ALVARO MARTINS BATISTA JUNIOR

**Efeito do treinamento aeróbio sobre o remodelamento glomerular e
marcadores inflamatórios em ratos hipertensos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

São Paulo

2013

ALVARO MARTINS BATISTA JUNIOR

**Efeito do treinamento aeróbio sobre o remodelamento glomerular e
marcadores inflamatórios em ratos hipertensos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Batista Junior, Alvaro Martins

Efeito do treinamento aeróbio sobre o remodelamento glomerular e marcadores inflamatórios em ratos hipertensos / Alvaro Martins Batista Junior. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Silvia Lacchini.

Descritores: 1.Exercício 2.Hipertensão 3.Glomerulos renais 4.Inflamação
5.Pressão arterial 6.Matriz extracelular

USP/FM/DBD-015/13

SUMÁRIO

	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Lista de abreviaturas	
	Resumo	
	Summary/Abstract	
1	Introdução.....	1
1.1	Hipertensão arterial e o rim como órgão-alvo.....	1
1.2	Estrutura renal.....	3
1.3	O treinamento físico na hipertensão.....	5
1.4	Treinamento físico e inflamação.....	8
2	Justificativa.....	10
3	Objetivo.....	11
4	Materiais e métodos.....	12
4.1	Animais e manutenção.....	12
4.2	Protocolo experimental.....	12
4.3	Teste de esforço máximo (TEM).....	15
4.4	Protocolos de treinamento aeróbio (TA) e de sedentarismo.....	16
4.5	Cateterização da artéria femoral.....	17
4.6	Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	19
4.7	Coleta dos rins para preparação histológica.....	19
4.7.1	Avaliação morfométrica e das fibras de colágeno.....	20
4.7.2	Avaliação da deposição de proteoglicanos	22
4.7.3	Imunohistoquímica (IHQ) de marcadores inflamatórios.....	23
5	Análise estatística.....	26
6	Resultados.....	27
6.1	Avaliação do desempenho físico em esteira.....	27
6.2	Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca.....	29
6.3	Avaliação morfométrica glomerular.....	31

6.4	Avaliação das fibras de colágeno.....	34
6.5	Avaliação de proteoglicanos.....	36
6.6	Avaliação dos marcadores inflamatórios.....	39
6.6.1	Avaliação de IL-6.....	39
6.6.2	Avaliação de IL-1 β	42
7	Discussão.....	45
7.1	Desempenho físico.....	45
7.2	Avaliação da PA e FC.....	46
7.3	Avaliação morfométrica glomerular.....	47
7.4	Avaliação da deposição de fibras de colágeno.....	48
7.5	Avaliação deposição de proteoglicanos.....	49
7.6	Avaliação da expressão de marcadores inflamatórios.....	49
8	Conclusão.....	51
9	Referências.....	52

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo da morfologia renal.....	5
Figura 2 - Esquema de como procederam as avaliações de aptidão física durante o protocolo de treinamento e as coletas de dados e tecidos.....	17
Figura 3 - Esquema de execução da técnica de cateterismo da artéria femoral.....	18
Figura 4 - Exemplo de medidas de espessura da cápsula de Bowman feitas no software de imagem Axio Vision Real 4.8, com coloração de picrossirius.....	21
Figura 5 - Exemplo de medidas da área da cápsula de Bowman e área do glomérulo feitas no software de imagem Axio Vision Real 4.8, com coloração de picrossirius.....	22
Figura 6 - Exemplo de medidas de espessura da cápsula de Bowman no software de imagem Axio Vision Real 4.8, feitas com técnica de APS.....	23
Figura 7 - Avaliação do desempenho físico em WKY e SHR treinados nos TEMs realizados durante o protocolo experimental ($p \leq 0,05$; 1ºTM vs 2º e 3ºTM).....	28
Figura 8 - Avaliação do desempenho físico em WKY e SHR sedentários nos TEMs realizados durante o protocolo experimental ($p \leq 0,05$ em SHR; 1ºTM vs 2º e 3º TM).....	29
Figura 9 - Avaliação da PAM e FC dos ratos WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA. (* $p \leq 0,05$ S0 vs T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T12).....	30

Figura 10 - Avaliação da PAS e PAD dos ratos WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA. Não houve diferença estatisticamente significativa.....	31
Figura 11 - Avaliação morfométrica da Área da Cápsula de Bowman (A) e Área do Glomérulo (B) em WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T12).....	32
Figura 12 - Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Aumento 400x.....	33
Figura 13 - Avaliação da deposição de fibras de colágeno na cápsula de Bowman em ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T2, T4, T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T2, T4, T8 e T12).....	34
Figura 14 - Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Setas indicam a espessura da cápsula de Bowman. Aumento 400x.....	35
Figura 15 - Avaliação da deposição de proteoglicanos na cápsula de Bowman em ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12 em WKY, e S0 vs T2, T4, T8 e T12 em SHR; # $p \leq 0,05$ S12 vs T4, T8 e T12 em WKY, e S12 vs T2, T4, T8 e T12 em SHR; + $p \leq 0,05$ S12 vs S0).....	37
Figura 16 - Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Setas	

indicam a espessura da cápsula de Bowman, através da técnica de APS.

Aumento 400x.....38

Figura 17 - Avaliação da expressão de IL-6 na cápsula de Bowman de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8 e T12).....40

Figura 18 - Avaliação da expressão de IL-6 nos glomérulos de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8).....40

Figura 19 - Fotomicrografia representativa da expressão de IL-6 no glomérulo e na cápsula de Bowman de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Aumento 400x.....41

Figura 20 - Avaliação da expressão de IL-1 β na cápsula de Bowman de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T2 e T8 em WKY; * $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12 em SHR; # $p \leq 0,05$ S12 vs T2, T4 e T8 em WKY; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8 e T12 em SHR).....43

Figura 21 - Avaliação da expressão de IL-1 β nos glomérulos de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12).....43

Figura 22 - Fotomicrografia representativa da expressão de IL-6 no glomérulo e na cápsula de Bowman de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Aumento 400x.....44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Anticorpos e Diluições Utilizadas Para Marcação Imunohistoquímica de Citocinas Inflamatórias.....	24
Tabela 2 – Anticorpos Secundários (Ac2º) Utilizados na Imunohistoquímica....	25
Tabela 3 – Descrição do Significado do Escore da Marcação Imunohistoquímica.....	25

Lista de Abreviaturas

APS	ácido periódico de Schiff
COX-1	ciclo oxigenase – 1
FC	frequência cardíaca
HDL	lipoproteína de alta densidade
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
ICAM	molécula de adesão intercelular
IHQ	imunohistoquímica
IL1- β	interleucina - 1 β
IL4	interleucina - 4
IL-6	interleucina - 6
IL-10	interleucina – 10
Mn-SOD	superóxido dismutase dependente de manganês
NAD(P)H oxidase	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NF-K β	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
O $_2^{\cdot -}$	ânion superóxido
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PBS	tampão fosfato de sódio
PCR	proteína C reativa
SHR	rato espontaneamente hipertenso
s-TNFr1	receptor 1 solúvel do fator de necrose tumoral do tipo α
S0	sedentário da semana 0
S12	sedentário da semana 12
TA	treinamento aeróbio
TEM	teste de esforço máximo

TGF- β	fator de crescimento tumoral - β
TNF- α	fator de necrose tumoral - α
T1	treinado por 1 semana
T2	treinado por 2 semanas
T4	treinado por 4 semanas
T6	treinado por 6 semanas
T8	treinado por 8 semanas
T12	treinado por 12 semanas
WKY	Rato Wistar Kyoto

Batista Junior AM. Efeito do treinamento aeróbio sobre o remodelamento glomerular e marcadores inflamatórios em ratos hipertensos [dissertação]. São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

RESUMO

Sabendo que o aumento da pressão arterial (PA) é importante no desencadeamento de uma resposta inflamatória e alterações estruturais como forma adaptativa, a hipótese desse estudo é a de que o treinamento aeróbio (TA) pode causar um remodelamento glomerular benéfico e agir sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Para responder a esta hipótese, foram considerados como objetivos: 1) Avaliar se o curso temporal do TA leva a melhora morfológica; 2) Avaliar a expressão de marcadores inflamatórios no curso temporal do TA. Foram usados ratos machos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os animais foram divididos em quatorze grupos, entre hipertensos e normotensos, treinados e sedentários. As avaliações de teste de esforço máximo (TEM) foram feitas nas semanas 0, 6 e 12, de forma a avaliar o desempenho físico e a permitir ajustar o protocolo de TA. Nos períodos das semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 12, grupos de animais foram submetidos à cateterização da artéria femoral para a medida de PA e frequência cardíaca (FC). Em seguida, os animais foram eutanasiados e os rins foram coletados para análise histológica, usando as técnicas: Ácido Periódico de Schiff (APS) e Picrossirius, e detecção por imunohistoquímica (IHQ) de marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente comparando-se os grupos por análise de variância (ANOVA) Fatorial, complementada por teste *post hoc* de Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$. Tanto SHR quanto WKY apresentaram melhora no desempenho físico. Ao final do TA, somente os SHR apresentaram queda de pressão arterial média (PAM) e tanto SHR quanto WKY apresentaram queda de FC. A análise morfométrica glomerular mostrou que o TA induziu um aumento da área do glomérulo no WKY, e um aumento da área da cápsula de Bowman e da área do glomérulo no SHR. Também observamos diminuição na deposição de fibras de colágeno, proteoglicanos, IL-1 β e IL-6 glomerulares, induzida pelo TA. Concluindo, os dados indicam que o TA induziu um remodelamento glomerular benéfico e uma redução na expressão de IL-1 β e IL-6 nos animais hipertensos, o que possivelmente está associado à queda de PAM observada.

Descritores: 1.Exercício 2.Hipertensão 3.Glomérulos renais 4.Inflamação 5.Pressão arterial 6.Matriz extracelular

Batista Junior AM. Effect of aerobic training on glomerular remodeling and inflammatory markers in hypertensive rats [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

SUMMARY/ABSTRACT

Considering that the increase in blood pressure (BP) is an important trigger for inflammatory response and structural changes as adaptive way, the hypothesis of this study is that aerobic training (TA) may induce a beneficial glomerular remodeling and act on the expression of inflammatory cytokines. To address this hypothesis, we considered the following objectives: 1) to assess the time course of TA that leads to morphological improvement, 2) evaluate the expression of inflammatory markers in the temporal course of TA. We used male normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). The animals were divided into fourteen groups, among hypertensive and normotensive trained and sedentary. Evaluations of maximum effort test (TEM) were taken at weeks 0, 6 and 12, in order to evaluate the physical performance and permit adjustments in the protocol of TA. At weeks 0, 1, 2, 4, 8 and 12, the rats underwent femoral artery catheterization for measurement of BP and heart rate (HR). After then, the animals were euthanized and kidneys were collected for histological analysis, using the techniques of periodic acid-Schiff (APS) and picrosirius, and detection by immunohistochemistry (IHC) of inflammatory markers (IL-1 β and IL-6). The results were statistically evaluated by comparing the groups by analysis of variance (ANOVA) Factorial, complemented by Bonferroni's post hoc test. For all analyzes was adopted significance level of $p \leq 0.05$. Both SHR as WKY showed improvement in physical performance. At the end of the TA, only SHR decreased mean arterial pressure (MAP), when both SHR and WKY decreased HR. The glomerular morphometric analysis revealed that TA induced an increase in the glomerular area in WKY and an increase in the area of Bowman's capsule and of glomerulus in SHR. We also observed a decrease in the deposition of collagen fibers and proteoglycans in glomerulus, and IL-1 β and IL-6 IHC staining in glomerulus induced by TA. In conclusion, our data suggests that TA induces a beneficial glomerular remodeling and a reduction in the glomerular expression of IL-1 β and IL-6 in hypertensive animals, which is possibly associated with the reduction observed in MAP.

Descriptors: 1.Exercise 2. hypertension 3.Renal glomeruli 4. inflammation 5. blood pressure 6. extracellular matrix

1. Introdução

1.1 Hipertensão arterial e o rim como órgão-alvo

A perfusão tecidual adequada é garantida pela manutenção da força motriz da circulação (pressão sanguínea) em valores adequados, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades. A pressão arterial é definida pela razão entre força e unidade de área, sendo, portanto, dependente de fatores físicos como volume sanguíneo e capacitância da circulação (Irigoyen et al., 2009). Existem diversos mecanismos de controle cardiovascular, de forma a manter a pressão arterial sob um constante controle. Entre estes mecanismos, os principais são representados pelos pressorreceptores arteriais, atividade nervosa simpática, sistema renina-angiotensina, função endotelial e mecanismos lentos representados pelo controle renal sobre os fluidos corporais (Guyton e Hall, 2006; Irigoyen et al., 2009). O desequilíbrio entre estes mecanismos de controle cardiovascular leva ao desenvolvimento da hipertensão arterial (Krieger e Dzau, 1991).

A hipertensão arterial caracteriza-se por um processo crônico-degenerativo, de natureza multifatorial, assintomático, que apresenta níveis tensionais sanguíneos elevados. Afeta aproximadamente 30% da população adulta, com mais de 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010), sendo importante fator de risco para morbidade e mortalidade relacionadas às doenças cardiovasculares (Muntner et al., 2002). É causa e consequência do

comprometimento do equilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, levando a alterações estruturais como resposta adaptativa, mas também acarretando em lesão dos órgãos-alvo (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010). A fisiopatologia da hipertensão arterial em humanos não é bem compreendida. Estima-se que 90% ou mais das pessoas identificadas como hipertensas são classificadas como portadores de hipertensão idiopática (de origem desconhecida) ou essencial (Wilmore e Costill, 2001).

No desenvolvimento da hipertensão arterial, duas classes de fatores são preponderantes: fatores genéticos não modificáveis e aqueles dependentes do estilo de vida (peso corporal, dieta, tabagismo, alcoolismo, estresse e nível de atividade física) que podem ser alterados, contribuindo de forma significativa para a determinação dos níveis pressóricos. Os mecanismos que determinam ou que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares ainda não estão completamente elucidados devido à grande complexidade das interações celulares tanto em situações fisiológicas como patológicas.

Está bem estabelecido que os rins estão entre os principais órgãos-alvo da hipertensão, sendo esta uma das principais causas de insuficiência renal independente do diabetes (Ljutić e Kes, 2003; Cachoeiro et al., 2008). A fisiopatologia e o mecanismo de desenvolvimento da hipertensão na doença glomerular envolvem mecanismos complexos. Sabe-se que ocorre ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina, retenção de sódio, expansão de volume e redução dos mecanismos

vasodilatadores. Como a autorregulação da pressão glomerular é reduzida na doença glomerular crônica, o aumento da pressão arterial leva ao aumento da pressão glomerular. Este, por sua vez, leva à disfunção endotelial nos capilares glomerulares e ao aumento da filtração de proteínas. Em consequência a isso, ocorre alteração nas células mesangiais e tubulares proximais, que se tornam imunocompetentes e passam a expressar citocinas e mediadores inflamatórios. Este processo leva à substituição de tecido renal funcionante por tecido conjuntivo e leva, conseqüentemente, à formação de fibrose (Ljutić e Kes, 2003; Campese et al., 2006; Van Der Zee et al., 2009).

1.2 Estrutura renal

A formação de urina inicia-se nos glomérulos, os quais são estruturas que compõem os néfrons dos rins. Os rins são órgãos responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluído extra celular. Cerca de 20% do plasma que entra nos rins pela artéria renal é filtrado graças à pressão hidrostática do sangue nos capilares glomerulares. Os outros 80% que não foram filtrados circulam ao longo dos capilares glomerulares, atingindo a arteríola eferente e passando pelos capilares peritubulares (Aires, 2012).

Os rins são órgãos que tem uma borda convexa e outra côncava. Na borda côncava encontra-se o hilo renal, estrutura onde encontram as veias, artérias, nervos e cálices renais. Revestindo os rins temos uma cápsula de

tecido conjuntivo denso, ligada ao parênquima renal. Os rins são divididos em duas zonas: a zona cortical e a zona medular. Na zona medular encontram-se de 10 a 18 estruturas cônicas, denominadas pirâmides de Malpighi. Essas pirâmides tem suas bases e lados em contato com o córtex e seus vértices projetando saliências nos cálices renais. Essas saliências são chamadas papilas renais, com seus ápices voltados para os cálices renais. No ápice de cada papila encontram-se de 18 a 24 orifícios, que correspondem à desembocadura dos ductos coletores papilares. A urina sai desses orifícios percorrendo pelos cálices menores, cálices maiores, pelves renal e ureter. Nas pirâmides existem de 400 a 500 formações alongadas em forma de leque, chamados raios medulares, contendo alças de Henle, ductos coletores e vasos sanguíneos (figura 1). A zona cortical compreende o espaço entre a base das pirâmides renais e a cápsula renal. Além de vasos sanguíneos, encontram-se glomérulos, túbulos proximais e distais de todos os néfrons e alças de Henle e ductos coletores dos néfrons mais superficiais como visto na figura 1 (Aires, 2012).

O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo e pela cápsula de Bowman. O glomérulo é um enovelado de capilares que se iniciam a partir da arteríola aferente, formando alças capilares que são sustentadas por células mesangiais e, posteriormente as alças se reúnem formando a arteríola eferente. O endotélio dos capilares glomerulares apresentam-se descontínuos, separados por fenestrações por onde passam as substâncias de peso molecular elevado, mas não permitem a passagem dos elementos

figurados do sangue. A cápsula de Bowman tem parede dupla entre as quais fica o espaço de Bowman ocupado pelo filtrado glomerular.

Figura 1 – Esquema representativo da morfologia renal (Aires, 2012).

1.3 O treinamento físico na hipertensão

Sabe-se classicamente que a hipertensão arterial, na fase crônica, é caracterizada pela manutenção de elevada resistência vascular periférica, com comprometimento da microcirculação, especialmente das arteríolas e

esfíncteres pré-capilares (Guyton et al., 1970). Além disso, considerando o impacto médico e econômico que a hipertensão arterial tem sobre a população, as buscas por tratamentos eficazes no seu controle são grandes e contínuas. Tais tratamentos incluem tanto as terapias farmacológicas convencionais, como diuréticos, vasodilatadores, simpatolíticos, beta-bloqueadores, inibidores da ECA, bloqueadores de canais de cálcio e antagonistas de receptores AT1 de angiotensina II, como também terapias não farmacológicas, como mudanças no estilo de vida (Zanchetti, 1995; Mancia e Grassi, 1998). Dentre as terapias não farmacológicas, o exercício aeróbio moderado (isoladamente ou associado com terapias farmacológicas) tem se mostrado bastante eficaz para reduzir os níveis pressóricos de indivíduos hipertensos leves e moderados, bem como um importante coadjuvante no tratamento medicamentoso de hipertensos severos (Chobanian et al., 2003; Pescatello et al., 2004).

Os efeitos do treinamento aeróbio na redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos são conhecidos de longa data (Boyer e Kasch, 1970). Contudo, recentemente verificou-se que o treinamento é eficaz não somente em reduzir os níveis pressóricos de pacientes hipertensos, mas também em facilitar o aparecimento de outros benefícios, como a redução de peso, a redução da gordura corporal, e de circunferência abdominal, o aumento da sensibilidade à insulina, a redução dos triglicérides e aumento do HDL colesterol (Fagard, 2006).

Embora saiba-se que existe queda de pressão arterial decorrente do treinamento físico em indivíduos hipertensos, os mecanismos pelos quais

isto ocorre não estão totalmente elucidados. Uma das observações feitas está no fato de que a redução da pressão arterial parece estar relacionada à intensidade e à frequência do treinamento (Gava et al., 1995; Pescatello et al., 2004). Porém, as diferenças observadas em diversos estudos, onde existem variações na magnitude da melhora, podem ser explicadas por fatores como etnia, idade e gênero dos indivíduos (Matos et al., 2009).

Estudos em animais experimentais mostraram que a diminuição na atividade simpática cardíaca após o exercício de baixa intensidade tem consequências hemodinâmicas importantes em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Véras-Silva et al., 1997; França e Michelini, 2001). Estudos tanto em animais experimentais como em humanos mostraram que o treinamento físico reduz a atividade nervosa simpática renal e muscular em indivíduos com insuficiência cardíaca (Negrão e Middlekauff, 2008). O exercício de baixa intensidade em SHR diminuiu a atividade simpática do coração, associada com uma redução na frequência cardíaca, sendo que ratos treinados com exercícios de baixa intensidade também apresentam significativa diminuição na pressão arterial sistólica, diastólica e média, no débito cardíaco e índice cardíaco (Véras-Silva et al., 1997). Além disso, o treinamento físico restaura o controle barorreflexo arterial da atividade nervosa simpática renal e a frequência cardíaca (Liu et al., 2000), ajudando a reduzir a produção de angiotensina II e a expressão de receptores AT1 (Mousa et al., 2008).

1.4 Treinamento físico e inflamação

Inflamação e apoptose tem um importante papel na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, assim como, aterosclerose, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial. Esses processos podem induzir, alterações na função cardíaca, na resistência vascular periférica e nos mecanismos de controle renal de eletrólitos e volume plasmático, sendo observado um maior índice de mortalidade em pacientes com lesão de órgão-alvo, se comparados com pacientes sem lesão (Morillas et al., 2012).

Recentes estudos têm nos mostrado que, a hipertensão arterial, em especial nos pacientes com lesão de órgão-alvo, aumenta a expressão de marcadores de inflamação, como o IL-6, e a expressão de alguns marcadores de apoptose, como o receptor 1 solúvel do fator de necrose tumoral α (s-TNFr1). Também foi observado que, quanto maior era o número de órgãos lesionados, maior era a inflamação e apoptose (Morillas et al., 2012).

Vários estudos têm evidenciado uma associação entre a atividade física regular e a redução nos níveis dos diferentes marcadores inflamatórios. Os mediadores inflamatórios mais estudados como prováveis fatores prognósticos de risco são a proteína C reativa (PCR), moléculas de adesão (ICAMs e P-selectina) e citocinas como IL-6 e TNF- α (Edwards et al., 2007). Estudos realizados mostraram que indivíduos que praticavam atividade física com maior intensidade reduziam mais os níveis de PCR do que os que se exercitavam com atividade física leve (Hong et al., 2005).

Em um importante estudo com 20 homens normotensos randomizados para um grupo exercitado (n=10) ou grupo controle (n=10), foram obtidas amostras de sangue e biópsia do músculo vasto lateral no início e após seis meses de treinamento. A avaliação mostrou que houve uma melhora de 29% no VO₂máx no grupo dos exercitados. Não houve alteração do nível sérico de TNF- α , IL-6, e IL-1 β , mas estes reduziram significativamente nas amostras de biópsia muscular nos indivíduos treinados comparados com os não treinados (Edwards et al., 2007). Outro achado, também recentemente mostrou que a expressão elevada de TNF- α volta a níveis normais após 1 hora de natação vigorosa, em camundongos. Além disso, o treinamento físico parece reduzir os fatores pro-inflamatórios como TNF- α , PCR e IL-6 e aumentar os fatores anti-inflamatórios como IL-4, IL-10 e TGF- β (Hjelstuen et al., 2006; Zhang, 2009). Outro estudo realizado em indivíduos com insuficiência renal crônica mostrou que o exercício físico foi capaz de atenuar a ativação de mediadores inflamatórios como COX-1, NF-kB e NAD(P)H oxidase tanto em humanos (Bai et al., 2009) como em ratos (Cho et al., 2009).

2. Justificativa e hipótese

A compreensão de que o treinamento físico reduz de maneira importante a ação de diversos fatores relacionados à hipertensão levou ao estabelecimento do treinamento físico como tratamento não farmacológico de doenças cardiovasculares. Além disso, sabe-se que o rim é um dos principais órgãos-alvo da hipertensão. Contudo, os estudos relacionados ao treinamento físico tendem a priorizar a melhora na função cardíaca e vascular, especialmente pelo seu impacto sobre a pressão arterial. Por outro lado, precisa ficar claro que a hipertensão é um dos principais fatores desencadeadores da doença crônica renal e que a insuficiência renal *per se* é fator preponderante para o surgimento e manutenção da hipertensão. Sabendo que o aumento da pressão arterial é importante no desencadeamento de uma resposta inflamatória e alterações estruturais como forma adaptativa, a hipótese desse estudo é a de que o treinamento aeróbio pode causar um remodelamento glomerular benéfico e agir sobre a expressão de citocinas inflamatórias.

3. Objetivos

O presente estudo teve por objetivo testar a hipótese de que o treinamento aeróbio causa um remodelamento glomerular, diminuindo os marcadores iniciais de inflamação, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Para tal, serão considerados como objetivos:

1. Avaliar se o curso temporal do treinamento aeróbio leva à melhora morfológica glomerular.
2. Avaliar a expressão de marcadores inflamatórios no curso temporal do treinamento aeróbio.

4. Materiais e métodos

4.1 Animais e manutenção

Foram usados ratos machos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR), provenientes do Biotério Central do ICB/USP, com 2 meses de idade e com peso aproximado em 170-200g no início do experimento. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 22 a 24 °C, com dieta padrão e água administradas *ad libitum*. Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP e pela CAPPesq da FMUSP.

4.2 Protocolo experimental

Para responder aos objetivos apresentados, foram estudados ratos hipertensos e normotensos submetidos ou não ao TA em esteira. Além disso, os animais foram avaliados em diferentes momentos do TA, de forma a procurar visualizar possíveis momentos adaptativos importantes. Os grupos sedentários abrangem os tempos iniciais (prévio no protocolo de TA) e final, de forma a eliminar possíveis variações em função da idade dos animais ao final do estudo.

Desta maneira, os animais foram distribuídos em 14 subgrupos experimentais, sendo 7 subgrupos de ratos normotensos e 7 subgrupos de ratos hipertensos:

NORMOTENSOS	HIPERTENSOS
Grupo 1 (n=10): WKY S ₀	Grupo 8 (n=10): SHR S ₀
Grupo 2 (n=10): WKY T ₁	Grupo 9 (n=10): SHR T ₁
Grupo 3 (n=10): WKY T ₂	Grupo 10 (n=10): SHR T ₂
Grupo 4 (n=10): WKY T ₄	Grupo 11 (n=10): SHR T ₄
Grupo 5 (n=10): WKY T ₈	Grupo 12 (n=10): SHR T ₈
Grupo 6 (n=10): WKY T ₁₂	Grupo 13 (n=10): SHR T ₁₂
Grupo 7 (n=10): WKY S ₁₂	Grupo 14 (n=10): SHR S ₁₂

Para preparar todos os grupos experimentais, foram estudados 7 lotes de animais:

1. um lote de animais que foram submetidos aos primeiros procedimentos de adaptação e ao 1º TEM, mas que foram avaliados antes do protocolo de treinamento iniciar (sedentários 0, S₀);

2. um lote de animais que foram submetidos aos procedimentos de adaptação e treinamento, e foram submetidos ao 1º TEM (semana 0), mas que foram avaliados ao final da 1ª semana de treinamento (treinados 1, T₁);

3. um lote de animais que foram submetidos aos procedimentos de adaptação e treinamento, e foram submetidos ao 1º TEM (semana 0), mas que foram avaliados ao final da 2ª semana de treinamento (treinados 2, T₂);

4. um lote de animais que foram submetidos aos procedimentos de adaptação e treinamento, e foram submetidos ao 1º TEM (semana 0) mas que foram avaliados ao final da 4ª semana de treinamento (treinados 4, T4);

5. um lote de animais que foram submetidos aos procedimentos de adaptação e treinamento, e que foram submetidos ao 1º TEM e 2º TEM (semanas 0 e 6), mas que foram avaliados ao final da 8ª semana de treinamento (treinados 8, T8);

6. um lote de animais que foram submetidos aos procedimentos de adaptação e treinamento, e que passaram por todos os TEMs, mas que foram avaliados ao final da 12ª semana de treinamento (treinados 12, T12), após o 3º TEM;

7. um lote de animais que foram submetidos aos primeiros procedimentos de adaptação e que passaram por todos os TEMs, sendo avaliados ao final da 12ª semana sem treinamento (sedentários 12, S12), após o 3º TEM.

O peso corporal foi aferido no final do tempo de cada subgrupo experimental.

É importante ressaltar que todos os animais foram submetidos previamente ao teste de esforço máximo, eliminando-se os animais inaptos para o exercício em esteira. Os animais que mostraram aptidão foram usados no estudo e distribuídos nos quatorze grupos experimentais.

Antes do início do protocolo experimental, os animais passaram pela adaptação inicial à esteira ergométrica adaptada para ratos (KT 3000, Imbramed). Esta adaptação ocorreu por um período de duas semanas (5

sessões de 0,3-0,6km/h, sem inclinação, 5-10 minutos/dia), quando também ocorreu a seleção dos animais mais aptos à corrida. A esteira é dividida em 10 raias de aço inoxidável com tampa de acrílico transparente, pintadas em preto na região anterior, de forma a criar um ambiente mais atrativo para os animais durante a corrida, e evitando o uso de outros métodos como o choque elétrico para estimular os animais a correrem.

O protocolo de treinamento físico foi feito em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Lisete C Michelinei do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia do ICB/USP.

4.3 Teste de esforço máximo (TEM)

No último dia do período de adaptação, os animais foram submetidos ao teste de esforço máximo (TEM). A capacidade aeróbia máxima foi avaliada de forma indireta através do teste de esforço máximo. Neste teste, foi avaliado o desempenho do rato durante a corrida em esteira ergométrica. Para isso usa-se velocidade inicial de 0,3km/h, com aumentos de 0,3 em 0,3km/h a cada 3 minutos, até a exaustão do animal. O TEM foi realizado antes do início do protocolo (semana 0), com o objetivo de avaliar a capacidade física inicial dos ratos, distribuí-los nos grupos experimentais e dosar a carga para o treinamento físico; o TEM foi repetido no meio do período de treinamento (semana 6), com o objetivo de avaliar o desempenho físico dos ratos e ajustar a carga para as próximas semanas do treinamento físico; e também foi feito ao final do período de treinamento (semana 12),

com o objetivo de avaliar o desempenho físico dos ratos ao final do protocolo. Vale lembrar que a distribuição inicial dos animais em grupos foi feita de forma a que os grupos tivessem capacidades físicas equivalentes (Higa-Taniguchi et al., 2009).

4.4 Protocolos de treinamento aeróbio (TA) e de sedentarismo

O protocolo de treinamento aeróbio (TA) usado foi o TA de baixa intensidade (50 a 60% da carga máxima atingida no teste de esforço), e inclui um programa de exercício em esteira ergométrica repetitivo, realizado por 1 hora/dia, em 5 dias/semana, durante 12 semanas (Higa-Taniguchi et al., 2009). O procedimento foi iniciado com tempos curtos de duração (20-30 minutos) e velocidades baixas (50% da carga máxima), durante a primeira semana, até se atingir o período de 60 minutos de treinamento com intensidade desejada no final da 4ª semana. A intensidade do treinamento foi aumentada gradativamente usando-se a combinação entre velocidade e duração (a inclinação da esteira permaneceu em 0%), atingindo 1 hora/dia na 3ª semana e intensidade de 60% na 4ª semana.

A escolha da intensidade de exercício em 50-60% da capacidade máxima se deve ao fato desta ser considerada ideal para a obtenção de efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular de animais hipertensos, levando à redução da hipertensão e ao remodelamento benéfico de artérias de resistência (Amaral et al., 2001; Melo et al., 2003; Irigoyen et al., 2005; Pereira et al., 2009).

Os animais dos grupos sedentários foram mantidos por igual período de tempo, sendo manipulados diariamente e colocados uma vez por semana na esteira (10 minutos, com velocidade de 0,5-0,7km/h), para que se mantivessem habituados ao manuseio e à esteira. Da mesma forma que para os grupos treinados, os grupos sedentários foram submetidos ao TEM nos mesmo períodos. A figura 2 apresenta um esquema de como foi feito o acompanhamento dos grupos durante as 12 semanas de treinamento físico ou de sedentarismo.

Figura 2. Esquema de como procederam as avaliações de aptidão física durante o protocolo de treinamento e as coletas de dados e tecidos.

4.5 Cateterização da artéria femoral

Todos os grupos tiveram a pressão arterial medida diretamente através de cateter implantado na artéria femoral.

Os cateteres foram confeccionados em tubos de polivinil *Tygon* (5 cm) tendo uma das extremidades conectada a um outro tubo de polivinil com diâmetro menor (PV – 50).

Para o implante do cateter, os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (50mg/ Kg) e Xilazina (12mg/kg), colocados em decúbito dorsal, sendo a tricotomia feita na região medial da coxa e no dorso. Após o corte da pele, rapidamente identifica-se o feixe vâsculo-nervoso, constituído por artéria, veia e nervo femorais (figura 3). A artéria femoral é isolada e recebe pequena incisão para o implante da porção mais fina do cateter. A seguir, o cateter é passado subcutaneamente e exteriorizado no dorso do animal, entre as escápulas. Os animais são posteriormente deixados em gaiolas individuais, mantidas em ambiente aquecido até a completa recuperação. O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram feitos no dia seguinte à cirurgia.

Figura 3. Esquema de execução da técnica de cateterismo da artéria femoral (Lacchini, 2000).

4.6 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca

Todos os registros foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação, 24 horas após os procedimentos de cateterização arterial. Antes do início dos registros, os animais foram deixados em repouso, aguardando-se o tempo necessário (15 a 30 minutos) para que ocorra estabilização das variáveis hemodinâmicas. A pressão arterial pulsátil foi obtida diretamente através da conexão do cateter arterial, implantado diretamente na artéria femoral a um transdutor de pressão (Gould P23 XL), o qual foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (ADInstruments - Power Lab) com frequência de amostragem de 2000Hz por canal. Os dados foram obtidos e analisados através do programa Lab Chart 7pro. Os registros duraram um tempo aproximado de 30-45 minutos e ocorreram sempre no mesmo período do dia, pela manhã.

4.7 Coleta dos rins para preparação histológica

A perfusão dos tecidos compreendeu a lavagem do sistema vascular com bomba peristáltica através do ventrículo esquerdo, inicialmente com tampão fosfato de sódio (PBS) e posteriormente com paraformoldeído a 4% tamponado (PBS). Os rins foram pós-fixados em paraformoldeído tamponado por mais 24-48 horas e posteriormente colocados em álcool 70% até o processamento para preparação histológica. Para o processamento, os tecidos foram dispostos em cassetes plásticos processador/inclusor; e levados ao processador auto-técnico com ciclo de 9 horas (realizando a

desidratação, diafanização e parafinização dos tecidos). Após, os tecidos processados foram incluídos em parafina usando uma central de inclusão.

Secções transversas dos rins (5 μm) foram dispostas em lâminas pré tratadas com silano 2%, que posteriormente foram usadas para avaliação morfométrica e análises de deposição de fibras de colágeno e de deposição de proteoglicanos.

4.7.1 Avaliação morfométrica e das fibras de colágeno

Com os cortes (5 μm) dispostos em lâminas, desparafinizados, hidratados e corados por picrossirius (1 hora), lavados em água corrente e montados com lamínulas, as lâminas foram levadas ao microscópio (Axio Scope, Zeiss), onde foram feitas fotomicrografias em uma objetiva de 40x (campo claro). Foram estudados 20 glomérulos por lâmina. Para cada glomérulo foram medidas 8 regiões da cápsula de Bowman, medindo-se a espessura da cápsula, através de um software de imagem (Axio Vision Rel 4.8), como mostra a figura 4.

Ainda para avaliação morfométrica foi medida a área da cápsula de Bowman e a área do glomérulo, como mostra a figura 5.

Figura 4. Exemplo de medidas de espessura da cápsula de Bowman feitas no software de imagem Axio Vision Real 4.8, com coloração de picrossirius.

Figura 5. Exemplo de medidas da área da cápsula de Bowman e área do glomérulo feitas no software de imagem Axio Vision Real 4.8, com coloração de picrossirius.

4.7.2 Avaliação da deposição de proteoglicanos

Os cortes (5 μm) foram dispostos em lâminas, desparafinizados, hidratados e incubados por 10 minutos em ácido periódico a 0,5%, sendo pós lavados em água corrente, incubados por 15 minutos com reativo de Schiff no escuro, lavados em água corrente e montados. As lâminas foram levadas ao microscópio, onde foram feitas fotomicrografias em uma objetiva de 40x (campo claro), avaliando-se 20 glomérulos por lâmina. Foram

medidas 8 regiões da cápsula de Bowman de cada glomérulo, medindo-se a espessura da cápsula, através de um software de imagem (Axio Vision Rel 4.8) como mostra a figura 6.

Figura 6. Exemplo de medidas de espessura da cápsula de Bowman no software de imagem Axio Vision Real 4.8, feitas com técnica de APS.

4.7.3 Imunohistoquímica (IHQ) de marcadores Inflamatórios

A despeito da imunohistoquímica (IHQ) para as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β , todos os protocolos com as respectivas diluições dos anticorpos foram padronizadas (ver Tabela 1).

Cortes de 5µm obtidos de rins fixados em formol a 4% tamponado foram submetidos à desparafinização e hidratação em série de álcoois decrescente e água destilada. O método de IHQ utilizado foi o tipo A-B-C (Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase). O bloqueio de peroxidase endógena foi feito com H₂O₂ a 3%. Os tecidos foram incubados a temperatura de 4°C com anticorpos primários (Ac 1º), diluídos em um bloqueador (BSA - Albumina de Soro Bovino) a 3% *overnight*.

O estudo imunohistoquímico das citocinas inflamatórias renais foi feito usando-se os anticorpos primários, e diluições descritos na tabela 1.

Após a incubação *overnight* com o anticorpo primário (Ac 1º), seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário (Ac 2º) de acordo com a tabela 2.

TABELA 1 – Anticorpos e Diluições Utilizadas Para Marcação Imunohistoquímica de Citocinas Inflamatórias

Anticorpo Primário (Ac1º)	Espécie em que foi o Ac1º	Diluição para IHQ	Fabricante
IL-6	Rabbit	1:200	abcam
IL-1β	Rabbit	1:200	Peppo Teck

TABELA 2 – Anticorpos Secundários (Ac2º) Utilizados na Imunohistoquímica

Ac1º	Ac2º	Diluição do Ac2º para IHQ	Fabricante
IL-6	Goat anti-rabbit	1:1000	Zymed®
IL-1β	Horse anti-rabbit	1:1000	Vector®

Após a incubação com o Ac 2º, seguiu-se a marcação com estreptoavidina conjugada com HRP; foi usado o Kit Vecstain Elite ABC Universal (Vector®). Em seguida, fez-se a contracoloração com Hematoxilina e a revelação da marcação usando DAB (3,3 diaminobenzidina) como cromógeno, utilizamos o Kit DAB Substrate for Peroxidase (Vector®). Os controles negativos das reações foram feitos omitindo-se o Ac 1º no primeiro corte de cada lâmina.

Após a montagem das lâminas estas foram avaliadas em microscópio de forma semi-quantitativa usando um escore de marcação de acordo com a intensidade da coloração obtida com o cromógeno (tabela 3).

TABELA 3 – Descrição do Significado do Escore da Marcação Imunohistoquímica

ESCORE	SIGNIFICADO
0	Nenhuma Marcação
1	Marcação leve
2	Marcação entre leve e moderada
3	Marcação Moderada
4	Marcação Intensa

5. Análise estatística

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente comparando-se os grupos por análise de variância (ANOVA) fatorial, complementada por teste *post hoc de* Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

6. Resultados

Devido ao grande número de grupos e à capacidade física da esteira de treinamento os protocolos experimentais de sedentários e treinados foram repetidos duas vezes. Os resultados obtidos são mostrados a seguir:

- 1) Estudos funcionais;
- 2) Variáveis hemodinâmicas (PAM, PAS, PAD e FC);
- 3) Morfometria;
- 4) Deposição de fibras de colágeno na cápsula de bowman;
- 5) Deposição de proteoglicanos na cápsula de Bowman;
- 6) Avaliação de citocinas inflamatórias.

6.1 Avaliação do desempenho físico em esteira

Os testes de esforço máximo foram feitos antes do início do protocolo de treinamento e sedentarismo (semana 0), durante o protocolo (semana 6) e ao final do protocolo (semana 12).

Tanto SHR quanto WKY treinados apresentaram melhora no desempenho físico após 6 e 12 semanas de TA, sendo que os SHR possuem melhor desempenho em todas as avaliações (WKY: $1,02 \pm 0,3$; $1,32 \pm 0,2$ e $1,92 \pm 0,4$ km/h e SHR: $1,62 \pm 0,4$; $2,09 \pm 0,4$ e $2,40 \pm 0,3$ km/h, em S0, T6 e T12, respectivamente; $p \leq 0,05$ em WKY e SHR). Estes dados são mostrados na figura 7.

Figura 7. Avaliação do desempenho físico em WKY e SHR treinados nos TEMs realizados durante o protocolo experimental ($p \leq 0,05$; 1ºTM vs 2º e 3ºTM)

Tanto SHR quanto WKY sedentários apresentaram queda no desempenho físico após 6 e 12 semanas de sedentarismo (WKY: $1,00 \pm 0,3$; $0,72 \pm 0,5$ e $0,69 \pm 0,3$ km/h e SHR: $1,63 \pm 0,4$; $0,90 \pm 0,6$ e $0,75 \pm 0,6$ km/h, em S0, S6 e S12, respectivamente; $p \leq 0,05$ em SHR), sendo significante somente em SHR como mostra a figura 8.

Figura 8. Avaliação do desempenho físico em WKY e SHR sedentários nos TEMs realizados durante o protocolo experimental ($p \leq 0,05$ em SHR; 1ºTEM vs 2º e 3º TM).

6.2 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Ao final do TA os SHR treinados apresentaram queda de PAM, já observada na 8ª semana de TA, mantendo-se até a 12ª semana, se comparados com SHR sedentários (179 ± 10 vs 163 ± 6 mmHg, S0 vs T12, respectivamente) (figura 9A). Em relação a FC, os SHR treinados apresentaram bradicardia de repouso já a partir da 1ª semana de TA, sendo mais pronunciada na 8ª e 12ª semana de TA, se comparado com SHR sedentários (394 ± 18 vs 363 ± 3 bpm, S0 vs T12, respectivamente). Os WKY apresentaram bradicardia de repouso na 4ª e 12ª semanas de TA, indicando que houve melhora na capacidade física (figura 9B). Não houve diferenças significativas na PAS e PAD em ambos os grupos (figura 10A e 10B).

Figura 9. Avaliação da PAM (A) e FC (B) dos ratos WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA. (* $p \leq 0,05$ S0 vs T1, T8 e T12 SHR e * $p \leq 0,05$ S0 vs T4 e T12 WKY; # $p \leq 0,05$ S12 vs T1, T8 e T12 SHR e ; # $p \leq 0,05$ S12 vs T4 e T12 WKY).

Figura 10. Avaliação da PAS (A) e PAD (B) dos ratos WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA. Não houve diferença estatisticamente significativa.

6.3 Avaliação morfométrica glomerular

A análise morfométrica glomerular mostrou que o TA aumentou tanto a área da Cápsula de Bowman quanto a área do glomérulo nos SHR treinados, se comparados com SHR sedentários, enquanto que nos WKY

houve aumento somente na área do glomérulo, como visto nas figuras 11A e 11B e figura 12.

Figura 11. Avaliação morfométrica da Área da Cápsula de Bowman (A) e Área do Glomérulo (B) em WKY e SHR, treinados e sedentários, no curso temporal do TA (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T12).

Figura 12. Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Setas azuis indicam a cápsula de Bowman e setas amarelas indicam o glomérulo. Aumento 400x.

6.4 Avaliação de fibras de colágeno

A espessura da cápsula de Bowman foi medida usando a coloração de picrossirius. Por esta coloração corar em vermelho as fibras de colágeno, além da medida da espessura propriamente, é possível avaliar a deposição de fibras de colágeno na região.

Esta análise nos mostrou que os ratos SHR sedentários têm um aumento significativo na espessura da cápsula de Bowman, se comparado com os ratos WKY ($3,72 \pm 1,35 \mu\text{m}$ vs $1,98 \pm 0,25 \mu\text{m}$; SHR vs WKY sedentários). Além disso, verificamos que o TA induziu uma redução significativa desta espessura nos SHR ($3,72 \pm 1,35 \mu\text{m}$ vs $1,79 \pm 0,24 \mu\text{m}$; S0 vs T12, respectivamente), como mostrado nas figuras 13 e 14. Qualitativamente, podemos ver na figura 13 que a deposição de fibras de colágeno é um importante componente desta espessura observada.

Figura 13. Avaliação da deposição de fibras de colágeno na cápsula de Bowman em ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T2, T4, T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T2, T4, T8 e T12).

Figura 14. Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Setas indicam a espessura da cápsula de Bowman. Aumento 400x.

6.5 Avaliação de Proteoglicanos

Nesta avaliação, a espessura da cápsula de Bowman foi medida usando a técnica de reação química APS. Esta técnica revela a presença de proteoglicanos em rosa, e permite avaliar a deposição de proteoglicanos na região. Assim, estudamos esta deposição na cápsula de Bowman, e posteriormente avaliaremos esta deposição no glomérulo (por densidade de coloração), método bastante utilizado para o estudo da glomeruloesclerose.

Esta análise nos mostrou que os ratos SHR tem uma maior espessura da cápsula de Bowman, se comparados com WKY ($1,34 \pm 0,41 \mu\text{m}$ vs $0,90 \pm 0,09 \mu\text{m}$; SHR vs WKY sedentários). A análise também nos mostrou que o TA induziu uma diminuição da espessura da cápsula de Bowman nos SHR ($1,34 \pm 0,41 \mu\text{m}$ vs $0,75 \pm 0,09 \mu\text{m}$; S0 vs T12), sendo vista já a partir da 2ª semana de TA, mantendo-se até a 12ª semana. No WKY esta diminuição foi vista a partir da 8ª semana ($0,90 \pm 0,09 \mu\text{m}$ vs $0,65 \pm 0,02 \mu\text{m}$; S0 vs T12), mantendo-se até a 12ª semana de TA. Também foi visto que o tempo de sedentarismo na hipertensão também leva a um aumento na espessura da cápsula de Bowman pois, foi possível observar um aumento na espessura da cápsula de Bowman dos ratos SHR-S12, se comparados aos SHR-S0 ($1,34 \pm 0,41 \mu\text{m}$ vs $1,64 \pm 0,48 \mu\text{m}$; S0 vs S12). Estes dados são mostrados na figura 15. Qualitativamente, podemos ver na figura 16 que a deposição de proteoglicanos é um importante componente desta espessura observada.

Figura 15. Avaliação da deposição de proteoglicanos na cápsula de Bowman em ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12 em WKY, e S0 vs T2, T4, T8 e T12 em SHR; # $p \leq 0,05$ S12 vs T4, T8 e T12 em WKY, e S12 vs T2, T4, T8 e T12 em SHR; + $p \leq 0,05$ S12 vs S0).

Figura 16. Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Setas indicam a espessura da cápsula de Bowman, através da técnica de APS. Aumento 400x.

6.6 Avaliação dos marcadores inflamatórios

6.6.1 Avaliação de IL-6

Esta análise nos mostrou que os ratos SHR sedentários têm um aumento significativo na expressão de IL-6 na cápsula de Bowman e no glomérulo, se comparados com os ratos WKY (no glomérulo: $1,37 \pm 0,34$ vs $0,31 \pm 0,10$; na cápsula de Bowman $1,50 \pm 0,35$ vs $0,82 \pm 0,16$; SHR vs WKY sedentários). Além disso verificamos que o TA induziu uma redução significativa na expressão de IL-6 tanto na cápsula de Bowman, quanto no glomérulo de SHR (na cápsula de Bowman: $1,50 \pm 0,35$ vs $0,80 \pm 0,12$; no glomérulo: $1,37 \pm 0,3$ vs $0,69 \pm 0,12$; SHR-S0 vs SHR-T12, respectivamente), como mostrado nas figuras 17 e 18. Qualitativamente, podemos ver na figura 19 que IL-6 é mais expresso nos animais sedentários, se comparados aos treinados.

Figura 17. Avaliação da expressão de IL-6 na cápsula de Bowman de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8 e T12) (U.A, unidades arbitrárias).

Figura 18. Avaliação da expressão de IL-6 nos glomérulos de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8) (U.A, unidades arbitrárias).

Figura 19. Fotomicrografia representativa da expressão de IL-6 no glomérulo e na cápsula de Bowman de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Aumento 400x.

6.6.2 Avaliação de IL-1 β

Esta análise nos mostrou que os ratos SHR sedentários têm um aumento significativo na expressão de IL-1 β na cápsula de Bowman e no glomérulo, se comparados com os ratos WKY (na cápsula de Bowman $0,65 \pm 0,29$ vs $0,37 \pm 0,05$; no glomérulo: $0,77 \pm 0,17$ vs $0,15 \pm 0,08$; SHR vs WKY sedentários). Além disso verificamos que o TA induziu uma redução significativa na expressão de IL-1 β tanto na cápsula de Bowman, quanto no glomérulo de SHR (na cápsula de Bowman: $0,65 \pm 0,29$ vs $0,12 \pm 0,12$; no glomérulo: $0,77 \pm 0,17$ vs $0,47 \pm 0,14$; SHR-S0 vs SHR-T12, respectivamente), como mostrado nas figuras 20 e 21. Qualitativamente, podemos ver na figura 22 que IL-1 β é mais expresso nos animais sedentários, se comparados aos treinados.

Figura 20. Avaliação da expressão de IL-1 β na cápsula de Bowman de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T2 e T8 em WKY; * $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12 em SHR; # $p \leq 0,05$ S12 vs T2, T4 e T8 em WKY; # $p \leq 0,05$ S12 vs T8 e T12 em SHR) (U.A, unidades arbitrárias).

Figura 21. Avaliação da expressão de IL-1 β nos glomérulos de ratos WKY e SHR, no curso temporal do treinamento e sedentarismo (* $p \leq 0,05$ S0 vs T4, T8 e T12).

Figura 22. Fotomicrografia representativa da expressão de IL-6 no glomérulo e na cápsula de Bowman de WKY (esquerda) e SHR (direita), sedentários (S0 e S12) e treinados (T12). Aumento 400x.

7. Discussão

No presente estudo, foram avaliadas a capacidade física, as variáveis hemodinâmicas, a morfometria glomerular, a deposição de fibras de colágeno e a deposição de proteoglicanos na cápsulas de Bowman, e a expressão das interleucinas IL-1 β e IL-6 no glomérulo e na cápsula de Bowman de ratos hipertensos (SHR) e normotensos (WKY), submetidos ao treinamento aeróbio (TA) ou mantidos sedentários.

Em geral, a análise dos resultados mostrou que o TA levou à melhora no desempenho físico, tanto em SHR quanto em WKY, sendo que em SHR o desempenho físico foi melhor nos 3 TEM, se comparados com WKY, bem como houve uma manutenção do desempenho no WKY e redução no SHR mantidos em sedentarismo. Também foi visto uma diminuição da FC e PAM induzidas pelo TA em SHR e diminuição da FC em WKY. Chamou a atenção o efeito do TA sobre a morfologia glomerular e nos marcadores de inflamação nos animais hipertensos, que passaram a se assemelhar aos normotensos, acompanhados por uma redução nos valores pressóricos.

7.1 Desempenho Físico

Em relação ao desempenho físico podemos verificar que houve um aumento na capacidade física em SHR e WKY induzido pelo TA, visto que os SHR têm melhor desempenho físico desde o início do protocolo (semana 0). Este maior desempenho pode ser atribuído a fatores comportamentais como ansiedade (Kulikov et. al. 1997) e à fuga a estímulos aversivos

(Ramos et. al., 1997), características do SHR. O sedentarismo levou à manutenção do desempenho no WKY e redução no SHR. Este pequeno declínio de desempenho em SHR, se comparado com WKY, sugere que o sedentarismo em hipertensos pode ser mais prejudicial que para normotensos.

7.2 Avaliação da PA e FC

Em relação a PAM os resultados prévios mostram que o TA foi efetivo em reduzi-la em SHR treinados, se comparados com SHR sedentários, como visto previamente na literatura (Brum et al., 2000; Bertagnolli et al., 2006; Moraes-Silva et al., 2010). Por outro lado, WKY treinados e sedentários não tiveram alterações significativas em todo o período experimental. Não foram vistas diferenças significativas na PAS e PAD em ambos os grupos, WKY sedentários e treinados, e SHR sedentários e treinados. Cabe ressaltar que o teste de ANOVA de 2 caminhos indicou variância significativa entre sedentários e treinados. Contudo, o pós teste de Bonferroni não apontou diferença entre grupos ou tempos específicos.

Após a 1ª semana de TA já foi possível verificar bradicardia de repouso em SHR, sendo mais pronunciada na 8ª e 12ª semana. A bradicardia de repouso é um importante índice indicativo da eficácia do treinamento e já foi observado em alguns estudos tanto em machos (Brum et al., 2000; De Angelis et al., 2004; Moraes-Silva et al., 2010; Cornelissen et al., 2011), quanto em fêmeas (Irigoyen et al., 2005; Sanches et al., 2009;

Cornelissen et al., 2011). Em WKY a bradicardia de repouso foi vista na 4ª e 12ª semanas de TA.

Diversos fatores são atribuídos à bradicardia de repouso induzida pelo TA, e dentre elas temos: alterações na atividade intrínseca do nó sinoatrial, fatores hemodinâmicos e fatores neurais. A relação entre FC e nó sinoatrial, foi sugerida após observações de redução da FC intrínseca após 13 semanas de treinamento aeróbio de baixa intensidade (Negrão et al., 1992). A adaptação hemodinâmica observada após treinamento aeróbio também pode ser atribuída à melhora da eficiência contrátil do coração caracterizada pelo aumento do volume sistólico, garantindo assim a manutenção do débito cardíaco com FC menor (Clausen et al., 1977). Também pode estar relacionada a alterações do balanço simpato-vagal decorrentes do aumento do tônus parassimpático ao coração (Felix & Michelini, 2007; Higa-Taniguchi et al., 2009), e/ou da redução do tônus simpático ao coração (Gava et al., 1995).

7.3 Avaliação morfométrica glomerular

Na avaliação morfométrica foram medidas a área da cápsula de Bowman e a área do Glomérulo. As análises mostraram que o TA foi eficaz em aumentar a área da cápsula de Bowman e a área do glomérulo nos ratos SHR treinados, se comparados com os sedentários. Nos ratos WKY treinados foi observado somente aumento na área do glomérulo, se comparados com WKY sedentários. Os dados sugerem que o TA leva a um

remodelamento glomerular, reduzindo tanto a deposição de matriz como aumentando as estruturas responsáveis pela filtração sanguínea. Estas observações são mais efetivas nos SHR, onde este aumento das estruturas de filtração, especialmente o próprio glomérulo, pode estar associado à queda de PAM observada.

7.4 Avaliação da deposição de fibras de colágeno

Nossos resultados mostraram que houve uma maior deposição de fibras de colágeno em SHR sedentário, se comparado com WKY e que o TA foi eficiente em diminuir a produção de fibras de colágeno a partir da segunda semana. Segundo Lijnen (2006), a Ang II estimula a produção de colágeno em fibroblastos, porém essa produção é mediada por espécies reativas de oxigênio. Estudos também mostram que o treinamento físico é eficiente na redução do estresse oxidativo (Irigoyen et al., 2005; Bertagnolli et al., 2006; e Coelho et al., 2010), e Pereira et al. (2009) mostrou redução de ANG II cardíaca pós treinamento físico. Esse pode ser um dos mecanismos que nos explicam uma maior deposição de colágeno em SHR sedentário, já que a hipertensão aumenta a atividade do SRA e a produção de espécies reativas de oxigênio, e o TA leva a uma diminuição significativa destas variáveis, induzindo a redução na produção de fibras de colágeno.

7.5 Avaliação da deposição de proteoglicanos

A deposição de proteoglicanos na cápsula de Bowman segue um padrão semelhante ao da deposição de fibras colágenas, e talvez esta também ocorra por ação do SRA e de outros fatores mediados pela própria hipertensão.

7.6 Avaliação da expressão de marcadores inflamatórios

Nossos resultados mostraram que houve uma maior expressão de IL-1 β e IL-6 em SHR sedentário, se comparado com WKY e que o TA foi eficiente em diminuir a expressão desses marcadores inflamatórios tanto na cápsula de Bowman, quanto no glomérulo.

Segundo Das (2004), em relação aos mecanismos anti-inflamatórios induzidos pelo TA, é importante notar que o estímulo inicial para o aumento na geração de citocinas anti-inflamatórias, assim como, ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO) e superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) é o aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias como, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . O exercício causa liberação de citocinas pro-inflamatórias que, em resposta, desencadeia a ativação de Mn-SOD e a produção de citocinas anti-inflamatórias como, IL-10, antagonista do receptor de IL-1, e TGF- β . A fonte produtora dessas citocinas inflamatórias são os leucócitos do sangue periférico e o músculo esquelético. Parece que inicialmente é produzido o TNF- α e IL-1 β pelos leucócitos do sangue periférico e músculo.

Após, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ estimulam a produção de IL-6 no músculo e fígado. O objetivo primário dessas citocinas pro-inflamatórias é regular a migração de monócitos e macrófagos para a área de injúria e iniciar o reparo. Citocinas anti-inflamatórias como IL-10 , IL-4 e $\text{TGF-}\beta$ são produzidas para restringir a magnitude da inflamação, e as citocinas pro-inflamatórias estimulam a produção de Mn-SOD em vários tecidos, em especial o miocárdio, que catalisa a produção de NO endotelial no tecido arterial, prevenindo danos no miocárdio e aterosclerose. Níveis plasmáticos de PCR e IL-6 são significativamente elevados em indivíduos com resistência à insulina, aterosclerose e hipertensão, sendo preditores de risco para futura isquemia, infarto do miocárdio e morte relacionada a fatores cardiovasculares e não-cardiovasculares.

8. Conclusão

Podemos concluir que a hipertensão arterial leva a um aumento na deposição tanto de fibras de colágeno na cápsula de Bowman, podendo estar caracterizando uma fibrose renal, quanto a aumentos na deposição de proteoglicanos, também na cápsula de Bowman, normalmente associada à glomeruloesclerose. A hipertensão arterial também leva a um aumento da expressão de IL-1 β e IL-6, tanto na cápsula de Bowman quanto no glomérulo. Os dados indicam que o TA induziu um remodelamento glomerular benéfico, diminuindo a deposição de fibras de colágeno e proteoglicanos na cápsula de Bowman, diminuiu a expressão de IL-1 β e IL-6 tanto no glomérulo quanto na cápsula de Bowman de hipertensos e aumentou o tamanho das estruturas responsáveis pela filtração do sangue como, a cápsula de Bowman e o glomérulo, e que o tempo de sedentarismo na hipertensão pode ser um agravante neste quadro.

A redução na deposição de fibras de colágeno, proteoglicanos, IL-1 β e IL-6 na cápsula de Bowman e no glomérulo, e o aumento do tamanho da cápsula de Bowman e do glomérulo propriamente dito, observado nos SHR treinados, pode estar associada à queda de PAM observada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. Visão Morfofuncional do Rim. In: **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AMARAL, S. L.; SILVEIRA, N. P.; ZORN, T. M. T.; MICHELINI, L. C.

Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension** , v. 19, p.931 – 940, 2001.

BAI, Y.; SIGALA, W.; ADAMS, G.R.; VAZIRI, N.D. Effect of Exercise on Cardiac Tissue Oxidative and Inflammatory Mediators in Chronic Kidney Disease. **Am J Nephrol.**, v.29, p.213–221, 2009.

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

BOYER, J.; KASCH, F. Exercises therapy in hypertensive men. **J Am. Med. Assoc.**, v. 211, p. 1668-1671, 1970.

BRUM, P.C.; DA SILVA, G.J.J.; MOREIRA, E.D.; FUMIO IDA, F.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise Training Increases Baroreceptor Gain Sensitivity in Normal and Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 36, p. 1018-1022, 2000.

CACHOFEIRO, V.; GOICOCHEA, M.; VINUESA, S.G.; OUBIÑA, P.; LAHERA, V.; LUÑO, J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney International**., v. 74 (Suppl 111), p.S4–S9, 2008.

CAMPESE, V.M.; MITRA, N.; SANDEE, D. Hypertension in renal parenchymal disease: Why is it so resistant to treatment? **Kidney International**., v.69, p. 967–973, 2006.

CHO, K.H.; KIM, H.J.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; VAZIRI, N.D. Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol**., v. 297, p.106-113, 2009.

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.; WHIGHT, J.T.JR.; ROCCELLA, E.J. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **Hipertension**., v.42, p. 1206-1252, 2003.

CLAUSEN JP. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. **Physiol Rev.**, v. 57(4), p. 779-815, 1977.

COELHO, B.L.P., ROCHA, L.G.C., SCARABELOT, K.S., SCHEFFER, D.L., RONSANI, M.M., SILVEIRA, P.C.L., SILVA, L.A., SOUZA, C.T., PINHO, R.A. Physical Exercise Prevents the Exacerbation of Oxidative Stress Parameters in Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20(3), p. 169–175, 2010.

CORNELISSEN, V.A., GOETSCHALCKX, K., VERHEYDEN, B., AUBERT, A.E., ARNOUT, J., PERSU, A., RADEMAKERS, F., FAGARD, R.H. Effect of endurance training on blood pressure regulation, biomarkers and the heart in subjects at a higher age. **Scand J Med Sci Sports**, V. 21(4), p. 526–534, 2011.

DAS, U.N.; Anti-Inflammatory Nature of Exercise. *Nutrition* V. 20(3), p. 323-326, 2004.

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

EDWARDS, K.M.; ZIEGLERB, M.G.; MILLSA, P.J. The potential antiinflammatory benefits of improving physical fitness in hypertension. **Journal of Hypertension.**, v. 25, p.1533–1542, 2007.

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

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

FRANÇA, T.R.; MICHELINI, L.C. Alterações da reatividade vascular do trem posterior durante e após exercício dinâmico: efeitos da hipertensão e do treinamento físico. **J. Hipertens.**, v. 37, p. 1009, 2001.

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

GUYTON AC; COLEMAN TG; BOWER JD; GRANGER HJ. Circulatory control in hypertension. **Circ Res.**, v.26, p.135-147, 1970.

GUYTON, C. A.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; FELIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. **Exp Physiol.**, V. 94.11, p. 1103–1113, 2009.

HJELSTUEN A; ANDERSSSEN S. A; HOLME I; SELJEFLOT I; KLEMSDAL TO. Markers of Inflammation Are Inversely Related to Physical Activity and Fitness in Sedentary Men With Treated Hypertension. **AJH.**, v.19, p.669–675, 2006.

HONG S.; JOHNSON TA, FARAG NH, GUY HJ, MATTHEWS SC, ZIEGLER MG, ET AL. Attenuation of T-lymphocyte demargination and adhesion molecule expression in response to moderate exercise in physically fit individuals. **J Appl Physiol.**, v.98, p.1057–1063, 2005.

IRIGOYEN M. C.; LACCHINI S; DE ANGELIS K; PEREIRA AC; KRIEGER JE; KRIEGER, E.M. Fisiopatologia da hipertensão arterial. In: **tratado de Cardiologia SOCESP**. CV Serrano Jr., A Timerman, E Stefanini Eds., Ed Manole, 2a edição, 2009.

IRIGOYEN, M.C., PAULINI, J., FLORES, L.J.F., FLUES, K., BERTAGNOLLI, M., MOREIRA, E.D., CONSOLIM-COLOMBO, F., BELLÓ-KLEIN, A., DE ANGELIS, K. Exercise Training Improves Baroreflex Sensitivity Associated With Oxidative Stress Reduction in Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 46, p. 998-1003, 2005.

KRIEGER, J.E.; DZAU, V. Molecular biology of hypertension. **Hypertension**., v.8, 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. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 281, p. 775-784, 1997

LACCHINI, S. 2000 Regulação da pressão arterial na normotensão: papel dos nervos renais e do sódio. Dissertação de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia, do Departamento de Fisiologia – ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

LIAO T-D, X-P YANG, LIU Y-H, SHESELY EG, CAVASIN MA, KUZIEL WA, PAGANO PJ, CARRETERO OA. Role of inflammation in the development of

renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension.

Hypertension, v. 52, p.256 –263, 2008.

LIJNEN, P.; PAPPARELLA, I.; PETROV, V.; SEMPLICINI, A.; FAGARD, R. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. **Journal of Hypertension**, v. 24, p. 757–766, 2006

LIU JL, IRVINE S, REID IA, PATEL KP, ZUCKER IH. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: A role for angiotensin II. **Circulation.**, v.10; 102(15), p1854-1862, 2000.

LJUTIC´, D.; KES, P.. The role of arterial hypertension in the progression of non-diabetic glomerular diseases. **Nephrol Dial Transplant.**, v.18 [Suppl 5]: p.28–30, 2003.

MANCIA, G.; GRASSI, G. Antihypertensive treatment: past, present and future. **J. Hipertens.**, v. 16, p. S1-7, 1998.

MARTÍNEZ-MALDONADO M. Role of hypertension in the progression of chronic renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.16. Suppl 1: p.63-66, 2001.

MASCHIO G, OLDRIZZI L, MARCANTONI C, RUGIU C. Hypertension and progression of renal disease. **J Nephrol.**, v.13(3): p.225-7, 2000.

MATOS, L.D.N.J.; TROMBETTA, I.C.; NEGRÃO, C.E. Sedentarismo e Benefícios da Atividade Física. in: **Tratado de Cardiologia Socesp**. C.V. SERRANO; A. TIMERMAN; E. STEFANINI. 2ª Ed. São Paulo: Manole. Cap. 2, p. 517-526, 2009.

MELO, R. M.; MARTINHO JR, E.; MICHELINI, L. C. Training-Induced, Pressure-Lowering Effect in SHR: Wide Effects on Circulatory Profile of Exercised and Nonexercised Muscles. **Hypertension**, v. 42, p. 851-857, 2003.

MORAES-SILVA, I.C., DE LA FUENTE, R.N., MOSTARDA, C., ROSA, K., FLUES, K., DAMACENO-RODRIGUES, N.R., CALDINI, E.G., DE ANGELIS, K., KRIEGER, E.M., IRIGOYEN, M.C. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 37(3), p. 114-120, 2010.

MORILLAS, P.; ANDRADE, H.; CASTILLO, J.; QUILES, J.; BERTOMEU-GONZÁLEZ, V.; CORDERO, A.; TARAZÓN, E.; ROSELLÓ, E.; PORTOLÉS, M.; RIVERA, M.; AND BERTOMEU-MARTÍNEZ, V. Inflammation and Apoptosis in Hypertension. Relevance of the Extent of Target Organ Damage. **Rev Esp Cardiol.** v. 65(9), p. 819–825, 2012.

MOUSA, T.M., LIU, D., CORNISH, K.G., ZUCKER, I.H. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **J Appl Physiol.**, v.104(3), p.616-624, 2008.

MUNTNER, P.H.E.J.; ROCCELA, E.J.; WHELTON, P.K. The impact of JNCVI guidelines on treatment recommendations in the us population. **Hipertension.** V.39, p. 897-902, 2002.

NAVARRO-DÍAZ, M.; SERRA, A.; LÓPEZ, D.; GRANADA, M.; BAYÉ S, B.; ROMERO, R. Obesity, inflammation, and kidney disease. **Kidney International.**, v.74 (Suppl 111), p. S15–S18, 2008.

NEGRÃO, C.E.; MIDDLEKAUFF. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, na baroreflex control. **J Appl Physiol.** V.104, p. 577-578, 2008.

NEGRAO, C.E., MOREIRA E.D., SANTOS M.C., FARAH V.M., KRIEGER E.M. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol.**, v. 72(5), p. 1749-1753, 1992.

PEREIRA, M.G., FERREIRA, J.C.B., BUENO JR, C.R., MATTOS, K.C., ROSA, K.T., IRIGOYEN, M.C., OLIVEIRA, E.M., KRIEGER, J.E., BRUM, P.C. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents

cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. **Eur J Appl Physiol.**, v. 105, p. 843–850, 2009.

PESCATELLO, L.S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W.B.; KELLY, G.A.; RAY, C.A. American college of sports medicine position stand exercises and hypertension. **Med. Sci . Sports Exerc.**, v. 36, p. 533-553, 2004.

PONNUCHAMY, B.; KHALIL, R.A. Cellular mediators of renal vascular dysfunction in hypertension. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.**, v. 296, p.1001-1018, 2009.

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

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPÉREZ, M. *et al.* Role of the renin angiotensin system in vascular disease – expanding the field. **Hypertension**, v. 38, p. 1382-1387, 2001.

SANCHES, I.C., SARTORI, M., JORGE, L., IRIGOYEN, M.C., DE ANGELIS, K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 942-948, 2009.

SOUZA-OLIVEIRA, T.C.; VIEGAS, K.A.S.; RABECHI, N.B.; ALBALOUREIRO, T.C.; SOUZA, L.E.; LIMA, C.T.; CURI, R.; IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S. Angiotensin II has a proinflammatory effect on cardiac vessels without hemodynamic alterations. **Journal of Renin-Angiotensin System** (*submetido para publicação*).

TAAL MW, BRENNER BM. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. **Kidney Int.**, v.57(5), p.1803-1817, 2000.

TAUBMAN, M.B. Angiotensin II – a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. **Circ. Research**, v. 92, p. 9-11, 2003.

VAN DER ZEE, S.; BABER, U.; ELMARIAH,S.; WINSTON, J.; FUSTER, V. Cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 6, p. 580–589, 2009.

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

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2^a ed. São Paulo: Manole, 2001.

WOLF, G.; BUTZMANN, U.; WENZEL, U.O. The rennin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. ***Nephron Physiology***, v. 93, p. 3-13, 2003 .

ZANCHETTI, A. Guidelines for management of hypertension: the world health organization international Society of hypertension view. **J. Hipertens.**, v. 13, Suppl. S, p. s119-s122, 1995.

ZHANG, H.; PARK, Y.; WU, J.; CHEN, X.; LEE, S.; YANG, J.; DELLSPERGER, K.C.; ZHANG, C. Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clin Sci**. v.116(3), p.219-230, Feb. 2009.