensos treinados vs seus controles sedentários (CLAUSEN, 1977; SCHEUER, TIPTON, 1977; MEREDITH et al., 1990; FORJAZ et al., 1996; VERAS-SILVA et al., 1997; AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003; MARTINS et al, 2005; HIGA-TANIGUCHI et al, 2007; CERONI et al, 2009), o que foi confirmado pelos dados do presente trabalho.

Trabalhos anteriores também já haviam demonstrado um outro efeito benéfico do T, qual seja a redução da PA em indivíduos hipertensos e modelos animais de hipertensão (VÉRAS-SILVA et al., 1997; AMARAL et al. 2000/2001; MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005; HIGA-TANIGUCHI et al, 2007; CERONI et al, 2009). Nossos dados do grupo SHAM, mostrando queda da PA nos SHR_T, também confirmaram estas observações, demonstrando mais uma vez a eficácia do treinamento físico como conduta terapêutica em hipertensos.

A originalidade de nossos resultados foi a demonstração de que os ratos submetidos a desnervação sino-aórtica mostraram alterações hemodinâmicas opostas as dos grupos SHAM: houve após treinamento aumento da FC basal em ambas as linhagens (WKY e SHR), bem como aumento da PAM nos SHR. Estes resultados indicam, de forma inequívoca, que os efeitos hemodinâmicos benéficos do treinamento físico são dependentes da integridade dos

barorreceptores arteriais. Sabe-se que os barorreceptores arteriais sinalizam continuamente os níveis de PA ao núcleo do trato solitário, e deste aos outros núcleos bulbares de integração, desencadeando respostas coordenadas do vago e simpático a fim de corrigir desníveis para mais ou para menos da PA (MICHELINI, 2008). Ao mesmo tempo, a informação aferente pelos barorreceptores é conduzida a núcleos pré-autonômicos do hipotálamo, que integram esta informação e modulam, via projeções descendentes ao bulbo dorsal e ventral, o tônus autonômico ao coração e vasos. (DAMPNEY et al, 2004; MICHELINI, 2008). Desta forma, a ausência de informações aferentes provenientes da periferia prejudicaria a integração central a nível bulbar e suprabulbar, e, conseqüentemente os ajustes funcionais ao exercício agudo e ao treinamento aeróbio.

Em trabalho de nosso laboratório conduzido paralelamente ao nosso (CAVALLERI et al, 2011) pudemos demonstrar que a sinalização aferente carreada pelos barorreceptores é essencial em manter a plasticidade e a atividade de neurônios pré-autonômicos ocitocinergicos do núcleo paraventricular do hipotálamo que se projetam aos núcleos do trato solitário e dorsal motor do vago no bulbo dorsal, onde modulam a integração do reflexo barorreceptor. Foi ainda possível demonstrar que a sinalização aferente dos barorreceptores aos neurônios ocitocinérgicos do PVN medeiam os efeitos benéficos do treinamento físico sobre o sistema cardiovascular uma vez que a expressão de ocitocina no núcleo paraventricular correlacionava-se negativamente com a frequência cardíaca basal, ou seja o aumento da expressão de ocitocina induzida pelo treinamento era coincidente com a indução da bradicardia de repouso nos WKYT e SHRT e que estes efeitos foram completamente bloqueados pela desnervação sino-aórtica (CAVALLERI et al, 2011).

No presente estudo pudemos ainda observar que a desnervação dos barorreceptores promoveu em ambos os grupos um expressivo aumento da labilidade intrínseca da PA, a qual foi parcialmente revertida após o treinamento físico em ambos os grupos experimentais. Estes dados sugerem que o treinamento físico possa ativar ajustes e/ou mecanismos centrais e/ou periféricos, os quais atuariam no sentido de minorar o efeito da ausência dos barorreceptores, corrigindo parcialmente as oscilações de PA, o que se constitui na função primordial dos barorreceptores. Em trabalho anterior já havíamos observado que a desnervação sino-aórtica abole em hipertensos a redução da variabilidade do tônus simpático induzida pelo treinamento aeróbio (CERONI et al, 2009). Neste trabalho utilizando a análise espectral sobre séries temporais da PA descreveu-se haver nos SHR SHAM redução significativa do componente LF (indicativo da atividade simpática) o qual se correlacionava com a queda da PA subsequente ao treinamento. Interessante foi a observação de que a correlação positiva entre

níveis de PA e LF nos SHR também foi abolida após desnervação sino-aórtica (CERONI et al, 2009), indicando que a ausência da sinalização aferente pelos barorreceptores prejudica a modulação do tônus simpático pelo treinamento aeróbio. Nos grupos WKY (que não apresentam hipertonia simpática) não houve alteração da PA e do LF após treinamento (CERONI et al, 2009), reforçando mais uma vez a potencialidade desta conduta terapêutica em reverter os efeitos deletérios da hipertensão. Não sabíamos se a alteração da atividade simpática induzida pelo exercício e inferida pela análise espectral correspondia ou não a alterações do simpático periférico, e se a desnervação sino-aórtica alterava a síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático a nível vascular, cuja investigação se constituiu nos principais objetivos do presente trabalho.

Dada a complexidade e à extensão da inervação simpática, a investigação da atividade simpática vascular a diferentes territórios não é uma tarefa fácil, podendo incorrer em algumas imprecisões, de forma que várias técnicas foram utilizadas no presente trabalho: medida do conteúdo de noradrenalina tecidual pelo HPLC e a imunofluorescência para a TH, que é enzima chave para a síntese de noradrenalina no terminal simpático, e, um importante marcador da magnitude e padrão da inervação vascular. Além disto, para confirmar nossos achados sobre a quantidade de noradrenalina e a inervação simpática aos diferentes territórios, utilizamos o registro neural direto dos nervos simpáticos lombar e renal.

A quantificação da THir em arteríolas de coração, rins e musculatura esquelética mostrou diferenças entre normotensos e hipertensos e entre diferentes territórios. Observamos no grupo WKY_{SHAMS} que a THir era mais elevada em arteríolas musculares esqueléticas, apresentava valores intermediários nas arteríolas renais e valores mais baixos nas arteríolas do coração, indicando intensa inervação noradrenérgica nas arteríolas musculares esqueléticas. Observamos também nos SHR_{SHAMS} que a hipertensão não alterou a imunorreatividade das arteríolas musculares esqueléticas, mas aumentou significativamente a THir de arteríolas coronárias e renais (igualando as renais à THir apresentada pelas arteríolas musculares esqueléticas). Respostas diferenciais da atividade simpática entre normotensos e hipertensos, entre diferentes territórios e mesmo ao longo de diferentes segmentos da circulação em um mesmo tecido têm sido descritos. (RAMCHANDRA et al; 2009, OSBORN, FINK, 2010).

Através da quantificação da concentração de noradrenalina (HPLC) e da THir pudemos observar que os SHR quando comparados aos WKY apresentam aumento significativo do conteúdo de noradrenalina e da THir em vasos (exceto a femoral), em tecidos como os rins, coração e supra-renais (exceto a musculatura esquelética). Estes dados suportam evidências experimentais que têm sugerido que a hipertensão arterial é acompanhada de

aumento da atividade simpática periférica (hiperatividade simpática), mas indicam que na hipertensão espontânea o aumento do tônus simpático não é generalizado: ocorre no coração, rins e supra-renais, mas não para os vasos da musculatura esquelética, como indicado pela THir inalterada (SHR_S vs WKY_S) para as arteríolas do sóleo, grácil, gastrocnêmico e temporal e confirmada pelo HPLC que mostrava inalteração do conteúdo de NOR nas artérias femorais e músculos sóleo e temporal. Além disto, os registros diretos dos nervos lombar e renal comprovaram que a hipertensão espontânea é acompanhada de hipertonia simpática renal, mas atividade simpática muscular esquelética similar à dos normotensos. Trabalhos anteriores já haviam sugerido diferentes padrões de ativação simpática em diferentes modelos de hipertensão. Por exemplo, na hipertensão induzida por infusão de angiotensina Lohmeier et al (2001) e Barrett et al (2003) descreveram em cães e coelhos, respectivamente, aumento da atividade simpática renal. Por outro lado, Osborn & Fink (2010) neste mesmo modelo de hipertensão associado à ingestão salina, mostraram que a elevação da pressão era acompanhada de redução da atividade simpática renal, aumento do simpático esplâncnico e inalteração do simpático muscular esquelético, caracterizando como os autores descreveram, uma “assinatura simpática específica”. Nossos dados no grupo SHR_S mostrando aumento da THir e elevado conteúdo de NOR no coração, rins e supra-renais, aumento da atividade simpática renal (RSNA), mas THir e conteúdo de NOR inalterados na musculatura esquelética, acompanhado de inalteração da LSNA, também indicam um padrão diferencial de ativação simpática na hipertensão espontânea, caracterizando sua própria “assinatura simpática”. Estes dados indicam também que a determinação da THir em vasos de diferentes territórios, assim como a dosagem da NOR tecidual pelo HPLC são técnicas eficazes para se determinar a “assinatura simpática” em diferentes modelos de hipertensão. Diferentes métodos de avaliação da atividade simpática também comprovaram na hipertensão essencial ou primária níveis elevados de NOR plasmática, aumento de sua liberação regional (*spillover de NOR*); aumento da atividade simpática (microneuronografia) e maior sensibilidade à NOR em sua fase inicial (ESLER,1995; JULIUS, 1996; GRASSI,1998; ESLER , KAYE, 2000; WALLING, CHARCOUDIAN, 2007;).

Interessante observar-se que o tônus simpático normal para os vasos musculares esqueléticos de SHR não significa que eles não contribuam para a manutenção da hipertensão. Determinação da razão parede/luz de arteríolas musculares esqueléticas mostrou marcante hipertrofia da parede vascular nos SHR_S vs WKY_S, o que contribui para o aumento da resistência vascular local e para o aumento da pressão arterial.

Observamos também em nosso trabalho que os efeitos benéficos do treinamento físico nos SHR_{SHAM}, ou seja, a queda da PA e a bradicardia de repouso foram acompanhadas por queda do conteúdo de NOR (HPLC) e redução da THir na aorta, coração, rins e supra-renais, bem como da atividade simpática lombar dos ratos submetidos ao treinamento, sugerindo que a redução do tônus simpático vascular periférico possa contribuir para a queda da PA e da FC observada nos SHR_{SHAMT}. Nesta linha de raciocínio trabalho recente de nosso laboratório mostrou que a queda da PA em SHR intactos treinados encontrava-se correlacionada à redução do componente LF da PA (indicativo da variabilidade do simpático, CERONI et al, 2009) sugerindo o envolvimento do simpático, o que os nossos resultados também vieram a confirmar. Além disto, nossos dados obtidos no grupo SHR_{SAD}, indicando após treinamento bloqueio completo e/ou reversão das respostas funcionais (PA, FC e LSNA), bem como das alterações na inervação simpática e conteúdo de NOR induzidas pelo treinamento (ausência da redução da concentração de NOR e da THir na aorta, coração, rins e supra-renais) confirmam que a potencialidade do treinamento em reduzir a atividade simpática periférica e conseqüentemente a PA de hipertensos depende da integridade dos barorreceptores (e quimiorreceptores) arteriais.

Importante foi a observação de que todos os efeitos do treinamento físico em reduzir a atividade simpática (redução da LSNA e de THir em arteriolas musculares esqueléticas de WKY, redução do conteúdo de NOR e da expressão THir em coração e rins de WKY e SHR) foram completamente bloqueados pela desnervação sino-aórtica, reforçando nossa proposição de que a atividade dos barorreceptores arteriais é de fundamental importância não só para manter a atividade basal dos neurônios pré-autonômicos do hipotálamo (CAVALLERI et al, 2011), mas toda a integração central do controle autonômico, a qual determina o tônus simpático para a periferia (dados do presente trabalho). Trabalho anterior de nosso laboratório já havia demonstrado a ausência de correlação entre a magnitude do componente LF e os níveis de PA em SHR_{SAD} submetidos ao treinamento (CERONI et al., 2009). Outros estudos de nosso laboratório também já haviam sugerido, de forma indireta, que a queda da PA em hipertensos observada após o tratamento com losartan (SANGALETI et al, 2004) ou treinamento aeróbico de baixa intensidade (FELIX & MICHELINI, 2007) dependiam do bloqueio do sistema renina-angiotensina cerebral, cujo principal efeito era determinar redução da hiperatividade simpática.

Nossos resultados experimentais também mostraram que o treinamento foi eficaz em reduzir o conteúdo de NOR no coração, rins, supra-renais e femoral, além de reduzir a LSNA e a THir em vasos da musculatura esquelética de WKY_{SHAM} mesmo sem alterar a resposta

pressora, respostas estas que também foram bloqueadas pela deservação sino-aórtica. Estas observações indicam que mesmo não alterando a resposta pressora, que se encontra em níveis de normalidade, o treinamento aeróbio é capaz de reduzir parcialmente a atividade simpática vasomotora basal. Indicam também uma outra particularidade do treinamento, qual seja a de alterar de forma diferencial a atividade simpática periférica de normotensos e hipertensos, bem com a alterar diferencialmente entre os diversos territórios. Em normotensos vários estudos relataram redução da atividade simpática renal após treinamento aeróbio (DICARLO & BISHOP, 1988; MEREDITH et al; 1991; NEGRÃO, 1993), enquanto que no coração os estudos foram discordantes: houve após treinamento redução do simpático cardíaco em ratos e camundongos (NEGRAO, 1992; DE ANGELIS, 2004), mas não no homem (MEREDITH et al; 1991). Também para a musculatura esquelética os dados relativos aos efeitos do treinamento sobre a atividade simpática não são concordantes: em normotensos observou-se redução do “spillover” de noradrenalina (CORNELISSEN & FAGARD, 2005) e redução da atividade simpática lombar (CORNELISSEN & FAGARD, 2005) e fibular (GRASSI, 1994); por outro lado LATERZA et al (2007), utilizando a mesma preparação do nervo fibular não observaram após treinamento alteração no controle reflexo da atividade simpática de normotensos, mas apenas nos hipertensos treinados. Além disto, LAUGHLIN et al, (2003) tem reportado que a resposta vascular difere ao longo dos diferentes segmentos da circulação em um mesmo tecido.

É chamativo o fato de que tanto a LSNA, a dosagem de NOR em artérias femorais, como a THir de arteríolas musculares esqueléticas de WKY_{SHAM} e SHR_{SHAM} foram afetados de forma oposta pelo treinamento aeróbio: redução nos WKY e aumento nos SHR, sugerindo um comportamento diferencial do simpático ao treinamento. Efeitos similares em normotensos após o treinamento foram observados por CHEN & DICARLO (1996) que relataram redução da atividade do simpático lombar mediada pelos barorreceptores e GRASSI et al. (1994) que descreveram redução da atividade simpática do nervo fibular. No entanto LATERZA et al, (2007), utilizando preparação similar não observaram após treinamento alteração no controle reflexo da atividade simpática de normotensos, mas apenas em hipertensos treinados. Os dados do presente trabalho mostrando a redução da atividade simpática periférica em WKY e aumento da mesma em SHR após o treinamento sugerem que treinamento físico foi eficaz em reduzir em normotensos a síntese/armazenamento da noradrenalina nas arteríolas de músculos locomotores (sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil), ao passo que nos hipertensos respostas opostas foram observadas, ou seja, o treinamento físico aumentou síntese/armazenamento da noradrenalina nas arteríolas de músculos

locomotores (sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil). Para entendermos estes resultados é preciso lembrarmos dos efeitos vasculares induzidos na microcirculação pela hipertensão e pelo treinamento físico em normotensos e hipertensos: a hipertensão arterial caracteriza-se por rarefação capilar e aumento da razão parede/luz de arteríolas musculares esqueléticas enquanto o treinamento produz angiogênese capilar, neoformação de vênulas e completa normalização da razão parede/luz nos territórios exercitados de hipertensos (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al, 2003). Com exceção da angiogênese capilar, não há alteração da estrutura arteriolar em normotensos (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al, 2003). Nos SHR_{SHAMT}, frente a redução drástica da resistência local (ausência da hipertrofia arteriolar pela normalização da razão parede/luz) associada ao grande aumento da capacitância vascular (aumento da densidade capilar e venular) e em presença de PA ainda bastante elevada (redução da PA e de apenas 8-10%) haveria tendência a hiperfluxo no território muscular esquelético na situação de repouso após treinamento, o que pode ser compensado pelo aumento da vasoconstrição ativa (aumento da THir, do conteúdo de noradrenalina e da própria LSNA, demonstrados pelos presentes resultados) para manter constante o fluxo basal.

Em concordância com o aumento do simpático para a musculatura esquelética em SHR treinados, França (2001) demonstrou através de experimentos *in situ* (microscopia intravital), que o treinamento físico potencializava a vasoconstrição de arteríolas musculares esqueléticas à aplicação tópica de noradrenalina. Além disto, em SHR_T intactos também houve aumento significativo da vasoconstrição de arteríolas musculares do trem posterior frente à administração intravenosa de noradrenalina (FRANÇA, 2001), documentando importante aumento da reatividade da musculatura esquelética em SHR_T vs SHR_S. O aumento da atividade simpática para musculatura esquelética corresponderia, portanto, a um ajuste funcional para regular o fluxo sanguíneo regional em repouso. Interessante notar que a deservação sinoaórtica bloqueou e alterou em sentido oposto as respostas da atividade simpática lombar ao treinamento em normotensos e hipertensos.

Os dados do presente trabalho vieram confirmar nossa hipótese de trabalho de que mecanismos determinantes dos ajustes cardiovasculares ao exercício físico estejam centrados em vias autonômicas de controle cardiovascular ativadas pelos barorreceptores, as quais ascendem por projeções noradrenérgicas a áreas de integração hipotalâmica, modulando a atividade dos neurônios pré-autonômicos (JACKSON et al., 2005; MARTINS et al, 2005; HIGA-TANIGUCHI et al, 2007). Neurônios pré-autonômicos do PVN (ocitocinérgicos e vasopressinérgicos) projetam-se áreas bulbares de integração autonômica, modificando o tônus vagal e simpático ao coração e simpático aos vasos de resistência e capacitância,

desencadeando o aparecimento dos ajustes benéficos do treinamento ao sistema cardiovascular. Desta forma, após a remoção seletiva dos barorreceptores arteriais, a informação aferente ao PVN seria deficitária, prejudicando a modulação central e bloqueando/anulando os ajustes benéficos do sistema cardiovascular: redução da frequência cardíaca nos WKY e SHR e redução da pressão arterial nos hipertensos treinados.

6 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho demonstraram que as adaptações no simpático periférico induzidas pelo treinamento físico aeróbico de baixa intensidade são tecido-específicas e dependem da linhagem experimental. Os normotensos respondem ao treinamento com redução da atividade simpática periférica ao coração, rins e músculos esqueléticos ao passo que os hipertensos respondem com intensa redução ao coração e rins, mas aumento da atividade simpática para o território muscular esquelético.

Nossos resultados mostraram ainda que as adaptações do simpático periférico induzidas pelo treinamento dependem em ambos os grupos da integridade dos barorreceptores arteriais em sinalizar aos centros autonômicos de integração cardiovascular, uma vez que todos os ajustes foram bloqueados na ausência da integridade dos barorreceptores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F.A.; SHANNON D. C.; BERGER, A.C.; COHEN RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*, v.10, n.213, p. 220-222, 1981.

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

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

ARAKAWA, K. Antihypertensive mechanism of exercise. *Journal of Hypertension*, v. 11, p. 223-229, 1993.

BEVAN, J. A. Control of peripheral vascular resistance: evidence base on the in vitro study of resistance arteries. *Clin Invest Med*, v.10, n. 6, p. 568-572, 1987.

BEVAN, J. A. Some bases of differences in vascular response to sympathetic activity. *Circ.Res*, v. 45, n. 2, p. 161-171, 1979.

BRAGA, D. C; MORI, E.; LIGA K. T.; MORRIS, M. AND MICHELINI, L. C. Central oxytocin modulates exercise induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol*, v. 278, n. 6, p.1474-1482, 2000.

BRUM, P. C.; DA SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, v.36, n.6,p. 1018-22, 2000.

BUCKWALTER, J. B.; MUELLER, P. J.; CLIFFORD, P. S. Sympathetic vasoconstriction in active skeletal muscles during exercise. *J Appl. Physiol*, v. 83, n.5, p.1575-1580, 1997.

BUCKWALTER, J. B.; NAIK, J. S.; VALIC, Z.; CLIFFORD, P. S. Exercise attenuates α -adrenergic-receptor responsiveness in skeletal muscle vasculature. *J Appl. Physiol* v.90, p.172-178, 2001.

BURGI, K; CAVALLERI, M. T; ALVES, A. S.; BRITTO, L. R.; ANTUNES, V. R.; MICHELINI, L. C. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 300, n.2, p.264-271, 2011.

CARRETERO O. A., OPARIL S. Essential hypertension - part II: treatment. *Circulation*; v.101, p.446-453, 2000.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS.
NBR623: informação e documentação: referências.
Elaboracao Rio de Janeiro, 2002

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

CSIKY, B.; SIMON, G. Effect of neonatal sympathectomy on development of angiotensin II-induced hypertension. *Heart Circ Physiol*, v.272, n. 2, p. H648-H656, 1997.

CHOBANIAN, A. V; BAKRIS, G. L; BLACK, H. R; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L. JR; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. JR; ROCCELLA, E. J.; JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE. NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM COORDINATING COMMITTEE. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, v.42 , n.6, p.1206-1252, 2003.

CORNELISSEN, V. A., FAGARD, R. H. "Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms and cardiovascular risk factors". *Hypertension*, v. 46, p.667-675, 2005

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 female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*; v.52, n.3, p.514-521, 2008.

DAMON, D. H. TH and NPY in sympathetic neurovascular cultures: role of LIF and NT-3. *Am J Physiol Cell Physiol*,;v. 294, n.1, p.C306-C312, 2008.

DE ANGELIS, K.;WICHI, R. B.; JESUS, W. R. A.; MOREIRA, E. D.; MORRIS, M.; KRIEGER E. M.; IRIGOYEN M. C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol*, v. 96, p. 2174-2178, 2004.

DI CARLO, S. E., BISHOP, V. S. Exercise training attenuates baroreflex regulation of nerve activity in conscious rabbits. *Am. J. Physio*,v. 255 (Heart Circ. Physiol. 24), p. 974-979, 1988.

DICARLO, S. E; BISHOP, V. S. Central baroreflex resetting as a means of increasing and decreasing sympathetic outflow and arterial pressure. *Ann N Y Acad Sci*. v.940, p.324-337. Review, 2001.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M., MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am. J Physiol.l Regul. Int.Comp. Physiol.*, v.273, p. 1271-1282, 1997.

ESLER, M.; KAYE, D. Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: the role of norepinephrine kinetics. *Heart Fail Rev.*,v. 5, n.1, p.17-25. Review, 2000.

FAGARD, R. H.; CORNELISSEN, V. A. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*,v.1, p. 12-17, 2007

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension*, v.50, n.4, p.780-785, 2007 .

FLETCHER, G. F.; BALADY, G. J.; AMSTERDAM, E. A.; CHAITMAN, B.; ECKEL R.; FLEG, J.; FROELICHER, V. F.; LEON, A. S; PIÑA, I. L.; RODNEY, R.; SIMONS-MORTON D A, WILLIAMS M A, BAZZARRE T. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*,. v.14, p.1694-1740, 2001.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*, v.2, p.347-504, Review, 1982.

FRANCHINI, K. G.; Krieger, E. M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am. J. Physiol*, v. 262, p.677-683, 1992.

FRANCHINI, K. G; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst.*, v.1, p.63-69, 1993.

FUCHS, F. D.; MOREIRA, D. M.; RIBEIRO, J. P. Eficácia anti-hipertensiva do condicionamento físico aeróbio. Uma análise crítica das evidências experimentais. *Arq. Bras. Cardiol*, v.61, p.187-190, 1993

GAROFALO, M. A; KETTELHUT, I. C.; ROSELINO, J. E.; MIGLIORINI, R.H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Auton. Nerv. Syst*, v.60, p. 206-208, 1996.

GAVA, N. S.; VERAS-SILVA, A. S.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. v. 26, n.6 : p.1129-1133; 1995.

GOLDSTEIN, D.S. Plasma norepinephrine as an indicator of sympathetic neural activity in clinical cardiology. *Am. J. Cardiol*, v.48, n.6, p.1147-1154, 1981.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; CALHOUN, D.A.; MANCIA, G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension*; v. 23, n.3, p. 294-301, 1994.

GRASSI, G.; ESLER, M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens.*, v.17, n.6, p.719-734, 1999

GRASSI, G. Sympathetic Neural Activity in Hypertension and Related Diseases. *Am J Hypertens*, v. 23, n. 10, p.1052-1060, 2010.

GUILD, S.J; BARRETT, C.J.; MALPAS, S.C. Long-term recording of sympathetic nerve activity: the new frontier in understanding the development of hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol*; Review 32, p.433-9, 2005.

HARRAP, S. B.; CLARK, S. A.; FRASER, R.; TOWRIE, A.; BROWN, A. J.; LEVER, A. F. Effects of sodium intake and aldosterone on the renal pressure natriuresis. *Am J Physiol*;v. 254, n. 5, p.697-703, 1988.

HASKING, G. J; ESLER, M. D.; JENNINGS, G. L.; DEWAR, E.; LAMBERT, G. Norepinephrine spillover to plasma during steady-state supine bicycle exercise. Comparison of patients with congestive heart failure and normal subjects. *Circulation*,v.78, n.3,p.516-521. 1988

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ R, SILVA H; VELASCO, M.; PELLEGRINI, F.; MACCHIA, A.; ESCOBEDO, J.; VINUEZA, R.; SCHARGRODSKY, H.; CHAMPAGNE B.; PRAMPARO, P.; WILSON, E; CARMELA STUDY INVESTIGATORS. Hypertension in seven Latin American cities: the Cardiovascular Risk Factor Multiple Evaluation in Latin America (CARMELA) study. *J. Hypertens.*, v. 28, n.1, p.24-34, 2010.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; MORI, E.; VIANNA, F. F.; MORRIS, M.; MICHELINI L. C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary vagal complex. *Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 282, n. 2, p. R537-R545, 2002.

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, n.4, p. R1717-R1727, 2007.

IRIGOYEN, M. C.; MOREIRA, E. D.; CESTARI, I. A.; KRIEGER, E. M. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. *Braz. J. Med. Biol. Res*, v.2, p.219-222, 1991.

IRIGOYEN, M.C & KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.31, n.9, p.1213-1220, 1998.

ISRAELI, E.; KORZETS, Z.; TEKES-MANOVA, D.; TIROSH, A.; SCHOCHAT, T.; BERNHEIM, J.; GOLAN, E. Blood-pressure categories in adolescence predict development of hypertension in accordance with the European guidelines. *Am J Hypertens*, v.20, n.6, p.705-709, 2007.

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, n.5, p.3211-320, 2005

JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRES, C.; L. O, M.; CERUTTI, C.; SASSARD, J. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. *Am J Physiol*, v.259, n. 2 p.1337-1342, 1990.

JULIUS, S; NESBITT, S. Sympathetic overactivity in hypertension. A moving target. *Am. J.Hypertens*, v.9, p.113-120, 1996

KAPLAN, N. M. Guidelines for the treatment of hypertension: An American view. *J Hypertens.*, v. 13, n.2, p. 113-117, 1995.

KORNER, P. I. Role of cardiac output, volume and resistance factors in the pathogenesis of hypertension. *Clin. Sci (Lond)*. v. 5, p.77s-82s, 1979.

KRIEGER E. M. Neurogenic hypertension in rat. *Circ. Res.*, v. 15, p. 511-521, 1964

KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E. Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. *Biol Res.*, v.3, p. 273-9, Review, 1998.

KRIEGER, E. M., Neurogenic hypertension in rat. *Circ. Res.*, v. 15, p. 511-521, 1964.

LATERZA, M.C. et al. "Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients". *Hypertension*, v.49, p.1298-1306, 2007.

LONG, J. B; SEGAL, S. S. Quantifying perivascular sympathetic innervation: regional differences in male C57BL/6 mice at 3 and 20 months. *J Neurosci Methods*, v.184, n.1, p.124-128, 2009

LUNDIN, S.; RICKSTEN, S. E; THORÉN, P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand.*, v.120, n.2, p.265-72, 1984.

MALLIANI, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; CERUTTI, S. Power spectral analysis of cardiovascular variability in patients at risk for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol.*, v.5, n. 3, p. 274-86, 1994.

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

MANCIA, G.; GRASSI, G. European Society of Hypertension; European Society of Cardiology, Joint National Committee VII and European Society of Hypertension/European Society of Cardiology guidelines for evaluating and treating hypertension: a two way road? *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.16 (suppl 1), p.74-77, 2005.

MARK, A. L. The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens (Suppl)*, v.5, p.159-165, Review, 1996

MARTINS, A. S.; CRESCENZI, A.; STERN, J. E.; BORDIN, S., MICHELINI L.C. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension*, v. 46, n.4, p.1004-1009, 2005

MELO, R. M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. *Hypertension*, v. 42, n.2, p. 851-857, 2003.

MEREDITH, I. T.; JENNINGS, G. L.; ESTER, M. D.; DEWAR, E. M.; BRUCE, A. M.; FAZIO, V. A. Time course of the antihypertensive and autonomic effects of regular endurance exercise in human subjects. *J. Hypertens*, v. 8, p. 859-866, 1990.

MICHELINI, L. C. A new modulator of Cardiovascular Control during exercise. *Annals New York Academy of Sciences*, 2001.

MICHELINI, L. C., BONAGAMBA, L. G. H. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*, v. 11, (suppl.I), p. I.75-I.79, 1998.

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. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. *Braz J Med Biol Res*, v. 27, n.4, p. 1017-1032, 1994.

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.34, n.4, p.369-76, 2007.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*. v. 94, n.9, p.947-960, 2009.

MIKINES, K. J.; SONNE, B.; FARRELL, P.A.; TRONIER, B.; GALBO, H. Effect of training on the dose-response relationship for insulin action in men. *J Appl Physiol*. v.66, n.2, p.695-703, 1989.

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

MURPHY, J.C.; DARRAGH, K.; HAMILTON, A.; MANOHARAN, G.; ADGEY, A. A. Preference for pharmacological management of patients with essential hypertension among senior physicians within Northern Ireland. *J Hum Hypertens*, v. 12, p.969-72, 2007.

MYERS, J. Exercise and cardiovascular health. *Circulation*; v.107, p.e2-e5, 2003

NEGRAO, C.E.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; DENADAI, M.L.; KRIEGER, E.M. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. *Braz J Med Biol Res.*, v.25, n.10, p.1045-1052, 1992.

NEGRÃO, C.E.; FRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; FREIRE, P.M.; KRIEGER, E.M. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *Am J Physiol*, v. 265, n.2, p.365-370, 1993.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G., DELL'ORTO, S., PICCALUGA, E. et al.. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.*, v.59, n.2, p.178-193, 1986.

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

PETERSEN, O.; BECK-NIELSEN, H.; HEDING, I. Increased Insuline receptors after exercise in patients with insuline dependents Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.*, v.302, p. 886-892, 1980.

RICKSTEN, S. E.; LUNDIN, S.; THOREN, P. Spontaneous variations in arterial blood pressure, heart rate and sympathetic nerve activity in conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*, v.120, n.4, p.595-600,1984.

SALTZMAN, D.; DELANO, F. A.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. The microvasculature in skeletal muscle. VI. Adrenergic innervation of arterioles in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res.*v.44, n.3, p.263-273, 1992.

SANTAJULIANA, D.; HORNFELDT, B. J.; OSBORN, J. W. Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v.35, n.1, p.45-54,1996.

SAVERGNINI, S. Q; BEIMAN, M; LAUTNER, R. Q; DE PAULA-CARVALHO, V.; ALLAHDADI, K.; PESSOA, D. C.; COSTA-FRAGA, F. P.; FRAGA-SILVA, R. A; COJOCARU, G.; COHEN, Y.; BADER, M.; DE ALMEIDA, A. P.; ROTMAN, G.; SANTOS R. A. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*. v.56, n.1, p.112-120, 2010.

SWISSA, M., ZHOU, S.; TAN, A. Y.; FISHBEIN, M. C.; CHEN, P. S.; CHEN, L. S. Atrial sympathetic and parasympathetic nerve sprouting and hyperinnervation induced by subthreshold electrical stimulation on the left stellate ganglion in normal dogs. *Cardiovasc Pathol*, v. 17, p.303-308, 2008

THOMPSON, J. M.; O'CALLAGHAN, C. .; KINGWELL, B. A.; LAMBERT, G. W.; JENNINGS, G. L.; ESLER, M. D. Total norepinephrine spillover, muscle sympathetic nerve activity and heart-rate spectral analysis in a patient with dopamine beta-hydroxylase deficiency. *J. Auton Nerv Syst.*, v.55, n.3, p.198-206,1995.

TIPTON, C. M. Exercise training for treatment of hypertension: a review. *Clin. J. Sports. Med.*, v.9, p.104-117, 1999.

TRINDADE, A. S. JR; KRIEGER, E. M. Long-term analysis of the hypertension produced by sino- aorticdenervation in the rat. *Braz J Med Biol Res.*; v.17, n.2, p.209-17, 1984.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in hipertension. *J. Hypertens*, v. 14, p.83-93, 1996.

VASAN, R. S; LEVY, D. Rates of progression to hypertension among non-hypertensive subjects: implications for blood pressure screening. *Eur. Heart.* ,v.14, p.1067-70, 2002.

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 spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 273:p.2627-2631, 1997.

WALLIN, B. G.; CHARKOUDIAN, N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. *Muscle Nerve*, v.5, p.595-614, Review, 2007.

WHELTON, P. K.; H. E, J.; APPEL, L. J.; CUTLER, J. A.; HAVAS, S.; KOTCHEN, T. A.; ROCCELLA, E. J.; STOUT, R.; VALLBONA, C.; WINSTON, M. C.; KARIMBAKAS, J. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. *JAMA*,v.15, p.1882-1888, 2002.

WILLIAMS, R. R.; HUNT, S. C.; HOPKINS, P. N.; HASSTEDT, S. J.; WU, L. L.; LALOUEL, J. M. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. *Kidney Int*; v.44 (suppl):p.57-64, 1994.

ANEXOS A- Artigo publicado relacionado à tese.

ANEXOS B- Artigo publicado não relacionado à tese