MARINA TUPPY

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE
A SÍNTESE/ARMAZENAMENTO DE NORADRENALINA EM
ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E RENAIIS
DE RATOS HIPERTENSOS ESPONTÂNEOS**

MARINA TUPPY

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A
SÍNTESE/ARMAZENAMENTO DE NORADRENALINA EM
ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E RENAIIS DE
RATOS HIPERTENSOS ESPONTÂNEOS**

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

**São Paulo
2007**

MARINA TUPPY

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A
SÍNTESE/ARMAZENAMENTO DE NORADRENALINA EM
ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E RENAIIS DE
RATOS HIPERTENSOS ESPONTÂNEOS**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

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

**São Paulo
2007**

***É preciso ter um caos dentro de si para dar
a luz uma estrela cintilante.***

(Friedrich Nietzsche)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Georg e Vivi,
e aos meus irmãos, Paula e André, que
sempre acreditaram em mim e estiveram presentes
em todas as etapas da minha vida; em especial
ao meu marido José Paulo pelo grande incentivo,
confiança, companheirismo e amor.
Sem vocês este sonho não teria se tornado realidade!!!

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.

À Prof^a Sonia, foi a senhora que plantou esta semente que agora esta dando frutos. Muito obrigado por ter confiado em mim.

À prima/irmã/amiga Kátia por toda a ajuda, amizade e apoio. Esse trabalho também é seu!!!!

Ao Prof^o Dr^o Britto pelo enorme apoio, simpatia, colaboração e disponibilidade e pelas conversas científicas e não científicas também e por disponibilizar da utilização das dependências de seu laboratório para que os experimentos de imunohistoquímica fossem realizados.

Ao Adilson, pela simpatia e bom humor cativantes, pela disponibilidade com que sempre se propunha a ajudar e pelas dicas em relação à realização da técnica.

Ao Alexandre Ceroni, técnico do laboratório, que mesmo as vezes um pouco nervoso me ajudou muito. Obrigada!!!

À Prof^a Dr^a Luciana Venturini Rossoni pelas inúmeras conversas científicas e pelo apoio e disponibilidade que sempre ofereceu. Às suas pós-graduandas Gisele e Ana Paula pela amizade e enorme simpatia.

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

Aos amigos que passaram pelo laboratório Adriano, Gerson, pelas conversas e amizade.

Às amigas Tânia, Helaine, Keila e Claudinha e ao amigo Vinícius. Obrigado por tudo! Aprendi muito com vocês!!!

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

A todos os integrantes e flutuantes do laboratório do professor Britto muito obrigada pela ajuda, simpatia, amizade e alegria!!!! Vocês foram maravilhosos!!!!

Ao pessoal do ICB Gabriel, Fernando, Zé, Aninha, Tati, Dedé (Prof^a Andréa), Robinson, Camila, Luciana, Fernanda, Gabriela e todo o pessoal do “churrasco da lage”.

À minha família. Obrigado por tudo, não teria conseguido sem vocês!!!

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

À **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

Demonstramos anteriormente que a queda parcial da pressão arterial (PA) em ratos hipertensos espontâneos (SHR) treinados correlacionava-se com a redução da resistência vascular e normalização da razão parede/luz (p/l) de arteríolas musculares esqueléticas, sem alterações estruturais em arteríolas renais. (*J. Hypertens.* 18: 1563, 2000; *Hypertension* 42 [part 2]: 851, 2003). Neste estudo investigamos os efeitos do treinamento físico sobre a inervação simpática vascular a diferentes territórios e sobre as catecolaminas adrenais (resposta hormonal).

SHR machos (~2 meses) foram submetidos a treinamento físico de baixa intensidade (50-60% da capacidade máxima, 1h/dia, 5 dias/semana, 3 meses) ou mantidos sedentários. Ao final dos protocolos, foram submetidos a canulação crônica para registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais. Foram a seguir anestesiados profundamente e perfundidos (PBS + PFA 4% para técnica de imunohistoquímica, metade dos animais de cada grupo) ou não perfundidos (para a técnica do Western Blot, a outra metade) para retirada dos tecidos a serem analisados (músculos locomotores: sóleo, gastrocnêmio, grácil; não-locomotor: temporal; rins e supra-renais). Os tecidos foram processados para imunohistoquímica (secções de 16 μ m, criostato) e Western Blot para tirosina hidroxilase (TH).

O treinamento físico foi eficaz em aumentar a capacidade aeróbia ($+0.60 \pm 0.13$ km/h), reduzir a pressão arterial e promover bradicardia de repouso (177 ± 3 mmHg e 319 ± 7 b/min, correspondendo a reduções de 6% e 10% vs grupo sedentário, $p < 0.05$). Houve aumento marcante da imunorreatividade para TH nas arteríolas dos músculos

locomotores (+57% em média, $p < 0.05$), com aumento discreto no temporal (+24%, $p > 0.05$), sem nenhuma alteração nas arteríolas renais. Estas respostas foram acompanhadas de normalização da razão parede/luz apenas nas arteríolas dos músculos locomotores. Não se observaram alterações do conteúdo protéico de catecolaminas nas supra-renais.

Nossos dados mostram que o treinamento físico em SHR altera especificamente a resposta neural, sem alteração das catecolaminas adrenais. O aumento tecido-específico da síntese/armazenamento da TH nas arteríolas de músculos locomotores deve refletir um mecanismo compensatório à redução da razão parede/luz nos SHR treinados, visando à constância do fluxo sanguíneo local. Além disto, a falta de alteração significativa de TH nos músculos não locomotores sugere que a resposta simpática neural possa ser modulada por fatores locais.

ABSTRACT

We showed recently that pressure fall in trained spontaneously hypertensive rats (SHR) is correlated with decreased vascular resistance and skeletal muscle wall/lumen ratio normalization without changes in renal arterioles (*J. Hypertens.* 18: 1563, 2000; *Hypertension* 42 [part 2]: 851, 2003). In the present study, we investigated the effects of physical training on sympathetic vascular innervation to different tissues and adrenal catecholamines (hormonal response).

Male SHR (~2 months) were submitted to treadmill physical training (50-60% of maximal exercise capacity, 1 h/day, 5 d/weeks, 3 months) or kept sedentary (S), and then instrumented for pressure (AP) and heart rate (HR) recordings at rest. Rats were deeply anesthetized and tissues (soleus, gastrocnemius red, gracilis = locomotor; temporalis = non-locomotor muscle; kidney and adrenals) were collected for immunohistochemistry (PBS + PFA 4%, half of the rats in each group) and expression (Western Blot analysis) of tyrosine hydroxylase (TH).

Physical training improved treadmill performance ($+0.60 \pm 0.13$ km/h), and reduced AP and HR at rest (177 ± 3 mmHg and 319 ± 7 b/min, corresponding 6% and 10% fall vs S group, $p < 0.05$). After physical training, TH immunoreactivity was increased in locomotor muscles (+57% on average, $p < 0.05$) with smaller changes in the temporalis (+24%, $p > 0.05$), without any change in kidney arterioles. Training-induced TH immunoreactivity increase within the locomotor muscles was accompanied by significant reduction of arterioles wall/lumen ratio. There was no change on TH expression in the adrenals.

Data suggest that in SHR low intensity training changes specifically the neural response without any change in adrenals catecholamines. Noradrenaline synthesis/storage increase is specific for the on skeletal muscles arterioles, reflecting a compensatory neural response to training-induced structural remodeling, in order to maintain a near normal local flow. Absence of significant changes on temporalis TH immunoreactivity suggests that neural response is modulated by local factors.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Sistema Cardiovascular e Hipertensão Arterial	19
1.2 Hipertensão Arterial e Treinamento Físico	23
1.3 Atividade simpática e a estrutura vascular	27
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais experimentais	34
3.2 Teste de esforço máximo	35
3.3 Protocolos de treinamento físico de baixa intensidade e de sedentarismo	35
3.4 Técnica para cateterização arterial	37
3.4.1 Confecção das cânulas	37
3.4.2 Implantação da cânula arterial	37
3.5 Registro simultâneo da pressão arterial e frequência cardíaca	38
3.6 Obtenção dos tecidos	38
3.6.1 Tecidos para o Western Blot	39
3.6.2 Tecidos para Imunohistoquímica	39
3.7 Técnica de Western Blot	40
3.8 Técnica de Imunohistoquímica	41
3.9 Quantificação da Imunorreatividade	42
3.10 Quantificação da razão parede/luz	44
3.11 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Evolução do peso corporal e do desempenho em esteira durante os protocolos experimentais	45
4.2 Valores basais de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	49
4.3 Efeitos do treinamento físico sobre a imunorreatividade para TH em arteríolas musculares esqueléticas e renais	51
4.3.1 Músculo Sóleo	51
4.3.2 Músculo Gastrocnêmio Vermelho	51

4.3.3 Músculo Grácil.....	52
4.3.4 Músculo Temporal	52
4.3.5 Rim.....	53
4.4 Efeitos do treinamento físico sobre a estrutura de arteríolas musculares esqueléticas e renais.....	59
4.5 Efeitos do treinamento físico sobre a expressão protéica de tirosina hidroxilase	62
5. DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia de corte transversal de arteríola imunorreativa para TH no músculo sóleo ilustrando a janela de quantificação (5 x 5 μm). No esquema inferior é mostrada uma ampliação da janela, evidenciando a elevada fluorescência na borda adventícia-medial do vaso.....**43**

Figura 2. Evolução do peso corporal (gramas) durante as treze semanas dos protocolos experimentais nos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM.....**45**

Figura 3. Ganho ponderal (gramas) após as treze semanas dos protocolos experimentais nos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM, significância ($p < 0,05$) + diferente de zero (test t pareado).....**46**

Figura 4. Evolução da capacidade física durante as treze semanas de treinamento ou sedentarismo nos grupos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM; significâncias ($p < 0,05$) + diferentes de zero (t pareado); * vs S ANOVA para medidas repetidas **48**

Figura 5. Comparação da eficácia do treinamento ou sedentarismo sobre alterações de capacidade física dos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM; significâncias ($p < 0,05$) + diferentes de zero (t pareado); * vs S (t student).....**48**

Figura 6. Efeitos do treinamento físico sobre a pressão sistólica (A); pressão diastólica (B); pressão arterial média (C); pressão de pulso (D) e frequência cardíaca (E) de SHR. S= sedentário; T= treinado. Significâncias $p < 0,05$ * vs S (t student).....50

Figura 7. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo sóleo em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (5 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....54

Figura 8. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....55

Figura 9. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo grácil em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....56

Figura 10. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo temporal em SHR e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHR e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....**57**

Figura 11. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do rim em SHR e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHR e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....**58**

Figura 12. Comparação da razão parede/luz de arteríolas do músculo sóleo (A); gastrocnêmio vermelho (B); grácil (C); temporal (D); de ratos SHR e SHRt (4 a 5 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM, significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).....**61**

Figura 13. Comparação da razão parede/luz de arteríolas renais nos grupos SHR e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são médias $\pm$ EPM.....**62**

Figura 14. Comparação da expressão protéica da TH nas supra-renais de SHR (n=4) e SHRt (n=4). No alto, bandas representativas dos 2 grupos, que foram quantificadas por densitometria. Média $\pm$ EPM.....**63**

Figura 15. Comparação da imunorreatividade para TH em arteríolas de diferentes tecidos dos SHR sedentários e treinados (dados do presente trabalho) e normotensos sedentários (WKYs, Burgi e Michelini, comunicação pessoal). Significância ($p < 0,05$) * vs S; # vs SHRs (t student)..... **70**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação diagnóstica da hipertensão arterial (indivíduos adultos maiores de 18 anos de idade).....**19**

Tabela 2. Apresenta valores absolutos de pressão sistólica, pressão diastólica, pressão arterial média, pressão de pulso e frequência cardíaca, em hipertensos sedentários (SHRs) e treinados (SHRt).....**49**

Tabela 3. Valores de imunorreatividade para tirosina hidroxilase (em unidades arbitrárias) obtidas em cortes transversais de arteríolas de músculos sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho, temporal e dos rins nos grupos SHRs e SHR t. **53**

Tabela 4. Efeito do exercício físico sobre a estrutura de arteríolas da musculatura esquelética e renal em animais hipertensos sedentários (SHRs) e treinados (SHRt).....**60**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Cardiovascular e Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é uma doença crônico-degenerativa não transmissível, de natureza multifatorial assintomática (na grande maioria dos casos), caracterizada por níveis tensionais elevados, que compromete fundamentalmente o equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores que mantém o tônus vasomotor, levando a uma remodelagem vascular com aumento da parede e redução da luz dos vasos, a qual promove aumento da resistência vascular local e danos aos órgãos por eles irrigados (III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 1998; V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006; CHOBANIAN et al., 2003). Na Tabela 1, apresenta-se a classificação diagnóstica da pressão arterial para adultos (acima de 18 anos de idade), segundo o VII relatório do Joint National Comitee (CHOBANIAN et al., 2003). Aceitam-se como normais às 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.

Tabela 1. Classificação diagnóstica da hipertensão arterial (indivíduos adultos maiores de 18 anos de idade).

PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	Classificação
<120	e	< 80	Normal
120 -139	ou	80-89	Pré-hipertensão
140 -159	ou	90-99	Estágio 1 de hipertensão
≥ 160	ou	≥ 100	Estágio 2 de hipertensão

Adaptado de: Chobanian, A.V. et al.; 2003.

Apesar de todos os avanços na medicina e na fisiopatologia vascular, ainda se desconhecem os determinantes primários da hipertensão. A causa do aumento da pressão arterial, na grande maioria das vezes, permanece desconhecida, sendo a hipertensão classificada como essencial ou primária e, apenas uma pequena porcentagem de hipertensos desenvolve hipertensão secundária, de etiologia conhecida (FOLKOW, 1982; KRIEGER, 1991; HARRAP et al., 1988; CARRETERO e OPARIL, 2000). Uma vez estabelecida, a hipertensão arterial não é mais passível de reversão, exigindo terapia continuada para a redução/controle dos níveis pressóricos.

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 o volume sanguíneo e a capacitância vascular) ou funcional, resultante da combinação instantânea entre o retorno venoso, o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco) e a resistência periférica. Nas últimas décadas muitos estudos sobre os mecanismos que controlam a pressão arterial foram realizados, evidenciando inúmeros mediadores e sistemas fisiológicos que interagindo, mantém a pressão arterial em níveis adequados frente a diferentes situações. É possível, que a hipertensão seja causada por uma disfunção nestes sistemas de controle da pressão arterial (KRIEGER, 1991). 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).

Aproximadamente 15 a 20% da população adulta é classificada como hipertensa, sendo que esta porcentagem sobe a 50% ou mais nos indivíduos idosos. A hipertensão encontra-se freqüentemente associada a doenças cardiovasculares de alta morbidade e mortalidade 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).

Vários estudos têm indicado que no Brasil, assim como na população mundial, as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte (MANCIA & GRASSI, 1998; MUNTNER et al., 2002; LOUTZENHISER et al., 2002). Utilizando-se o critério atual para diagnóstico de hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg), as taxas de prevalência na população urbana variam de 22,3% a 43,9% (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

Realmente nos últimos 80 anos dados epidemiológicos do Brasil têm indicado a incidência crescente de hipertensão arterial e das doenças associadas a ela: doenças infecciosas, que respondiam por cerca de 46% das mortes em capitais brasileiras em 1930, passaram a representar apenas 5% em 2003, dando lugar às doenças cardiovasculares que representavam 12% das mortes na década de 30, mas hoje respondem por quase um terço dos números de óbitos (MALTA et al., 2006), passando a ocupar o 1º lugar entre as causas de morte da população brasileira. Este dado associado à projeção da Organização das Nações Unidas (ONU., 1998) indicando que a mediana de idade populacional passará de 25,4 anos em 2000 a 38,2 anos em 2050, sugere um quadro sombrio, com aumento marcante da prevalência de doenças crônicas e entre elas, a hipertensão arterial.

Portanto, fica claro que a hipertensão arterial é uma patologia complexa, multifatorial e de difícil tratamento. Reduzir/normalizar os níveis de pressão arterial é uma tarefa árdua que tem preocupado os clínicos/pesquisadores a mais de seis décadas. O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso, aumentadas em decorrência dos altos níveis tensionais e de outros fatores agravantes (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

O tratamento da hipertensão arterial inclui diversas terapias medicamentosas como diuréticos, vasodilatadores, atenuadores do sistema simpático, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima de conversão e dos receptores da angiotensina II, (KAPLAN, 1991; 1995; ZANCHETTI, 1995; MANCIA & GRASSI, 1998, CHOBANIAN et al., 2003) além de terapias não medicamentosas, que envolvem mudanças de estilo de vida como a restrição da ingestão de sal e álcool, perda de peso, e a realização regular de exercícios físicos leves e moderados (WORLD HYPERTENSION LEAGUE, 1991; KAPLAN, 1991;1995; CHOBANIAN et al., 2003; CLEROUX, 1999; MANCIA & GRASSI, 1998; 2005).

Em particular, o treinamento físico dinâmico aeróbio moderado isoladamente e/ou em associação com terapias medicamentosas tem se mostrado bastante eficaz em reduzir os níveis pressóricos de indivíduos hipertensos leves e/ou moderados a severos, bem como aqueles observados em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial (KAPLAN, 1991; KENNEY & SEALS, 1993; MANCIA & GRASSI, 1998; CLEROUX et al., 1999; AMARAL et al., 2001; FRANCA & MICHELINI, 2001; MELO et al., 2003). É importante ressaltar que a redução, ainda que parcial, da pressão arterial nos hipertensos reduz a morbi-mortalidade ajudando a diminuir os

riscos de doenças coronarianas e contribuindo significativamente para o bem estar dos pacientes.

1.2 Hipertensão Arterial e Treinamento Físico

A hipertensão arterial , na sua fase crônica, caracteriza-se por elevação mantida da resistência periférica, sem alteração no débito cardíaco (GUYTON, 1970; FOLKOW, 1982). Há comprometimento estrutural da microcirculação periférica; essencialmente das arteríolas e esfíncteres pré-capilares que se remodelam elevando significativamente a resistência vascular ao fluxo sanguíneo (GUYTON, 1970; LEVY et al., 2001). O aumento da resistência periférica pode ocorrer por diversos mecanismos tais como:

- diminuição da luz arteriolar, subsequente a vasoconstrição ativa e determinada primariamente por aumento da atividade simpática (JUDY et al., 1976; SCHIMID-SCHONBEIN et al., 1987) ou sensibilidade aumentada a agentes vasoconstritores (BÖHLEN, 1979, 1989; BARBEIRO et al., 1996).
- disfunção endotelial acarretando um desequilíbrio entre fatores relaxantes (EDRFs) e constritores (EDCFs) derivados do endotélio, com predomínio de respostas vasoconstritoras (VANHOUTTE, 1996).
- alterações estruturais nos vasos com aumento da razão parede/luz de arteríolas (FOLKOW et al., 1973, SAFÁR, 1996), causada por hipertrofia, hiperplasia e/ou remodelagem da musculatura lisa vascular (MULVANY, 1992; GIBBONS, 1995; IZZARD et al., 1996), a qual se expandiria em direção à luz, reduzindo o raio interno (com ou sem alteração da área de seção transversa da parede BAUMBACH & HEISTAD, 1989).

- rarefação das arteríolas e capilares, determinando redução do número de canais paralelos e da condutância na microcirculação (CHEN et al., 1981; PREWITT et al., 1982; 1984; BOHLEN et al., 1989; GREENE et al., 1989; 1992; HANSEN-SMITH et al., 1990; RAKUSAN & WICKER, 1990; STRUIJKER-BOUDIER et al., 1992; GIBBONS, 1995; PRASAD, 1995; HERNANDEZ & GREENE, 1995).

Embora a queda da pressão arterial subsequente ao treinamento físico seja um achado constante em hipertensões crônicas de diferentes etiologias (CHOBANIAN et al., 2003), pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o treinamento físico determina a redução da pressão arterial. É possível que a eficácia em reduzir a pressão arterial dependa do tipo, da intensidade e da frequência do treinamento realizado (MARTI, 1992.; ARAKAWA, 1993; GAVA et al., 1995; VÉRAS-SILVA et al., 1997; PESCATELLO et al., 2004). Sugeriu-se também que a eficácia do treinamento físico em reduzir a pressão arterial de hipertensos estaria relacionada à capacidade do treinamento em modificar (ou não) os mecanismos que desencadearam a hipertensão. A identificação do(s) mecanismos (s) pelo(s) qual (is) o treinamento físico estaria agindo para atenuar e/ou reduzir a hipertensão em alguns casos, mas não afetá-la em outros, é um problema ainda em aberto. Estudos designados para aferir os efeitos do volume de treinamento sobre parâmetros cardiovasculares têm indicado a eficiência dos protocolos de baixa intensidade (50% a 65% do VO_2 máx.) em detrimento daqueles em que a intensidade é superior a 85% do VO_2 max., (GAVA et al., 1995; VÉRAS-SILVA et al., 1997) e que programas de treinamento físico para hipertensos devem ser realizados no mínimo três vezes por semana, 30 minutos por sessão e por períodos de no mínimo três meses (PESCATELLO et al., 2004).

Várias hipóteses têm sido propostas para se explicar a redução da pressão arterial de hipertensos crônicos após treinamento físico, mas o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o exercício físico repetitivo induziria queda de pressão arterial é assunto ainda bastante controverso. Entre estes mecanismos citam-se: 1) diminuição do débito cardíaco e/ou resistência periférica total, 2) redução do tônus simpático, 3) aumento da sensibilidade dos barorreceptores aórticos e carotídeos, 4) aumento da sensibilidade dos receptores β_2 adrenérgicos vasculares e diminuição da sensibilidade dos receptores α adrenérgicos, 5) diminuição dos níveis plasmáticos de renina e angiotensina, 6) redução da resistência à insulina, 7) alteração da reatividade vascular e do balanço EDRFs/EDCFs 8) redução da rarefação e/ou indução da angiogênese na microcirculação (HARLEY et al., 1972; McCRIMMON et al., 1976; LEBLANC et al., 1977; LUND-JOHANSEN, 1980; MELIN et al., 1980; TIPTON et al., 1982; VANHOUTTE., 1996; MELO et al., 2003).

Estudos pioneiros realizados no laboratório da Prof Doutora Lisete C. Michelini descreveram que o exercício físico aeróbio de baixa intensidade determinava em ratos hipertensos espontâneos (SHR) diminuição da pressão arterial, a qual se correlacionava positivamente com a redução da resistência vascular da musculatura esquelética, que por sua vez era explicada pela normalização da elevada razão parede/luz das arteríolas musculares esqueléticas presente apenas nos SHR treinados. Observou-se também, que o treinamento físico foi acompanhado de aumento da densidade de vênulas (nos SHR) e de capilares (nos SHR e controles normotensos) na musculatura exercitada (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003). Em ratos normotensos, além da angiogênese vascular, estudos do laboratório

também demonstraram que o treinamento físico alterava o controle autonômico do sistema cardiovascular facilitando o tônus parassimpático ao coração durante o repouso e potencializando a atividade simpática durante o exercício dinâmico (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI & MORRIS, 1999; BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001).

Portanto, buscando identificar mecanismos pelos quais o treinamento de baixa intensidade é eficaz em reduzir a pressão arterial de ratos hipertensos espontâneos (SHR), demonstrou-se que:

- I. a redução significativa da pressão arterial encontrava-se associada à diminuição da resistência vascular do trem posterior (AMARAL et al., 2000).
- II. a queda da pressão arterial encontrava-se diretamente correlacionada com o remodelamento eutrófico (normalização da razão parede/luz das arteríolas) do músculo grácil (PETERSEN, 1980) e espinotrapézio (FRANCA & MICHELINI L.C, 2001).
- III. a normalização da razão parede/luz das arteríolas tratava-se de uma resposta generalizada da musculatura esquelética presente tanto nos músculos exercitados (sóleo, grácil, gastrocnêmio, espinotrapézio) como em outro músculo não locomotor (temporal), estando ainda presente no miocárdio e diafragma, mas sem nenhuma alteração nas arteríolas renais (MELO et al., 2003).
- IV. a diminuição da pressão arterial no SHR era acompanhada de um aumento significativo da densidade venular (diâmetro interno menor que 40 μm) da

musculatura esquelética locomotora e não locomotora (AMARAL et al., 2001; MELO et al., 2003).

Interessante observar que nenhuma dessas alterações aparecia nos ratos normotensos (WKY) submetidos ao mesmo protocolo de treinamento (AMARAL et al., 2000; 2001; FRANÇA e MICHELINI., 2001; MELO et al., 2003).

Por outro lado, o treinamento físico determinou o aumento da densidade capilar em ambos os grupos - normotensos e hipertensos - mas apenas nos tecidos exercitados (sóleo, grácil, gastrocnêmio, espinotrapézio, coração e diafragma), sem nenhuma alteração naqueles não exercitados (temporal, rins, MELO et al., 2003).

Em conjunto essas observações indicavam que o aumento do leito capilar refletia o aumento da captação de oxigênio pelos músculos em atividade, sendo um ajuste local, enquanto que a normalização da razão parede/luz das arteríolas, ocorrendo simultaneamente na musculatura esquelética exercitada e não exercitada, não se tratava de uma resposta local, mas que possivelmente envolvia mecanismos neurais e/ou hormonais, ou mesmo uma associação destes com as respostas locais. É nossa hipótese de trabalho que a inervação simpática e/ou alteração de sua atividade possa contribuir ou estar envolvida na resposta estrutural de arteríolas ao treinamento.

1.3 Atividade simpática e a estrutura vascular

Conforme foi 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 simpático e parassimpático) o qual é responsável pelos ajustes rápidos frente às modificações do ambiente global. Ajustes instantâneos

da atividade cardíaca, são mediados pelo simpático e parassimpático enquanto alterações da atividade vascular são mediadas pelo simpático.

O sistema simpático envolve os neurônios pré-motores de diferentes áreas do sistema nervoso central que se projetam à coluna intermédio-lateral da medula espinhal, nos níveis torácicos (T1 a T12) e lombar alto (L1 a L3), onde fazem sinapse com os neurônios pré-ganglionares que emergem da medula espinhal, onde se situam seus corpos celulares e projetam-se aos neurônios pós-ganglionares na cadeia ganglionar paravertebral. O neurotransmissor das fibras pré-ganglionares é a acetilcolina enquanto o neurotransmissor das fibras pós-ganglionares é a noradrenalina (RANG, 1995).

A síntese da noradrenalina inicia-se com a hidroxilação do precursor, a tirosina, um aminoácido de origem alimentar, que é captado do sangue nos locais de biossíntese de catecolaminas (BEVAN, 1979). As enzimas que participam da formação da noradrenalina são sintetizadas nos corpos celulares e depois transportadas ao longo dos axônios até suas terminações. A transformação da tirosina em DOPA é realizada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A DOPA, é descarboxilada para formar dopamina, cuja reação é catalisada pela L-amino descarboxilase. Essas duas primeiras etapas ocorrem no citosol do neurônio adrenérgico. A dopamina é, então, ativamente transportada para o interior das vesículas, onde é convertida em noradrenalina pela ação da dopamina β -hidroxilase (DBH), contida nas vesículas de armazenamento. A noradrenalina armazenada nas vesículas será então liberada, para fenda sináptica, frente a estímulos nervosos. Na fenda sináptica ela pode combinar-se com receptores pós-sinápticos (predominantemente α_1) desencadeando efeitos intracelulares que levam à vasoconstrição, podendo também ser recapitada pelo

próprio neurônio, ou ainda metabolizada (RANG, 1995; GOLDSTEIN, 1981). Nos neurônios adrenérgicos o produto final é a noradrenalina, enquanto que na medula supra-renal esta cascata de reações continua até a formação da adrenalina pela ação da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase.

Interessante notar que a etapa inicial desta “cascata de reações” catalisada pela TH constitui-se no passo limitante para a reação de biossíntese da noradrenalina, sendo ativada durante estimulação nervosa, a qual não só aumenta a atividade como também induz a expressão gênica da enzima TH. É ainda sabido que a TH esta sujeita à inibição por feedback-negativo pelos compostos catecolaminérgicos e pela ocupação dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos (ZIGMOND et al., 1989).

As terminações simpáticas nos vasos de resistência são difusas e distribuem-se na borda médio-adventicial do vaso (BEVAN, et al.; 1980). Em linhas gerais, a ação simpática sobre o sistema cardiovascular, tem como característica a vasoconstrição de forma que o simpático vasoconstritor constitui-se no elemento mais importante de que dispõe o sistema nervoso central para regular a resistência periférica e a perfusão tecidual. É através dele que são realizados os ajustes momentâneos do tônus para artérias, arteríolas e esfíncteres pré-capilares. Sabe-se atualmente que o simpático não age em bloco (a não ser em situações de emergência) e que seu tônus pode ser diferencialmente modulado nos vários territórios, havendo uma delicada regulação regional (MICHELIN, 1999; CAMPOS e McALLEN, 1997).

Sabe-se que durante a fase de crescimento, a diferenciação e/ou crescimento da musculatura lisa vascular é de suma importância para o desenvolvimento dos vasos sanguíneos. A diferenciação da musculatura lisa vascular está associada com o aumento na expressão das proteínas contráteis actina e miosina. Na idade adulta, o

crescimento vascular por sua vez, está associado a doenças cardiovasculares como a hipertensão e a arteriosclerose, comprometendo a função cardiovascular. Os mecanismos que regulam fisiológica e/ou patologicamente o crescimento vascular ainda são desconhecidos (DAMON, 2005). Estudos *in vivo* indicaram que a atividade simpática promove crescimento vascular, porém os mecanismos pelos quais o sistema nervoso simpático induz crescimento e/ou diferenciação vascular ainda não estão completamente entendidos (DAMON, 2000). Dimitriadou et al. (1988) demonstraram que a desnervação simpática promovia mudanças morfológicas no músculo liso vascular. Kacem et al. (1995) demonstraram que havia uma menor expressão de vimentina em arteríolas desnervadas quando comparado a arteríolas innervadas. Damon (2005) também demonstrou maior expressão de α -actina em artérias femorais innervadas quando comparadas com os vasos desnervados e maior expressão de miosina em culturas de células feitas na presença de gânglios simpáticos do que na ausência dos mesmos.

Embora muitos estudos tenham associado o crescimento da musculatura lisa vascular (hipertrofia de artérias/arteríolas) à hipertensão (FOLKOW, 1982) e hipertensão à hipertonia simpática (SCHLAICH et al., 2004) pouco se sabe sobre os mecanismos condicionantes do tônus simpático e da estrutura vascular na hipertensão e treinamento físico. Negrão et al., (1993) demonstraram a eficácia do treinamento físico em reduzir a atividade basal do simpático renal. Também Di Carlo e Bishop (1988) demonstraram que o treinamento físico atenua a regulação reflexa do simpático renal reduzindo sua atividade durante quedas transitórias da pressão arterial. No

entanto, Buckwalker et al. (1997) descreveram haver aumento da atividade simpática para a musculatura esquelética, durante o exercício agudo.

Outros estudos têm ainda indicado a potencialidade do treinamento físico em alterar mecanismos centrais de controle da pressão arterial de hipertensos (KRAMER et al., 2001; DI CARLO et al., 2002) e normotensos (DUFLOTH et al., 1997; MICHELINI e MORRIS, 1999; BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001) ao nível do hipotálamo (KRAMER et al., 2001; DI CARLO et al., 2002) ou em nível bulbar (DUFLOTH et al., 1997). É possível que estes ajustes induzidos pelo treinamento físico possam interferir com o tônus simpático para vasos da musculatura esquelética, e, desta forma modular as alterações estruturais observadas. Com exceção dos estudos relativos aos efeitos do treinamento sobre atividade simpática renal em normotensos (DI CARLO e BISHOP, 1988; 1990; NEGRÃO et al., 1993), e daqueles sobre variação da atividade simpática muscular durante exercício agudo (BUCKWALTER et al., 1997) não há informações sobre possíveis alterações na inervação/atividade simpática para os vasos da musculatura esquelética.

A falta de informações talvez se deve à dificuldade de se quantificar a atividade vascular. Realmente quantificar a atividade simpática para vasos nos diferentes territórios não é uma tarefa fácil e várias técnicas têm sido utilizadas para este fim: dosagem de catecolaminas plasmáticas (GOLDSTEIN, 1981; THOMPSON et al., 1995), registros eletroneuronográficos da atividade simpática renal, esplâncnica e muscular esquelética (IRIGOYEN e KRIEGER, 1998; GRASSI et al., 1994) simpatectomia (JULIEN et al., 1990; CSIK et al., 1997) e/ou bloqueio ganglionar (SANTAJULIANA et al., 1996), análise espectral sobre a variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca (AKSELROD et al., 1981; PAGANI et al., 1986;

MALLIANI et al., 1984). Em modelos animais de hipertensão a grande maioria dessas técnicas fornece apenas índices da atividade simpática sem particularizá-la aos diferentes territórios (“spill over” de catecolaminas, bloqueio simpático, análise espectral) ou a fazem apenas em uma região específica (eletroneuronografia em animais anestesiados, situação em que o tônus simpático se encontra alterado pela retirada de mecanismos modulatórios corticais e/ou hipotalâmicos).

Marcadores específicos da síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático têm sido recentemente utilizados como índices da atividade simpática local. A localização tecidual da TH e da D β H (ZHOU et al., 2004) pela imunohistoquímica tem se mostrado eficaz na identificação dos estoques de noradrenalina nos terminais nervosos. Além disto, trabalho recente demonstrou que a associação das técnicas de análise de imagem com imunohistoquímica permite uma boa quantificação da imunorreatividade para D β H, indicativo da disponibilidade de noradrenalina local (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007). Desta forma a localização precisa da imunorreatividade para TH, a quantificação de sua densidade nas arteríolas bem como a identificação das características estruturais das mesmas arteríolas permitirão uma avaliação conjunta das alterações regionais da geometria vascular e atividade simpática induzidas pela hipertensão e pelo treinamento físico nos diferentes leitos vasculares.

2 OBJETIVOS

São, portanto objetivos específicos deste trabalho utilizando as técnicas de imunohistoquímica e Western Blot para a tirosina hidroxilase e de análise de imagens em grupos SHR sedentários (SHRs) e treinados (SHRt):

- a) avaliar os efeitos da hipertensão e do treinamento físico de baixa intensidade sobre a inervação simpática para vasos da musculatura esquelética exercitada (grácil, sóleo, gastrocnêmio vermelho) e não exercitada (músculo temporal).
- b) avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a inervação simpática vascular nos rins que respondem de forma diversa ao exercício (vasoconstrição).
- c) quantificar os efeitos do treinamento físico sobre a medula adrenal responsável pela síntese/liberação das catecolaminas plasmáticas.
- d) correlacionar estas respostas ao treinamento físico com alterações estruturais de arteríolas nos diversos territórios e com os parâmetros hemodinâmicos dos SHR em ambas as condições.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Um dos maiores obstáculos para se estudar a hipertensão arterial é a reprodutibilidade do modelo experimental em caracterizar as diferentes formas e etiologias da hipertensão no homem. Dentre os modelos genéticos de hipertensão arterial espontânea o Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), desenvolvido por Okamoto e Aoki, é o modelo que mais se aproxima da fisiopatologia da hipertensão essencial do homem. Os SHR foram desenvolvidos por cruzamento genético meticuroso (irmãos com irmãs) de ratos Wistar-Kyoto. Após a terceira geração, conseguiu-se estabelecer uma colônia de ratos que desenvolveram hipertensão espontânea em 100% dos descendentes. Os SHR nascem normotensos, mas começam a desenvolver hipertensão arterial espontaneamente ao redor da quarta semana de vida; a PA se eleva gradualmente nas 4-6 semanas seguintes, atingindo níveis bastante severos de hipertensão que se mantém por toda a vida do animal (OKAMOTO & AOKI, 1963).

Foram portanto, utilizados SHR provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com dois a três meses de idade e pesando entre 170-200 g no início dos protocolos. Durante 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, recebendo ração e água *ad libitum*. O peso corporal foi aferido semanalmente durante todo o protocolo experimental. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de

acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB (CEEa), em 23/08/2005 sob número 064, folha 19 livro 2.

3.2 Teste de esforço máximo

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada individualmente e de forma indireta, através do teste de esforço máximo. O teste constitui na avaliação do desempenho do rato durante corrida em esteira ergométrica, iniciando-se com velocidade de 0,3 Km/h e com incrementos de 0,3 em 0,3 km/h a cada 3 minutos, até o ponto de exaustão de cada animal. O teste foi realizado para todos os animais antes do início dos protocolos (semana zero), na metade (6ª semana) e do final dos protocolos (13ª semana).

3.3 Protocolos de treinamento físico de baixa intensidade e de sedentarismo

Durante um período inicial de adaptação de duas semanas (cinco sessões de 0.4-0,6 km/h, 0% inclinação, 10 minutos/dia) os animais foram selecionados pela habilidade de andar/correr na esteira ergométrica (Inbramed, Millennium) adaptada para ratos. A esteira é constituída de 10 (dez) raias de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de corrida. Estas modificações facilitam o treinamento dos ratos, evitando o uso de choques elétricos.

No último dia do período de adaptação os animais foram submetidos ao teste de esforço máximo, cujos resultados foram utilizados para subdividir os ratos, com capacidade física equivalentes, aos grupos sedentário (SHRs) ou treinado (SHRt) e

para calcular a velocidade média de endurance no grupo SHRt. Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo.

O protocolo de treinamento físico aeróbio de baixa intensidade (50-60 % da carga máxima atingida no teste de esforço) envolve um programa de exercício repetitivo realizado durante 1 h/dia, 5 dias/semana, por 13 semanas, conforme padronizado em nosso laboratório (MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005). Iniciava-se com tempos curtos (20 minutos/dia) e velocidades baixas (0.5 km/h). A intensidade do treinamento foi aumentada gradualmente pela combinação da velocidade e da duração (inclinação da esteira foi mantida em 0%), atingindo 1h/dia na 3ª semana e 50-60% da intensidade a partir da 4ª semana. Na 6ª e 13ª semana, foram realizados novos testes de esforço máximo para se ajustar à intensidade do treinamento e aferir-se o ganho da capacidade física dos animais respectivamente. A intensidade escolhida (50-60% da capacidade máxima) tem sido indicada como a intensidade ideal para obtenção de efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular de hipertensos, como a redução da pressão e o remodelamento de arteríolas (AMARAL et al., 2000, 2001; MELO et al., 2003).

Os ratos do grupo SHRs foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas uma vez/semana colocados na esteira (5 min com velocidade de 0,5 km/h) para que se acostumassem ao manuseio experimental e à esteira. Estes também realizaram testes de capacidade máxima no mesmo período que os treinados.

3.4 Técnica para cateterização arterial

3.4.1 Confeção das cânulas

As cânulas para implantação crônica na artéria carótida 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. A soldagem foi realizada sob calor com auxílio de um guia de aço de 0,35 mm de diâmetro para preservação da luz interna do cateter. As cânulas foram preenchidas com solução salina heparinizada (0,1: 0,9 ml) e mantidas ocluídas com pino de metal.

3.4.2 Implantação da cânula arterial

Ao final do protocolo de treinamento ou sedentarismo, no dia anterior à realização dos experimentos os animais foram anestesiados (Ketamina/Xilasina/Acepromasina, 0,7/0,2/0,1 v/v, 0,4 ml/100gr), posicionados em decúbito dorsal. Após tricotomia e assepsia da região anterior do pescoço realizou-se uma incisão na região ventral direita para dissecação e isolamento da artéria carótida. Após a ligadura da porção distal com fio de algodão e do clampeamento da porção proximal com pinça de oclusão, realizou-se com auxílio de uma tesoura uma incisão transversal na parede do vaso através da qual foi introduzida a porção mais fina da cânula de Tygon, em direção à aorta. A cânula foi firmemente amarrada à artéria com fio de algodão na região da junção dos tubos e a parte mais espessa de Tygon foi exteriorizada, através do tecido subcutâneo, no dorso (região cervical-posterior) do

animal onde foi fixada com uma sutura. As incisões ventral e dorsal do pescoço foram então suturadas, procedendo-se a seguir a assepsia local com água oxigenada.

Durante a recuperação anestésica, os ratos foram mantidos aquecidos, permanecendo em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, até a realização dos experimentos no dia seguinte.

3.5 Registro simultâneo da pressão arterial e frequência cardíaca

Todos os registros dos parâmetros funcionais foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação, e obtidos no dia subsequente a canulação arterial (em ambos os grupos os registros foram sempre feitos cerca de 24 horas após o final dos protocolos experimentais)

A pressão arterial (pulsátil e média) foi registrada diretamente na aorta torácica, via cânula implantada na 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 foi obtida a partir da contagem dos pulsos de pressão arterial, determinada através do tacógrafo (Biotach, Gould). Para obtenção dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca, aguardou-se o tempo necessário (15-30min) para o desaparecimento da atividade exploratória do animal. Os registros basais propriamente ditos foram iniciados após a estabilização dos níveis de pressão arterial e frequência cardíaca e duraram cerca de 30-40 minutos. Os registros hemodinâmicos foram sempre realizados no período da manhã.

3.6 Obtenção dos tecidos

Após os experimentos funcionais os animais foram profundamente anestesiados (ketamina, xilazina e acepromazina 0,7: 0,2: 0,1v/v, 0,08 ml/100 g peso,

i.m). Imediatamente após a parada respiratória, metade dos animais de cada grupo (n= 5-8 /grupo) foram dissecados para obtenção dos tecidos a fresco enquanto que a outra metade (5-8/grupo) foi perfundida para obtenção dos tecidos fixados, a serem processados pelas técnicas de Western Blot e Imunohistoquímica, respectivamente.

3.6.1 Tecidos para o Western Blot

Para obtenção dos tecidos (músculo sóleo, gastrocnêmio vermelho e temporal), artérias (femoral e renal) e supra-renal, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, realizando-se uma incisão mediana ampla por todo o abdômen e extensão do membro posterior. O tronco vásculo nervoso que compreende as porções ilíaca e femoral (artéria+nervo+veia) foi delicadamente dissecado desde a região proximal até a porção mais caudal. As artérias femorais foram, então, removidas lavadas em salina e colocadas imediatamente em gelo seco. Foram retirados os músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho e temporal que foram também imediatamente armazenados em gelo seco. Em seguida foram afastadas as víceras e intestinos, evidenciando no campo cirúrgico apenas o rim direito e a vascularização regional. As artérias renais e glândulas supra-renais foram então delicadamente dissecadas, removidas e armazenadas em gelo seco. Da cabeça foi retirado o músculo temporal e armazenado em gelo seco.

Ao término do procedimento os tecidos foram guardados em freezer (-80 graus Celsius) para posterior análise pela técnica de Western Blot.

3.6.2 Tecidos para Imunohistoquímica

Imediatamente após a parada respiratória os ratos foram perfundidos via ventrículo esquerdo inicialmente com salina tamponada (PBS ~100 ml, pH 7,4),

seguida do fixador (paraformaldeído 4% em PBS). A perfusão com bomba peristáltica (Milan ~10 ml/min) foi realizada sob pressão, em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes. Em seguida, foram retirados das patas traseiras, os músculos sóleo, grácil e gastrocnêmio vermelho. O músculo temporal e os rins também foram removidos. Os tecidos foram então pós-fixados em paraformaldeído 4% em PBS 0,01M por 12 horas e depois crioprotetidos em sacarose 30% em PBS e armazenados a 4° C até processamento.

3.7 Técnica de Western Blot

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com Polytron® em tampão de extração (Triton-X 100, 1%; Tris pH 7, 4, 100mM; pirofosfato de sódio e fluoreto de sódio, 100mM; EDTA e ortovanadato de sódio, 10mM; PMSF, 2mM; e aprotinina, 0,01mg/ml), seguida de centrifugação (30 minutos/12000rpm) para a remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria; o restante foi diluído em tampão Laemmli contendo 200mM de DTT (5:1), e mantido a 4°C até sua utilização. Cerca de 150 a 200 µg de proteína total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8% para TH (peso molecular da TH= 59-61 kDa) no aparelho para minigel. A transferência das proteínas foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram tratadas com solução bloqueadora a 3 % (leite desnatado Molico, 5%; Tris, 10 mM; NaCl, 150mM; e Tween20, 0,02%), a 4°C durante a noite. A seguir, as membranas foram incubadas com TH (1µl/1ml: Chemicon Lab: feito em camundongo: catalogo no. MAB318) em solução bloqueadora por 4h a temperatura ambiente e lavadas (Tris, 10 mM; NaCl,

150mM; e Tween20, 0,02%) por 30 min, incubadas com anticorpo secundário anticamundongo (TH) com peroxidase por 1h, e, a seguir com solução para detecção por quimiluminescência, de acordo com as recomendações do fabricante. A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com programa específico (Scioncorp, NIH, USA).

3.8 Técnica de Imunohistoquímica

Os músculos locomotores (sóleo, grácil e gastrocnêmio vermelho), não locomotores (temporal) e o rim foram incluídos em TBS, congelados, seccionados em criostato (Leica CM 1850, Germany) e coletados em lâminas de vidro gelatinizadas. Secções transversais (16µm) dos músculos foram processadas para imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH). Anticorpos primários contra TH (1µl/100µl: Chemicon Lab: feito em camundongo: catalogo no. MAB318) foram diluídos em PBS (0,01M/l) e aplicados diretamente sobre os cortes (~150µl/lâminas), que foram recobertos com lamínulas. O período de incubação foi de 12 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Após a remoção das lamínulas procedeu-se 3 lavagens de 10 minutos em PBS, os cortes foram incubados por 2 horas em PBS contendo anticorpo secundário fluorescente (1µl/100µl; Jackson Immuno Research Laboratories; FITC conjugated affinipure goat antimouse IgG, Catálogo Numero 115-095-003) a temperatura ambiente em câmara úmida. Após 3 novas lavagens, as lâminas foram montadas com Vecta Shield (Vector Labs, Burlingame, CA) e analisadas em microscópio Nikon Eclipse E 1000, com aumento de 400X. Os controles negativos dos experimentos consistiram na omissão de anticorpos primários; nenhuma marcação foi observada nestes casos.

As imagens, das arteríolas, capturadas no microscópio foram analisadas no programa ImagJ para quantificação da imunorreatividade. Nestas mesmas imagens, procedeu-se à análise morfométrica das arteríolas, através do programa IMAGE-Pro Plus.

3.9 Quantificação da Imunorreatividade

As imagens capturadas das arteríolas (aumento de 400x), foram armazenadas em computador e a imunorreatividade quantificada pelo programa ImagJ.

Foram analisadas entre 3 a 5 arteríolas/tecido. Para cada imagem foram selecionadas visualmente três áreas ($25 \mu\text{m}^2$) de maior fluorescência (brilho), e, a imunorreatividade/janela foi quantificada pelo programa ImagJ, conforme exemplificado na Figura 1. Dos valores obtidos foi subtraído um valor de background que era mensurado em área equivalente ($25 \mu\text{m}^2$) sempre na luz das arteríolas. As quantificações da imunorreatividade foram feitas em lâminas codificadas, que omitiam a identificação dos grupos.

Figura 1. Fotomicrografia de corte transversal de arteríola imunorreativa para TH no músculo sóleo ilustrando a janela de quantificação (5x5 μm). No esquema inferior é mostrada uma ampliação da janela, evidenciando a elevada fluorescência na borda adventícia-medial do vaso.

3.10 Quantificação da razão parede/luz

As mesmas imagens, capturadas on-line no computador, utilizadas na análise de imuhistoquímica foram também submetidas à análise morfométrica para identificação das características estruturais das arteríolas. As arteríolas (aumento de 400x) foram quantificadas pelo programa IMAGE-Pro-Plus. Determinou-se automaticamente os diâmetros externo (DE) e interno (DI), através dos quais se calculou os raios correspondentes e a espessura de parede (espessura da parede (δ) = raio externo-raio interno). A partir destes valores e sabendo-se o diâmetro interno do vaso (luz do vaso), foi possível calcular-se a razão parede/ luz, conforme a formula: Razão parede/ luz = δ / DI.

3.11 Análise Estatística

Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM e comparados pelo teste t de student e pelo test t pareado, conforme apropriado. A evolução do peso corporal e do desempenho em esteira durante os protocolos experimentais foi analisada pela ANOVA para medidas repetidas. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução do peso corporal e do desempenho em esteira durante os protocolos experimentais

A Figura 2 mostra a evolução do peso corporal dos ratos SHRt e SHRs durante os protocolos experimentais. Houve aumento ponderal durante os protocolos de treinamento e sedentarismo, mas ambos os grupos apresentaram pesos equivalentes desde o início até o final dos protocolos. O ganho ponderal (Figura 3) dos grupos SHRt e SHRs durante o período de 13 semanas foi de $+95 \pm 2$ e $+97 \pm 6$ gramas respectivamente. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Figura 2. Evolução do peso corporal (gramas) durante as treze semanas dos protocolos experimentais nos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM.

Figura 3. Ganho ponderal (gramas) após as treze semanas dos protocolos experimentais nos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10). Média $\pm$ EPM, significância ($p<0,05$) + diferente de zero (test t pareado).

A Figura 4 ilustra que ao início dos protocolos (treinamento ou sedentarismo) os dois grupos SHRs e SHRt apresentavam capacidade física idêntica ($1,26\pm0,06$ Km/h). Com a evolução dos protocolos o grupo treinado obteve um melhor desempenho nos testes máximos, havendo aumento significativo da velocidade máxima alcançada na 6^a e 13^a semanas ($1,65\pm0,05$ e $1,86\pm0,10$ Km/h, respectivamente $p<0,05$) vs respectivos controles. O ganho, que já era evidente na 6^a semana foi ainda maior na 13^a semana de treinamento. Por outro lado o sedentarismo provocou ligeira redução da capacidade física nos animais do grupo SHRs ($1,02\pm0,05$ e $1,05\pm0,05$ Km/h na 6^a e 13^a semanas) respectivamente. O treinamento aeróbio de baixa intensidade (50-60% do teste máximo por três meses) foi, portanto efetivo em aumentar em 77% a capacidade física do grupo SHRt vs SHRs.

Na Figura 5 comparamos as alterações no desempenho dos grupos SHRs e SHRt durante os três meses. Ao final dos protocolos o ganho de capacidade física (diferença entre a 13^a e a semana zero) foi positivo e intenso no grupo SHRt, mas negativo no grupo SHRs ($+0,60 \pm 0,13$ vs $-0,21 \pm 0,08$ Km/h respectivamente, $p < 0,05$).

Figura 4. Evolução da capacidade física durante as treze semanas de treinamento ou sedentarismo nos grupos SHRs (n=10) e SHRt (n=10) . Média $\pm$ EPM; significâncias ($p < 0,05$) + diferente de zero (t pareado); * vs S ANOVA para medidas repetidas .

Figura 5. Comparação da eficácia do treinamento ou sedentarismo sobre alterações de capacidade física dos ratos SHRs (n=10) e SHRt (n=10) . Média $\pm$ EPM; significâncias ($p < 0,05$) + diferente de zero (t pareado); * vs S (t student).

4.2 Valores basais de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Ao término dos protocolos experimentais procedeu-se ao registro de parâmetros hemodinâmicos em ambos os grupos na situação de repouso. Os valores médios de pressão arterial (sistólica, diastólica e média) da pressão de pulso e da frequência cardíaca são apresentados na Tabela 2. Observa-se que o treinamento físico determinou redução dos níveis pressóricos, com diferenças significativas na pressão diastólica e média (-6,5% e -5,9% respectivamente, $p < 0,05$, Tabela 2, Figura 6) mas sem significância na pressão sistólica que apresentou queda de apenas 1,6% após treinamento físico (Tabela 2, Figura 6). Houve também importante redução da frequência cardíaca basal (de 340 ± 13 para 319 ± 7 bpm, correspondendo à queda de 6,2%, $p < 0,05$, Tabela 2, Figura 6) que foi acompanhada por elevação não significativa da pressão de pulso (de 70 ± 4 para 74 ± 3 mmHg, Figura 6).

Tabela 2. Apresenta valores absolutos de pressão sistólica, pressão diastólica, pressão arterial média, pressão de pulso e frequência cardíaca, em hipertensos sedentários (SHRs) e treinados (SHRt).

Valores Basais	SHRs (n=10)	SHRt (n=10)
Pressão Sistólica mmHg	225 ± 5	219 ± 3
Pressão Diastólica mmHg	155 ± 2	145 ± 4 *
Pressão Média mmHg	188 ± 2	177 ± 3 *
Pressão de Pulso mmHg	70 ± 4	74 ± 3
Frequência Cardíaca bpm	340 ± 13	319 ± 7 *

Valores são média $\pm$ EPM. Significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Figura 6. Efeitos do treinamento físico sobre a pressão sistólica (A); pressão diastólica (B); pressão arterial média (C); pressão de pulso (D) e frequência cardíaca (E) de SHR. S= sedentário; T= treinado. Sig nificâncias $p < 0,05$ * vs S (t student).

4.3 Efeitos do treinamento físico sobre a imunorreatividade para TH em arteríolas musculares esqueléticas e renais

Os efeitos do treinamento físico sobre a síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático foram avaliados nas terminações nervosas de arteríolas (3-5 arteríolas/rato com diâmetro interno entre 10-40 μm) do território muscular esquelético (músculos locomotores como o sóleo, gastrocnêmio vermelho e grácil e não locomotores como o temporal) e renais. Os valores absolutos da imunorreatividade para TH (enzima chave na síntese de noradrenalina) são apresentados na Tabela 3 e Figuras 7 a 11.

4.3.1 Músculo Sóleo

Conforme observado na Figura 7 a imunorreatividade para TH foi bastante evidente na borda média-adventicial das arteríolas do músculo sóleo. A comparação entre arteríolas de mesma ordem nos ratos treinados e sedentários mostrou aumento marcante da imunorreatividade para TH nos animais treinados. Dados quantitativos (5 ratos/grupo) indicaram que o treinamento físico de baixa intensidade nos SHR foi acompanhado de aumento significativo (+55% $p < 0,05$, Figura 7 e Tabela 3) da imunorreatividade para TH em arteríolas do músculo sóleo.

4.3.2 Músculo Gastrocnêmio Vermelho

Também para as arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho (de 10-40 μm de diâmetro interno), observou-se intensa marcação da imunorreatividade para TH na borda média-adventicial, que foi de menor intensidade nos SHRs, mas bastante densa nos SHRt (Figura 8 e Tabela 3). Dados quantitativos (4 ratos/grupo) indicaram que o

treinamento físico de baixa intensidade nos SHR foi acompanhado de aumento significativo da imunorreatividade para TH em arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho (+56%, $p>0,05$, Figura 8, Tabela 3).

4.3.3 Músculo Grácil

Características similares às dos músculos sóleo e gastrocnêmio vermelho foram também observadas nas arteríolas do músculo grácil, ou seja, marcação proeminente na borda média-adventicial, onde se localizam as terminações nervosas simpáticas, com aumento expressivo desta imunorreatividade nos SHRt (Figura 9 e Tabela 3). Dados quantitativos (4 ratos/grupo), indicaram que o treinamento físico nos SHR foi acompanhado de aumento marcante da imunorreatividade para TH em arteríolas do músculo grácil (+63% , $p<0,05$, Figura 9, Tabela 3).

4.3.4 Músculo Temporal

A Figura 10 ilustra a aparência histológica de arteríolas (10-40 μ m de diâmetro interno) de músculo esquelético não locomotor. A imunorreatividade para TH também se distribui preferencialmente na borda médio-adventicial, mas contrariamente ao observado para os músculos locomotores, o aumento da imunorreatividade no animal treinado parece não ser tão evidente. Realmente dados quantitativos (4 ratos/grupo) mostraram que o treinamento físico de baixa intensidade nos SHR foi acompanhado pequeno aumento da imunorreatividade para TH em arteríolas do músculo temporal que, no entanto não atingiu níveis de significância (de 65 ± 7 para 81 ± 12 UA, correspondendo a uma variação de +25%, $p>0,05$, Figura 10, Tabela 3).

4.3.5 Rim

Para efeito de comparação, as respostas de arteríolas musculares ao treinamento físico foram confrontadas com as respostas de arteríolas de um outro território, o renal, que responde de forma oposta ao exercício dinâmico (vasoconstrição vs vasodilatação nas arteríolas musculares esqueléticas). Deve-se ressaltar que as arteríolas renais encontradas eram maiores que as observadas no território muscular esquelético, de forma que as quantificações foram realizadas em arteríolas de 20 a 60 μm de diâmetro interno. A Figura 11 ilustra a aparência histológica de arteríolas renais de SHR sedentário e treinado, sugerindo que o treinamento físico não altera de forma importante a imunorreatividade para TH na borda média-adventicial. Dados quantitativos (4 ratos/grupo, Figura 11, Tabela 3) mostram uma redução não significativa da imunorreatividade nos hipertensos treinados (-10%, $p>0,05$), confirmando a inalteração da síntese/armazenamento do transmissor simpático pelo treinamento físico em arteríolas do córtex renal.

Tabela 3. Valores de imunorreatividade para tirosina hidroxilase (em unidades arbitrárias) obtidas em cortes transversais de arteríolas de músculos sóleo, grácil, gastrocnêmio vermelho, temporal e dos rins nos grupos SHRs e SHR t.

Arteríolas	SHRs	SHRt
Músculo Sóleo	60 $\pm$ 7	93 $\pm$ 9 *
Músculo Gastrocnêmio	51 $\pm$ 5	78 $\pm$ 4 *
Músculo Grácil	56 $\pm$ 9	90 $\pm$ 9 *
Músculo Temporal	65 $\pm$ 7	82 $\pm$ 12
Rim	74 $\pm$ 5	67 $\pm$ 2

Valores são média $\pm$ EPM, n=4-5 ratos/grupo (correspondendo a 3-5 arteríolas/rato). Significância ($p<0,05$) * vs S (t student).

Músculo Sóleo

Figura 7. Paineis superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo sóleo em SHRs e SHRt. Paineis inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (5 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Músculo Gastrocnêmio Vermelho

Figura 8. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Músculo Grácil

Figura 9. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo grácil em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Músculo Temporal

Figura 10. Painei superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo temporal em SHRs e SHRt. Painei inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Figura 11. Painel superior: fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do rim em SHRs e SHRt. Painel inferior: comparação da imunorreatividade para tirosina hidroxilase nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM; significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

4.4 Efeitos do treinamento físico sobre a estrutura de arteríolas musculares esqueléticas e renais.

Com a finalidade de se avaliar se alterações da imunorreatividade para TH após o treinamento físico eram ou não acompanhadas de alterações estruturais, bem como comparar estas respostas, a observações anteriores do laboratório, relativos aos efeitos do treinamento sobre a estrutura arteriolar foi também quantificada a geometria das mesmas arteríolas em que se analisou a imunorreatividade para TH. Os dados relativos as arteríolas dos diferentes territórios analisados são apresentados na Tabela 4 e Figuras 12 e 13.

Conforme observado na Tabela 4 as arteríolas musculares esqueléticas tinham todas um tamanho médio de 20 a 30 μm de diâmetro interno (correspondendo a arteríolas na faixa de 10 a 40 μm), enquanto as renais tinham tamanho médio de aproximadamente 40 a 50 μm , correspondendo portanto a arteríolas ligeiramente maiores.

Nas arteríolas do músculo grácil, o treinamento físico determinou reduções significativas dos diâmetros interno e externo (Tabela 4), com alterações de menor magnitude ($p > 0,05$) nos demais vasos musculares, as quais determinaram reduções significativas da espessura das arteríolas musculares esqueléticas locomotores ou não locomotores (Tabela 4). Estes ajustes vasculares causaram reduções importantes da razão parede/luz de arteríolas dos músculos locomotores (-43%, -33% e -38% para o sóleo, gastrocnêmio e grácil, respectivamente, $p < 0,05$, Tabela 4 e Figura 12), com redução de 18% da razão parede/luz nas arteríolas do músculo temporal, a qual no entanto não atingiu níveis de significância ($p > 0,05$, Tabela 4 e Figura 12).

Por outro lado o treinamento físico não modificou a estrutura vascular de arteríolas renais: as pequenas alterações de diâmetro interno e externo não se refletiram na espessura vascular de forma que a razão parede/luz das arteríolas renais foi similar entre os grupos SHRs e SHRt (Tabela 4 e Figura 13). Deve-se ressaltar que estes valores foram obtidos em arteríolas de maior magnitude (na faixa de 20 a 60 μm de diâmetro interno) de forma que a razão parede/luz média das arteríolas renais foi menor que a quantificada nas arteríolas musculares esqueléticas.

Tabela 4. Efeito do exercício físico sobre a estrutura de arteríolas da musculatura esquelética e renal em animais hipertensos sedentários (SHRs) e treinados (SHRt).

	DI (μm)	DE (μm)	δ (μm)	Razão p/l
Sóleo				
SHR s	23,47 $\pm$ 2,67	41,55 $\pm$ 3,19	9,04 $\pm$ 0,49	0,47 $\pm$ 0,05
SHR t	28,16 $\pm$ 2,14	42,55 $\pm$ 2,14	7,19 $\pm$ 0,32*	0,27 $\pm$ 0,02*
Gastrocnêmio				
SHR s	22,24 $\pm$ 2,94	39,28 $\pm$ 3,41	8,52 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,06
SHR t	21,46 $\pm$ 1,21	34,52 $\pm$ 1,87	6,53 $\pm$ 0,42*	0,31 $\pm$ 0,01*
Grácil				
SHRs	28,15 $\pm$ 2,20	53,81 $\pm$ 2,34	11,33 $\pm$ 8,94	0,42 $\pm$ 0,07
SHRt	20,88 $\pm$ 1,9*	31,29 $\pm$ 1,56*	5,20 $\pm$ 7,68*	0,26 $\pm$ 0,05*
Temporal				
SHR S	23,31 $\pm$ 1,92	38,02 $\pm$ 2,49	7,30 $\pm$ 0,54	0,34 $\pm$ 0,03
SHR T	24,54 $\pm$ 2,46	36,35 $\pm$ 2,19	5,91 $\pm$ 0,48*	0,28 $\pm$ 0,04
Rim				
SHRs	40,62 $\pm$ 6,7	58,63 $\pm$ 8,6	9,00 $\pm$ 1,2	0,25 $\pm$ 0,04
SHRt	52,13 $\pm$ 8,7	70,78 $\pm$ 9,3	9,17 $\pm$ 7,2	0,22 $\pm$ 0,04

Valores são média $\pm$ EPM. Significância ($p < 0,05$) * vs S (test t).

DI: diâmetro interno; DE: diâmetro externo; Razão p/l: razão parede/luz; δ : espessura da parede, para as mesmas arteríolas avaliadas na Tabela 3

Figura 12. Comparação da razão parede/luz de arteríolas do músculo sóleo (A); gastrocnêmio vermelho (B); grácil (C); temporal (D); de ratos SHRs e SHRt (4 a 5 ratos/grupo). Valores são média $\pm$ EPM, significância ($p < 0,05$) * vs S (t student).

Figura 13. Comparação da razão parede/luz de arteríolas renais nos grupos SHRs e SHRt (4 ratos/grupo). Valores são médias $\pm$ EPM.

4.5 Efeitos do treinamento físico sobre a expressão protéica de tirosina hidroxilase

Uma outra proposição deste trabalho era quantificar pela técnica de Western Blot, a expressão protéica da tirosina hidroxilase nos mesmos tecidos (músculos esqueléticos e rim) em que se quantificou a imunorreatividade presente nos terminais nervosos das arteríolas, além da medula supra-renal (indicativo da síntese/liberação de catecolaminas plasmáticas). No entanto nos músculos sóleo, temporal e gastrocnêmio vermelho bem como nas artérias femoral e renal, não foi detectada a expressão da proteína TH (valores abaixo dos níveis de detecção). Acreditamos que concentração da enzima TH é muito pequena em relação ao conteúdo protéico total destes tecidos, de forma que a técnica de Western Blot não foi eficaz em detectar possíveis alterações da TH induzidas pelo treinamento nos músculos esqueléticos e em artérias regionais. Por outro lado a densidade do sinal foi muito boa para medula

adrenal. A Figura 14 mostra a quantificação da proteína TH expressa nas supra-renais dos ratos SHRt e SHRs. Observa-se que ao contrário da imunorreatividade para TH em terminais nervosos, o treinamento físico não alterou a expressão da TH nas supra-renais do grupo treinado quando comparado ao seu controle sedentário (6852 ± 861 e 8100 ± 767 UA, respectivamente $p > 0,05$).

Figura 14. Comparação da expressão protéica da TH nas supra-renais de SHRs (n=4) e SHRt (n=4). No alto, bandas representativas dos 2 grupos, que foram quantificadas por densitometria. Média $\pm$ EPM.

5. DISCUSSÃO

Nossos dados confirmaram a eficácia do treinamento físico de baixa intensidade em determinar bradicardia de repouso e em reduzir parcialmente as pressões diastólica e média dos hipertensos, indicando ser esta queda, acompanhada de marcante alteração na geometria de arteríolas musculares esqueléticas (redução da espessura e da razão parede/luz), mas inalteração da estrutura das arteríolas renais. Os resultados do presente trabalho foram ainda originais ao sugerir que, frente à redução da resistência vascular da musculatura esquelética, há após treinamento físico, aumento significativo da imunorreatividade para TH em arteríolas de músculos locomotores (com tendência a aumento nos não locomotores), indicativo da maior síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático nos terminais nervosos. Além disto nossos resultados demonstraram ser este efeito específico para inervação muscular esquelética (nenhuma alteração foi detectada nos rins) e não envolver a síntese de catecolaminas plasmáticas pela medula adrenal.

Uma característica marcante do treinamento físico é a indução da bradicardia de repouso em animais de experimentação (CLAUSEN, 1977; MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005). 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 E TIPTON, 1977; MEREDITH et al., 1990; FORJAZ et al., 1996; VERAS-SILVA et al., 1997; AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003). Os resultados do presente trabalho mostrando a bradicardia de repouso no

grupo SHRt (redução de ~10% vs SHRs) confirmaram observações anteriores e juntamente com o ganho observado na capacidade aeróbia dos SHRt, confirmaram a eficácia dos protocolos de treinamento físico utilizado.

Ao compararmos os dados de capacidade aeróbia dos SHRs e SHRt, no início meio e fim dos protocolos experimentais, à capacidade física de animais normotensos sedentários e treinados obtidos por nosso grupo de pesquisa (AMARAL et al., 2000, 2001; MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005) observamos que os SHR tem desempenho superior ao dos normotensos durante todo período experimental, mas o ganho induzido pelo treinamento foi similar ao dos normotensos. Vários estudos comportamentais na literatura têm demonstrado que os SHR diferem dos controles normotensos no que se refere à ansiedade (KULIKOV et al, 1997), à locomoção e à fuga a estímulos aversivos (RAMOS et al., 1997), sugerindo que os SHR constituam uma linhagem com elevada ansiedade e atividade locomotora, os quais justificariam seu melhor desempenho em esteira. Por outro lado os SHR sedentários, de forma oposta ao observado para os normotensos sedentários (MELO et al., 2003; MARTINS et al., 2005), apresentaram pequeno prejuízo em esteira ao longo do período de sedentarismo. Observações semelhantes foram também relatadas recentemente (HIGA-TANAGUCHI et al 2007; FELIX e MICHELINI, 2007). Desta forma ao final dos protocolos, quando a hemodinâmica e a síntese/armazenamento de noradrenalina foram comparadas, havia uma marcante diferença da capacidade aeróbia entre os SHRs e SHRt.

Nossos resultados também mostraram redução parcial mas significativa das pressões diastólica e média, com tendência à redução da pressão sistólica nos SHR treinados. Os efeitos do treinamento físico em reduzir parcialmente a sobrecarga

pressórica de hipertensos, reduzindo a morbi mortalidade são conhecidos de longa data (ARAKAWA, 1993; LIMA et al., 1993; PAFFENBARGER et al., 1993; GAVA et al., 1995; VÉRAS-SILVA et al., 1997; ZANETTINI et al., 1995; MOTOYAMA et al., 1998; MANCIA et al., 1998; AMARAL et al., 2000 e 2001; MELO et al., 2003; CHOBANIAN et al., 2003). Realmente a prática regular de exercícios físicos, tem sido recomendada como monoterapia em hipertensos leves ou limítrofes, e como, terapia coadjuvante a tratamentos farmacológicos na hipertensão já estabelecida, pois além da redução dos níveis pressóricos, a prática regular de exercícios físicos aeróbicos, produz efeitos benéficos adicionais como, a diminuição de peso, o controle do estresse e a diminuição da resistência à insulina (PAFFENBARGER et al., 1993; CHOBANIAN et al., 2003; CORNELISSEN e FAGARD, 2005).

Os resultados do presente trabalho mostrando queda significativa da pressão diastólica (que reflete a resistência vascular periférica) e queda de menor magnitude não significativa da pressão sistólica (que reflete preferencialmente o trabalho cardíaco) reforçam a potencialidade do treinamento físico em corrigir parcialmente o aumento da resistência vascular. Como a hipertensão arterial resulta essencialmente de hipertrofia, hiperplasia e/ou remodelamento de arteríolas, que reduzem a luz vascular promovendo aumento da resistência vascular local, muitos trabalhos da literatura valorizam a redução da pressão arterial diastólica, a qual representa um bom índice da resistência vascular periférica (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006 ; CHOBANIAN et al., 2003).

Nossos resultados mostraram ainda que a redução parcial da pressão arterial diastólica foi acompanhada da redução da espessura da parede vascular (~30% em média) e da razão parede/luz (~40%) de arteríolas musculares esqueléticas, sem

alteração da espessura e razão parede/luz de arteríolas renais. Estes ajustes estruturais induzidos pelo treinamento físico, reduzindo a resistência muscular esquelética, mas não alterando a resistência renal (e possivelmente não alterando a esplâncnica, que juntas representam aproximadamente 50% do débito cardíaco basal) devem condicionar a queda parcial (devida ao território muscular esquelético), mas não a normalização da pressão (atribuída aos rins/esplâncnico) após o treinamento. Trabalhos pioneiros de nosso laboratório utilizando animais SHRs e SHRt e seus respectivos controles normotensos, realmente, demonstraram que o treinamento físico não só reduziu, como normalizou a razão parede/luz de arteríolas de músculos esqueléticos locomotores de SHRt (após o treinamento a razão parede/luz dos SHR não diferia da observada nos normotensos para arteríolas da mesma ordem AMARAL et al., 2000, 2001; FRANÇA et al., 2001; MELO et al., 2003). Além disto Amaral et al. (2000) mostraram que a redução da razão parede/luz nos SHRt correlacionava-se positivamente com a redução da resistência vascular da artéria ilíaca (que irriga o território muscular esquelético do trem posterior) e com a queda observada da pressão arterial.

No presente trabalho não avaliamos a razão parede/luz de normotensos sedentários e treinados, mas é provável que efeitos semelhantes aos descritos por Amaral et al. (2000) e Melo et al. (2003) tenham ocorrido com as arteríolas dos SHRt, condicionando a redução da pressão observada. Da mesma forma o fato da pressão arterial não ter se normalizado deve-se provavelmente à falta de remodelamento das arteríolas renais (e possivelmente outros territórios que respondem ao exercício com inalteração ou redução de fluxo) que mantiveram a resistência periférica total ainda parcialmente elevada.

Uma observação provocativa do presente trabalho foi a de que o treinamento físico foi acompanhado por aumento marcante (aproximadamente +58% em média nos músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho e grácil) da imunorreatividade para TH nas arteríolas dos músculos locomotores, por tendência a aumento nos não locomotores (+25% em média) e por uma oscilação oposta nas arteríolas renais, sugerindo aumento específico da atividade simpática muscular esquelética nos SHRt.

Poucos relatos há na literatura relativos aos efeitos do treinamento físico sobre a atividade para a musculatura periférica e as observações obtidas com diferentes técnicas em diferentes modelos animais e no homem (normotenso e hipertenso) são controversias. Grassi et al. (1994) relataram redução da atividade simpática do nervo fibular em normotensos treinados, enquanto que Laterza et al. (2007) usando o mesmo nervo e a mesma técnica não observaram alteração da atividade simpática em normotensos, mas apenas em hipertensos. Revendo os efeitos do treinamento sobre a musculatura esquelética, Ray e Hume (1998) também concluíram pela ausência de efeito sobre a atividade simpática basal. Por outro lado Chen e Di Carlo (1996) estudando o efeito da locomoção espontânea diária sobre a regulação barorreflexa da atividade simpática lombar descreveram atenuação da resposta simpática estimulada.

Nossos dados usando uma técnica que infere a atividade simpática através da expressão de TH, responsável pela síntese de noradrenalina no terminal nervoso, não reproduziram estes achados. Com certeza outros estudos sistematizando os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática basal e/ou estimulada, nos diferentes leitos vasculares são necessários para um melhor entendimento do tônus/atividade simpática periférica. No entanto apesar de inesperado o aumento da TH na parede vascular de arteríolas em tecidos locomotores, pode tratar-se de um ajuste funcional.

Comparando-se estes resultados com outros de nosso laboratório sobre a imunorreatividade em animais normotensos (Burgi e Michellini, comunicação pessoal, vide Figura 15) observa-se que a imunorreatividade para TH de arteríolas musculares esqueléticas dos SHRs é muito semelhante à densidade apresentada pelos normotensos sedentários, encontrando-se muito aumentada apenas no território renal, o que é sugestivo da maior participação deste na gênese da hipertensão espontânea. Nos rins dos SHR, submetidos a elevado “drive” simpático, o treinamento físico não determinou aumento da imunorreatividade para TH, mas sim uma tendência à queda, enquanto que nos músculos esqueléticos, de certa forma “poupados” da elevada atividade simpática, o treinamento físico causou aumento adicional da imunorreatividade para TH (Figura 15). Este ajuste funcional sugere que o treinamento físico induz, nos SHR maior atividade simpática para vasos musculares esqueléticos. Esta resposta não é tão absurda quanto possa parecer considerando-se que o treinamento físico ao reduzir a razão parede/luz (fator estrutural), reduz de forma importante à resistência local favorecendo o aporte sangüíneo ao músculo em questão, mesmo na situação de repouso. A constância do fluxo sangüíneo local (que é uma das variáveis melhores controladas no sistema cardiovascular) na situação basal seria conseguida por vasoconstrição ativa (fator funcional), muito provavelmente mediada pelo simpático.

Figura 15. Comparação da imunorreatividade para TH em arteríolas de diferentes tecidos dos SHR sedentários e treinados (dados do presente trabalho) e normotensos sedentários (WKYs, Burgi e Michelini, comunicação pessoal). Significância ($p < 0,05$) * vs S; # vs SHRs (t student).

Em concordância com esta proposição, França (2001) demonstrou através de experimentos *in situ* (microscopia intravital), que o treinamento físico potencializava nos SHR a vasoconstrição de arteríolas musculares esqueléticas à aplicação tópica de noradrenalina. Além disto, em SHRt 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 SHRt vs SHRs.

O aumento da atividade simpática para musculatura esquelética, deve portanto tratar-se, de um ajuste funcional para regular o fluxo sanguíneo regional em repouso. Além disto, Buckwalker et al. (1997) demonstraram importante aumento da atividade simpática para a musculatura esquelética durante exercício dinâmico, maior em exercício de baixa intensidade e que se reduzia em exercício mais intenso. Trata-se de outra resposta compensatória para contrabalançar a hiperemia do exercício.

Sabe-se, que durante o exercício dinâmico há aumento de tensão de cisalhamento, acompanhada de liberação de metabólitos vasoativos e/ou substâncias parácrinas nos tecidos em atividade (óxido nítrico, prostaglandinas, EDHF, bradicinina, adenosina, redução da disponibilidade de O₂ e aumento do CO₂ com queda de pH local), que determinam intensa vasodilatação arteriolar (SUN et al., 1994; O'LEARY et al., 1994; LAUGHLIN., 1995; KOLLER et al., 1995; LASH & BOHLEN, 1997; COSTA et al., 2000). Em conjunto estas observações são consistentes com idéia de que o fluxo sanguíneo muscular durante o exercício é determinado através de “balanço” entre os fatores metabólicos locais (vasodilatadores) e neurais (vasoconstritores) (CHRISTENSEN e GALBO, 1983). Realmente Amaral et al. (2001) comparando as respostas de pressão arterial e fluxo muscular esquelético durante exercício em SHR com e sem bloqueio simpático (associado também a bloqueio de outros fatores locais), mostraram haver queda da pressão arterial apenas durante bloqueio, sugerindo a importância do simpático vascular (e de outros vasoconstritores locais) em regular o fluxo sanguíneo local durante exercício dinâmico. Estes dados são concordantes com

os achados do presente trabalho e, em conjunto, sugerem compensação funcional (atividade simpática) à alteração estrutural (redução da razão parede/luz) induzida pelo treinamento com a finalidade de manter a constância do fluxo sanguíneo basal à musculatura esquelética.

Outra observação interessante deste trabalho foi que o aumento da atividade simpática foi tecido-específico, pois não se observou alteração na imunorreatividade nas arteríolas renais após treinamento físico de baixa intensidade. Realmente McALLEN e MAY (1994), CAMPOS e McALLEN (1997) e MORRISON (2001) descreveram que os neurônios simpáticos pré-motores têm representação topográfica com distribuição tecido-específico e não região-específica, sugerindo que inervação do tecido muscular esquelético seja feita por grupamento neuronal distinto daquele que inerva os rins, por exemplo. Além disto à proposição da organização do simpático em “vias” específicas ao diferentes tecidos, as quais podem ser ativadas ou inibidas em diferentes combinações (MORRISON, 2001), dá suporte anátomo funcional a nossa observação do aumento da imunorreatividade para TH no tecido muscular esquelético, sem alteração significativa no tecido renal.

Neste sentido é interessante notar-se que o músculo temporal (não locomotor) mostrava, após treinamento físico, aumento não significativo da imunorreatividade para TH. Considerando-se que a inervação simpática é tecido específica (CAMPOS e MCALLEN, 1997; MCALLEN e MAY, 1994; MORRISON, 2001), esperar-se-ia uma resposta significativa. No entanto, o aumento parcial da imunorreatividade para TH e a redução parcial da razão parede/luz (não significativos) sugerem que os ajustes ao treinamento físico dependeriam do “drive” simpático, mas seriam modulados por fatores locais (autócrinos/parácrinos) liberados apenas nos tecidos locomotores que respondem ao

exercício com vasodilatação. A identidade destes fatores bem como sua interação com a atividade simpática permanece por ser estabelecida.

Outra observação original deste trabalho foi de que o treinamento físico não causou quaisquer efeitos na síntese/armazenamento de catecolaminas adrenais e portanto nos níveis plasmáticos (resposta hormonal) sugerindo que o efeito é essencialmente neural.

É importante que se ressalte que as presentes observações foram possíveis pela associação das técnicas de imunorreatividade para TH e análise de imagem (ZHOU et al., 2004; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007), que permitiram a “quantificação” simultânea de índices de atividade simpática em diferentes territórios (e na medula adrenal). Deve-se no entanto ter presente que como várias outras técnicas para quantificação da atividade simpática, tratam-se de valores relativos e não de medidas absolutas do tônus simpático basal nos hipertensos sedentários e treinados.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que o treinamento físico em SHR modula especificamente a resposta neural, sem alteração das catecolaminas adrenais (resposta hormonal). O treinamento físico de baixa intensidade não foi eficaz em aumentar a síntese/armazenamento da TH nas arteríolas renais, mas a aumentou especificamente nas arteríolas musculares esqueléticas, o que possivelmente reflete um mecanismo compensatório à redução da razão parede/luz nos SHR treinados, visando à constância do fluxo sanguíneo local, que é uma das variáveis melhores controladas no sistema cardiovascular. Além disto, a falta de alteração significativa de TH nos músculos não locomotores sugere que a resposta simpática neural possa ser modulada por fatores locais. A identidade destes fatores bem como sua interação com a atividade simpática permanece por ser estabelecida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F.A.; SHANNON, D.C.; BERGER, A.C.; COHEN, R.J. 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. Hypertens.**, 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. **J. Hypertens**, v.18, p.1563-1572, 2000.

ARAKAWA, K. Antihypertensive mechanism of exercise. **J Hypertens**, 11:223-229, 1993.

BARBEIRO, H.V.; CARVALHO, M.H.C.; MICHELINI, L.C.; NIGRO, L.C.; OLIVEIRA, L.A.; SCIVOLETO, R.; FORTES, Z.B. Treinamento físico e reatividade vascular em SHR in: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental,11; Caxambú,. Anais p.156, 21 - 24 de agosto, 1996.

BAUMBACH, G.L. & HEISTAD, D.D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. **Hypertension**, 13: 968 - 972, 1989.

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

BEVAN, J.A., BEVAN R.D e DUCKLES, S.P. Adrenergic regulation of vascular smooth muscle. In: Bohr, D.F., Somlyo, A.P., Sparks Jr. H.V.(eds). **Handbook of Physiology**, section 2: *The cardiovascular system*, vol.II: *Vascular Smooth Muscle*, Williams e Wilkins, Baltimore, pp.515-566, 1980.

BOHLEN, H.G. Arteriolar constriction mediated by hyperresponsiveness to norepinephrine in hypertensive rats. **Am J Physiol**, 236:H.157-H.164, 1979.

BOHLEN, H.G. The microcirculation in hypertension. **J Hypertens**, 7 (suppl 4): S117-S124, 1989.

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

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

CAMPOS, R.R e McALLEN, R.M.;. Cardiac sympathetic premotor neurons. **Am. J. Physiol.** V.272, p. 615-620, 1997.

CARRETERO, O.; OPARIL, S. Essential hypertension.: Definition and etiology. **Circulation**, v. 101, p. 329-335, Part 1, 2000.

CESTARI, 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**. Jul 23, 2007.

CHEN, C.Y.; DICARLO, S.E. Daily exercise and gender influence arterial baroreflex regulation of heart rate and nerve activity. **Am J Physiol.**;271(5 Pt 2):H1840-8, Nov 1996.

CHEN, I.I.H.; PREWITT, R.L.; DOWELL, R.F. Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat creamster muscle. **Am J Physiol**, 241 (Heart Circ Physiol. 10): H 306-H 310, 1981.

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.; Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**. Dec;42(6):1206-52. Epub 2003 Dec 1, 2003.

CHRISTENSEN N.J.; GALBO H. Sympathetic nervous activity during exercise. **Annu Rev Physiol.**;45:139-53. Review, 1983.

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

CLEROUX, J.; FEIDMAN, R.D.; PETREILA, R.J. Life style modifications to prevent and control hypertension. 4. Recommendations on physical exercise training. Canadian Hypertension Society, Canadian Coalition for High Blood Pressure Prevention and Control, Laboratory Centre for Disease Control at Health Canada, Heart and Stroke Foundation of Canada. CvlL4J4;160(9 Suppl):S21-8, 1999.

CORNELISSEN VA, FAGARD RH. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension*.;46(4):667-75. Epub 2005 Sep 12, Oct, 2005.

COSTA, F., HEUSINKVELD, J., BALLOG, R., DAVIS, S., BIAGGIONI, I., Estimation of skeletal muscle interstitial adenosine during forearm dynamic exercise in humans. **Hypertension**. May;35(5):1124-8, 2000.

CSIKY, B.; SIMON, G. Effect of neonatal sympathectomy on development of angiotensin II-induced hypertension. **Am. J. Physiol.**,v.2, p.648-656, 1997.

DAMON, D.H. Sympathetic innervation promotes vascular smooth muscle differentiation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 288, p. 2785-2791, 2005.
DAMON, D.H. VSM growth is stimulated in sympathetic neuron/VSM cocultures: role of TGF- β 2 and endothelin. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 278, p. 404-441, 2000.

DI CARLO S.E; BISHOP V.S. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. **Am. J. Physiol.**, n. 258 , p. 212-220, 1990.

DI CARLO, S.E.; BISHOP, V.S. Regional vascular resistance during exercise: role of cardiac afferents and exercise training. **Am. J. Physiol.**, n.258, p. 842-847, 1990.

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

DI CARLO, S.E.; ZHENG, H.; HEIDI, C.L.; RODENBAUGH, D.W.; PATEL, K.P. Daily exercise normalizes the number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of hypertensive rats. **Brain Res.**, v.955, p. 153- 160, 2002.

DIMITRIADOU, V.; AUBINEAU, P.; TAXI, J.; SEYLAZ, J. Ultrastructural changes in the cerebral artery wall induced by long-term sympathetic denervation. **Blood Vessels.**, v. 25, p.122-143, 1998.

DUFLOTH, D.L.; MORRIS, M.;MICHELINI, L.C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.273, p. R1271-R1282, 1997.

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

FOLKOW, B.; HALLBACK, M.; LUNDGREN, Y.; SILVERTSSON, R.; WEISS, L. Importance of adaptative changes in vascular desing for establishment of primary hypertension studied in man and spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, v.32, p.2-16, 1973.

FORZAS, C.L.M.; MION, FR.; NEGRÃO, C.E. Effect of aerobic training on casual and ambulatory blood pressure in hypertensives, **Circulation**, 94 1373, 1996.

FRANÇA, T.R. Efeitos do treinamento físico na reatividade vascular da musculatura esquelética de SHR: Análise das respostas funcionais e morfométricas. São Paulo; 2001. (Tese de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

FRANÇA, T.R.; FORTES, Z.B.; MICHELINI, L.C. Altered sensitivity to norepinephrine after training in SHR skeletal muscle arterioles. **Hypertension**, 37 991, 2001.

FRANCA, T.R.; MICHELINI, L. C. Alteracoes da reatividade do term posterior durante e apos exercicio dinamico: Efeitos da hipertensão e do treinamento físico. **J. Hipertens.**, v.37, p. 1009, 2001.

GAVA, N.S.; VÉRAS-SILVA, A.S.; NEGRÃO, C.E. AND KRIEGER, E.M. Low- intensity exercise training attenuates cardiac β -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 26 (part 2): 1129-1133, 1995.

GIBBONS, G.H. Mechanism of vascular remodeling in hypertension: role of autocrine - paracrine vasoactive factors. **Cur Opin Nephrol Hypertens**, 4: 189-196, 1995.

GOLDSTEIN, D.S. Plasma norepinephrine as an indicator of sympathetic neural activity in clinical cardiology. **Am. J. Cardiol.**, v.48, n.6, p.1147-54, 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.

GREENE, A.S.; TONELLATO, P.J.; ZHANG, Z.; LOMBARD, J.H.; COWLEY J.R.A.W. Effect of microvascular rarefaction on tissue delivery in hypertension. **Am J Physiol**, 262(Heart Circ Physiol 31): H1486- H1453, 1992.

GREENE, AS., TONELLATO, P.J, LUI, J, LOMBARD, J.H. COWLEY JR. AW. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. **Am J Physiol**, 256: H 126 - H 131, 1989.

GUYTON, A.C.; COLEMAN, T.G.; BOWER, J.D.; GRANGER, H.J. Circulatory control in hypertension. **Cir. Res.**, v.26 II.135-II.147, Suppl.2, 1970.

HANSEN-SMITH, F.; GREENE, A.S.; COWLEY J.R. A.W; LOMBARD, J.H. Structural changes during microvascular rarefaction in chronic hypertension. **Hypertension**, 15:922-928, 1990.

HARRAP, S.B. Causes and effects of high blood pressure: a longitudinal approach to genetic cosegregational analysis. **J Cardiovasc Pharmacol.**;12 Suppl 3:S99-109. Review, 1988.

HARTLEY, L.H.; MASON, J.W.; HOGAN, R.P. Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. **J. Appl. Physiol.**, v.3, p. 607-610, 1972.

HERNANDEZ, I.; GREENE, A.S. Hemodynamic and microcirculatory changes during development of renal hypertension. **Am J Physiol**, 268(Heart Circ Physiol, 37): H33 - H38, 1995.

HIGA TANIGUCHI, K.T, SILVA F.C, SILVA H.H, 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**, 292(4):R1717-27, 2007.

III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 1998.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006.

IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, n.9, p.1213-20, 1998.

IZZARD, A.S.; BUND, S.J.; HEAGERTY, A.M. Increased wall-lumen ratio of mesenteric vessels from the spontaneously hypertensive rats is not associated with increased contractility under isobaric conditions. **Hypertension**, 28: 604-608, 1996.

JUDY, W.V., WATANABE, AM., HENRY, D.P., BESCH JR, H.R., MURPHY, W.R. HOCKEL, G.M. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rat. **Circ. Res**, 38 (suppl.2):21-29, 1976.

JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRES, C.; CERUTTI, C.; SASSARD, J. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. **Am. J. Physiol.**, v.259, p.1337-42, 1990.

KACEM, K.; SEYLAZ, J.; ISSERTIAL, O.; AUBINEAU, P. Chemical sympathectomy favours vimentin expression in arterial smooth muscle cells of young rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 53, p. 57-68, 1995.

KAPLAN, N.M. Guidelines for the treatment of hypertension: An American view. **J Hypertens**, 13 (suppl 2): S113 - S117, 1995.

KAPLAN, N.M. Long-term effectiveness of nonpharmacological treatment of hypertension. **Hypertension**, v.18, p.153- I. 160, 1991.

KENNEY, M.J.; SEALS, D.R. Postexercise hypotension. **Hypertension**, v.22, p. 653-664, 1993.

KOLLER, A, HUANG, A, SUM, D.; KALEY, G. Exercise training augments flow - dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. **Circ Res**, 76: 544-550, 1995.

KRAMER, J.M.; BEATTY, J.A.; LITTLE, H.R.; PLOWEY, E.D.; WALDROP, T.G. Chronic exercise alters caudal hypothalamic regulation of the cardiovascular system and hypertensive rats. **Am.J.Physiol.Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.280, p. R 389-397, 2001.

KRIEGER, J.E.; DZAU, V.J. Molecular Biology of Hypertension. **Hypertension**, v.18, n. 3, p. 13-17, 1991.

KULIKOV, A., AGUERRE, S., BERTON, O., RAMOS, A., MORMEDE, P., CHAOULOFF, F., Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety. **J Pharmacol Exp Ther.** May; 281(2):775-84, 1997.

LASH, J.M. & BOHLEN, G., Time-and order-dependent changes in functional and NO-mediated dilation during exercise training. **J Appl Physiol.** Feb;82(2):460-8, 1997.

LATERZA, M.C.; DE MATOS, L.D.; TROMBETTA, I.C.; BRAGA, A.M.; ROVEDA, F.; ALVES, M.J.; KRIEGER, E.M.; NEGRAO, C.E.; RONDON, M.U. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Hypertension.** Jun; 49(6): 1298-306. Epub Apr 16, 2007.

LAUGHLIN, M.H., Endothelium-mediated control of coronary vascular tone after chronic exercise training. **Med Sci Sports Exerc.** Aug;27(8):1135-44. Review, 1995

LEBLANC, J.; BOULAY, M.; DULAC, S.; JOBIN, M.; LABRIE, A.; ROUSSEAN-MIGNERON, S. Metabolic and cardiovascular response to norepinephrine in trained and nontrained human subjects. **J. Appl. Physiol.**, v.42, p. 166-173, 1977.

LEVY, I.B.; AMBROSIO, B.; PRIES, R.A.; BOUNDIER, S., Microcirculation in hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 735-740, 2001.

LIMA, M.D.A.; GINOZA, M.; TAVARES, A. DUFLOTH, D.L.; RIBEIRO, A.B.; MICHELINI, L.C.; KOHLMANN JR, O. Methylprednisolone induced hypertension in rats: a role for diminished insulin sensitivity. **Hypertension**, 21:547, 1993.

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

LUND-JOHANSEN, P. Hemodynamics in essential hypertension. **Clin. Sci. Suppl.**, v.59, p. 343s-354s, 1980.

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.

MALTA, D.C.; CEZÁRIO, A.C.; MOURA, L.; NETO, O.L.M.; JUNIOR, J.B.S.; A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do sistema único de Saúde. **Epidemiologia e serviço de saúde**, 15(1): 47-65, 2006.

MANCI, G.; GRASSI, G. Efficacy of antihypertensive treatment: Which endpoints should be considered? **Nephrol Dial Transplant**.Nov;20(11):2301-3. Epub Sep 9,2005.

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

MARTI, B. Physical activity and blood pressure and epidemiological brief review of primary preventive effects of physical activities. **Schweiz-Rundsch Med Prax**, 81: 473-479, 1992.

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

McALLEN RM, MAY CN.. Differential drives from rostral ventrolateral medullary neurons to three identified sympathetic outflows. **Am J Physiol.**;267 (4 Pt 2):R935-44, Oct. 1994.

McCRIMMON, D.R.; CUNNINGHAM, D.A.; RECHNITZER, P.A. Effects of training on plasma catecholamine in post-myocardial infarction patients, **Med. Sci. Sports.**, v.8, p. 152-156, 1976.

MELIN, B.; ECLACHE, J.P.; GEELEN, G. Plasma avp, neurophysin, renin activity, and aldosterone during submaximal exercise performed until exhaustion in trained and untrained men. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 44: 141-151, 1980.

MELO, R.M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L.C. Training- induced, Pressure-Lowering Effect in SHR. **Hypertension**, v.42, p. 851-857,. Part 2, 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. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2001.

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

MORRISON S F. Differential control of sympathetic outflow. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. Sep;281(3):R683-98. Review, 2001.

MOTOYAMA M, SUNAMI Y, KINOSHITA F, KIYONAGA A, TANAKA H, SHINDO M, IRIE T, URATA H, SASAKI J, ARAKAWA K..Blood pressure lowering effect of low intensity aerobic training in elderly hypertensive patients. **Med Sci Sports Exerc**. Jun;30(6):818-23, 1998.

MULVANY, M.J. The development and regression of vascular hypertrophy. **J Cardiovasc Pharmacol**, 19(suppl.2):S22-S27, 1992.

MUNTNER, P.; ROCCELLA, H.E.J.; WHELTON, P.K. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the US population. **Hypertension**, v.30, p.897-902, 2002.

NEGRÃO, C.E.; IRIGOYEN, 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, p. R365 - R 370, Suppl 2, Part 2, 1993.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of strain of spontaneously Hypertensive rats. **Jpn. Circ. J** , 27:282-93, 1963.

O'LEARY, D.S.; DUNLAP, R.C.; GLOVER, K.W. Role of endothelium-derived relaxing factor in hindlimb reactive and active hyperemia in conscious dogs. **Am J Physiol.** Apr; 266(4 Pt 2):R1213-9, 1994.

PAFFENBARGER RS JR, HYDE RT, WING AL, LEE IM, JUNG DL, KAMPERT JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **N Engl J Med.** Feb 25;328(8):538-45, 1993.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G.; DELL'ORTO, S.; PICCALUGA, E. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ. Res.**, Aug v.59, n.2, p.178-93., 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, n. 3, p.533-53, 2004.

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

PRASAD, A.; DUNNILL, G.S.; MARTIMER, P.S.; MARKUSK. Capillary rarefaction in the forearm skin in essential hypertension. **J Hypertens**, 13 : 265-268, 1995.

PREWITT, R.L.; CHEN, I.I.H.; DOWELL, R.F. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol**, 243 (Heart Circ Physiol. 12): H 243-H 251, 1982.

PREWITT, R.L.; CHEN, I.I.H.; DOWELL, R.F. Microvascular alterations in the kidney, one clip renal hypertensive rat. **Am J Physiol** (H-15): H.728-H.32, 1984.

RAKUSAN. K. & WICHER, O. Morphometry of the small arteries and arterioles in the heart: effect of chronic hypertension and exercise. **Cardiovasc Res**, 24: 178-84, 1990

RAMOS, A., BERTON, O., MORMEDE, P., CHAOULOFF, F., A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav Brain Res.** Apr;85(1):57-69, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITER, J.M. Noradrenergic transmission.
In:**Pharmacology.Churchill Livingstone**, third edition, 1995.

RAY, C.A.; HUME, K.M. Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans: insights from microneurography. **Med Sci Sports Exerc.** Mar;30(3):387-91. Review 1998.

SAFAR, M.E.; GIRERD, X.; LAURENT, S. Structural changes of large conduit arteries in hypertension. **J Hypertens**, 14: 545-555, 1996.

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.

SCHEUER J.; TIPTON C.M. Cardiovascular adaptations to physical training. **Annu Rev Physiol.**;39:221-51. Review, 1977.

SCHIMID-SCHÖNBEIN, G.W., ZWEIFACH, B.W., DELANO, F.A, CHEN, P.C.Y. Microvascular tone in a skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 9: 164-171, 1987.

SCHLAICH, M.P.; LAMBERT, E.; KAYE, D.M.; KROZOWSKI, Z.; CAMPBELL, D.J.; LAMBERT, G.; HASTINGS, J.; AGGARWAL, A.; ESLER, M.D. Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. **Hypertension**. 2004 Feb;43 (2):169-75. Epub Nov 10, 2003.

STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J.; LE NOBLE, J.L.M.L.; MESSING, M.W.J.; HUIJBERTS, M.S.P.; LE NOBLE, F.A.C.; ESSEN, H.V. The microcirculation and hypertension 1980. **J Hypertens**, 10 (suppl 7): S 147- S 156, 1992.

SUN, D., HUANG,A., KOLLER,A., KALEY,G. Short-term daily activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. **J Appl Physiol**, 76: 2214-2247, 1994.

THOMPSON, J.M.; O'CALLAGHAN, C.J.; 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.6, n.55, p.198-206, 1995.

TIPTON, C.M.; MATTHES, R, D.; BEDFORD, T.G. Influence of training on the blood pressure changes during lower body negative pressure in rats. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.14, p. 81-90, 1982.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction in hipertension. **J. Hipertens.**, v.14, p. S 83-S93, 1996.

VASAN, R.S.; MASSARO, J.M.; WILSON, P.W.; SESHADRI WOLF, P.A.; LEVY, D.; D'AGOSTINHO R.B.; FRAMIGHAN HEART STUDY. Antecedent blood pressure and risk of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v.105, n.1, p 48-53, 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 hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.42, p.H2627-H2631, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Population aging; a public health challenge. Geneva: WHO; 1998.

WORLD HYPERTENSION LEAGUE – Physical exercise in the management of hypertension: a consensus statement. **J Hypertens** 9: 283-87, 1991.

ZANCHETTI, A. Guidelines for the management of hypertension: the World Health Organization International Society of Hypertension view. **J.Hypertens**, 13 (suppl S): S119-S122, 1995.

ZHOU M., HANK SIMMS H., WANG P. Increased gut-derived norepinephrine release in sepsis: up-regulation of intestinal tyrosine hydroxylase. **Biochim Biophys**, v.1689,n.3, p.212-8, 2004.

ZIGMOND, R.E; SCHWARZSCHILD, M.A.; RITTENHOUSE, A.R. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. **Ann. Rev. Neurosci.**, p. 12415-461, 1989