

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA**

VANESSA BRITO CÂNDIDO

**Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a
funcionalidade da barreira hematoencefálica em núcleos de
controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte
paracelular e transcelular**

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

SÃO PAULO
2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA**

VANESSA BRITO CÂNDIDO

**Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a
funcionalidade da barreira hematoencefálica em núcleos de
controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte
paracelular e transcelular**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana.

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

Versão Original

SÃO PAULO
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Brito Cândido, Vanessa

Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a funcionalidade da barreira hematoencefálica em núcleos de controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte paracelular e transcelular / Vanessa Brito Cândido; orientador Prof^a Dr^a Lisete Compagno Michelini. -- São Paulo, 2021.

85 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipertensão. 2. Treinamento aeróbio. 3. Barreira hematoencefálica. 4. Transcitose. 5. Transporte Paracelular. I. Compagno Michelini, Prof^a Dr^a Lisete, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Brito Cândido.

Titulo da Tese: Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a funcionalidade da barreira hematoencefálica em núcleos de controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte paracelular e transcelular.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Amando de Salles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-900
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a integridade da barreira hematoencefálica em áreas de controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte parcelular e transcelular*", registrado sob o protocolo nº **93/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/08/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Lisete Compagno Michelini**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Vanessa Cândido Abreu (Pós-graduando), Alisson Colquhoun (Pesquisador colaborador), Alexandre Ceroni (Especialista de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effects of hypertension and aerobic training on the integrity of the blood-brain barrier in autonomic areas: Mechanisms involved in paracellular and transcellular transport*", protocol nº **93/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/8/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Lisete Compagno Michelini**

- Team members: *Vanessa Cândido Abreu (Graduate Student), Alisson Colquhoun (Colaborator Researcher), Alexandre Ceroni (Laboratory Technician).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	SHR	Macho/male	3 meses/months	110
	Wistar	Macho/male	3 meses/months	110

São Paulo, 09 de agosto de 2017.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-900
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.045.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 93/2017/CEUA, aprovado em 08/08/2017, relativo ao projeto intitulado "*Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a integridade da barreira hematoencefálica em áreas de controle autônomo: Mecanismos envolvidos no transporte paracelular e transcelular*", de responsabilidade da Profa. Dra. **Lisete Compagno Michelini**, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, aprovo a seguinte metodologia, conforme detalhamento da solicitação:

- Retirada do coração dos animais para cálculo da hipertrofia cardíaca.

São Paulo, 02 de abril de 2018


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais Vanusa e Nilton, a minha avó Malvina e minha tia Elaine, minha irmã Amanda, ao meu esposo Luiz Fernando e às minhas sobrinhas Emanuely e Lara.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por permitir e abençoar minha trajetória durante mais uma etapa da minha vida. Agradeço a toda minha família e em especial aos meus pais Nilton José Cândido e Vanusa Brito Cândido, a minha avó Malvina Cândido e minha tia Elaine Cândido, pelo incentivo ao estudo, pela confiança e pelo imenso amor, sempre me ensinando que o conhecimento era uma das mais importantes coisas pelas quais eu deveria lutar em minha vida. Assim como sou muito grata pela vida das minhas sobrinhas, Emanuely e Lara que alegram imensamente minha vida e a todo apoio da minha irmã Amanda. Agradeço ao meu esposo Luiz Fernando Bigoto pela amizade, pelo amor, compreensão e todo incentivo, sempre acreditando e tornando os momentos mais difíceis da minha vida, mais suaves. Também agradeço a minha orientadora Lisete Compagno Michelini pela oportunidade, confiança, pela cuidadosa orientação e pelos ensinamentos que certamente contribuíram para minha formação. E ao técnico do laboratório Alexandre Ceroni pela ajuda com as cirurgias e pelo aprendizado de outros processos laboratoriais.

Ao professor Martin Andreas Metzger por disponibilizar atenciosamente o seu laboratório e microscópio e à técnica do laboratório Ana Maria Peracoli Campos (Aninha) por me ensinar a técnica de imunofluorescência com tanta dedicação.

Ao professor Vagner Roberto Antunes, por também disponibilizar o seu laboratório e equipamentos.

Às minhas colegas de laboratório, Sany Pérego e Hiviny Ataídes pela ajuda durante os experimentos, conversas e desabafos que tornaram mais fácil a caminhada.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, que mesmo longe, sempre estão torcendo por mim e me esperando, toda vez que volto a minha terra amada, o Espírito Santo.

E não poderia deixar de ser grata a todos os professores que participaram do meu ensino de modo geral. Sou muito grata a cada um, a cada aula e ensinamento!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) – Processo número 149265/2017-4, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) – Processo número 2018/14544-6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”
(Albert Einstein).*

RESUMO

CÂNDIDO, V. B. **Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a funcionalidade da barreira hematoencefálica em núcleos de controle autonômico: Mecanismos envolvidos no transporte paracelular e transcelular.** 2021. 85 páginas. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Sabe-se que a hipertensão arterial cursa com disfunção autonômica, hipertonia simpática e importante hiperatividade do sistema renina angiotensina plasmático e tecidual, e que esses déficits podem ser corrigidos/reduzidos pelo treinamento físico. Trabalhos recentes demonstraram haver em hipertensos crônicos lesão da barreira hematoencefálica (BHE) em áreas de controle autonômico, com acesso da angiotensina II plasmática ao parênquima cerebral, o que comprometia ainda mais a disfunção autonômica, e que o treinamento físico também melhorava a funcionalidade da BHE. Os mecanismos pelos quais a hipertensão prejudica o funcionamento da BHE, ainda não estão totalmente esclarecidos e praticamente nada se sabe sobre os mecanismos que corrigem a função de barreira em hipertensos treinados. No presente trabalho objetivamos avaliar em SHR e seus controles normotensos os efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a funcionalidade da BHE, analisando a ultraestrutura de capilares encefálicos dos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN), trato solitário (NTS) e região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), com especial ênfase nas vias de transporte transcelular e paracelular através do endotélio vascular. Ratos SHR e Wistar foram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio (T=50-60% da capacidade máxima, 1 hora/dia, 5 dias/semana) ou mantidos sedentários (S) por 4 semanas e cronicamente canulados para a avaliação de parâmetros hemodinâmicos/autonômicos. A permeabilidade da BHE foi avaliada pela microscopia de fluorescência após a administração intra-arterial de corantes fluorescentes de alto e baixo peso molecular e sua integridade/lesão pela microscopia eletrônica de transmissão em cortes transversais ultrafinos dos capilares encefálicos. SHR-S vs Wistar-S apresentavam elevada PA média e FC basais, aumento da variabilidade da PA sistólica, reduzida variabilidade da FC e do barorreflexo espontâneo, elevado extravasamento do corante de baixo peso molecular, indicativo do aumento da permeabilidade da BHE, acompanhadas nas 3 áreas autonômicas por aumento significativo do número de vesículas transcitóticas, mas sem alteração da expressão das junções oclusivas que limitam o transporte paracelular. Por sua vez o treinamento determinou nos SHR-T bradicardia de repouso, queda parcial da PA média, redução da variabilidade da PAS e aumento da variabilidade da FC com

melhora substancial no controle autonômico da circulação, acompanhados nas 3 áreas autonômicas de normalização da permeabilidade da BHE e redução significativa do número de vesículas transcitóticas nos capilares encefálicos, cujos valores foram similares aos apresentados pelos grupos normotensos. Ambos os grupos treinados apresentaram aumentos significativos na extensão das junções oclusivas que passaram a ocupar uma porcentagem maior da borda de contato entre 2 células endoteliais. Alterações na transcitose induzidas pela hipertensão e treinamento aeróbio foram confirmadas por alterações similares na expressão de caveolina-1, um dos principais constituintes das vesículas transcelulares. Observou-se no PVN, NTS e RVLM forte correlação positiva entre o número de vesículas transcitóticas e a permeabilidade da BHE. Adicionalmente, a permeabilidade da BHE correlacionava-se positivamente com a variabilidade da PA sistólica e negativamente com a variabilidade da FC. Nossos dados indicam que a perda da funcionalidade da BHE na hipertensão é devida ao aumento da transcitose vesicular, sem alteração do transporte paracelular. Indicam também que o treinamento melhora o controle autonômico da circulação de hipertensos por normalizar a transcitose, com ganho adicional na resistência das junções oclusivas.

Palavras-chave: Hipertensão. Treinamento aeróbio. Barreira hematoencefálica. Transcitose. Transporte Paracelular.

ABSTRACT

CÂNDIDO, V. Effects of hypertension and aerobic training on blood-brain barrier functionality in nuclei of autonomic control: Mechanisms involved in paracellular and transcellular transport. 2021. 85 p. Thesis (Ph. D thesis in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

It is well known that arterial hypertension courses with autonomic dysfunction, sympathetic hypertonia, plasma and tissue hyperactivity of the renin angiotensin system. It is also known that exercise training was able to correct/reduce these abnormalities. Recent studies demonstrated the presence of blood-brain barrier (BBB) lesion within autonomic nuclei with access of plasma angiotensin II into brain parenchyma, which augments autonomic impairment and that exercise training is able to improve BBB functionality. The mechanisms conditioning hypertension-induced BBB lesion are still controversial and nothing is known concerning the mechanisms determining training-induced restoration of BBB function. In the present study we aimed to evaluate in SHR and normotensive controls the effects of hypertension and exercise training on BBB function within capillaries of the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), nucleus of the solitary tract (NTS) and rostroventrolateral medulla (RVLM), with focus on the transcellular and paracellular transports across the endothelium. SHR and Wistar rats were submitted to aerobic training (T=50-60% of maximal aerobic capacity, 1hour/day, 5 days/week) or kept sedentary (S) for 4 weeks. At the end of protocols rats were cannulated for hemodynamic/autonomic evaluation. BBB permeability was analyzed by fluorescence microscopy after intra-arterial administration of 2 fluorescent dyes of high and low molecular weight; the BBB lesion/integrity was evaluated by transmission electron microscopy in transverse ultrathin slices of brain capillaries. SHR-S vs Wistar-S exhibited high mean AP and HR, increased systolic AP variability, reduced HR variability and spontaneous baroreflex sensitivity and increased BBB leakage of the low molecular weight dye. These responses were accompanied by a significant increase of transcytotic vesicles number without changes in the expression of tight junctions that limited the transcellular transport. On the other hand, aerobic training caused in SHR-T resting bradycardia, partial mean AP fall, reduction of systolic AP variability, and increase in HR variability, with great improvement of autonomic control of the circulation that were accompanied by normalization of BBB permeability and significant reduction of transcytotic vesicles

number in the 3 autonomic areas. Both trained groups exhibited marked increase in tight junctions' extension, which occupied a larger percentage of capillary border within 2 endothelial cells. Hypertension- and training-induced transcytosis were confirmed by similar changes in caveolin-1 expression, the main constituent of transcellular vesicles. There were strong positive correlations between the number of transcytotic vesicles and the BBB permeability within the PVN, NTS and RVLM. In addition, the BBB permeability was positively correlated with Systolic AP and negatively correlated with HR variability. Our data indicated that BBB dysfunction in hypertension is due to an increased transcytosis without changes in the paracellular pathway. Exercise training ameliorates SHR's autonomic control by normalizing transcytosis, with an additional improvement on tight junctions' tightness.

Keywords: Hypertension. Aerobic Training. Blood-brain barrier. Transcytosis. Paracellular transport.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes passos do processo de quantificação do extravasamento de FITC. **a-** PVN com filtro para Rodamina; **b-** PVN com filtro para o FITC; **c-** imagem binária para a Rodamina; **d-** imagem binária para o FITC; **e-** colocalização da Rodamina e FITC (imagem em 32 bits), o vermelho corresponde à Rodamina, o verde ao FITC e o branco à colocalização dos dois corantes; **f-** colocalização de Rodamina e FITC (imagem em 8 bits); **g-** resultado da subtração das imagens colocalizada de FITC 8 bits; **h-** resultado da porcentagem de área extravasada pelo FITC.....34

Figura 2 - Evolução do desempenho em esteira (km/h) dos SHR e Wistar submetidos aos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) durante as 4 semanas experimentais. n = 20-22 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Semana 0, † vs. T, # vs. Wistar.....40

Figura 3 - Evolução do peso corporal dos grupos SHR e Wistar, treinados (T) e sedentários (S) entre as semanas 0 e 4. n = 20-22 ratos/grupo Significâncias (P <0,05) * vs. Semana 0, † vs. Wistar-T, # vs. Wistar.....40

Figura 4 - Comparação dos valores de pressão arterial média (A, PAM), frequência cardíaca (B, FC), variabilidade da pressão arterial sistólica (C, PAS) e variabilidade do intervalo de pulso (D, IP) ao final dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) nos grupos Wistar e SHR. n = 18-20 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.....41

Figura 5 – (A) Fotomicrografias obtidas em 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do PVN (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. 3V, terceiro ventrículo cerebral. (B) Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no PVN. (barra de calibração = 50µm). n = 7 a 9 cortes/rato, 4 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.....44

Figura 6 – (A) Fotomicrografias obtidas de 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do NTS (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. (B) Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no NTS. (barra de calibração = 50µm). n = 7 a 10 cortes/rato, 4 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.....45

Figura 7 – (A) Fotomicrografias obtidas de 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do RVLN (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. (B) Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no RVLN. (barra de calibração = 50µm). n = 5 a 7 cortes/rato, 3-4 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.....46

Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de um capilar do PVN de um SHR-T em diferentes aumentos. À *direita*, em menor aumento o capilar em corte transversal (barra de calibração = 1µm) mostrando a presença da junção oclusiva (região mais escura, correspondente ao depósito de material eletrodense) que ocupa todo o espaçamento entre as bordas de 2 células endoteliais, as quais se apoiam na membrana basal. À *esquerda*, em maior aumento (barra de calibração = 500 nm) detalha a célula endotelial mostrando internamente algumas vesículas/cavéolas de transporte transendotelial.....47

Figura 9 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no PVN. (A) Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. (B) Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar † vs. S.....50

Figura 10- Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação da borda entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do PVN. (A) Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). (B) Comparação da porcentagem de ocupação da borda celular pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25/30 capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar † vs. S.....51

Figura 11 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no NTS. (A) Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. (B) Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar † vs. S.....53

Figura 12- Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação da borda entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do NTS. (A) Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). (B) Comparação da porcentagem de ocupação da borda celular pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25/30 capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar † vs. S.....54

Figura 13 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no RVLM. (A) Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. (B) Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar † vs. S.....56

Figura 14 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação da borda entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do RVLM. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). **(B)** Comparação da porcentagem de ocupação da borda celular pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25/30 capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo.....57

Figura 15 - Comparação da porcentagem de cobertura pelos pericitos em capilares do PVN, NTS e RVLM nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25/30 capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significância ($P < 0,05$) † vs. S.....58

Figura 16 - **(A)** Fotomicrografias do PVN obtidas de ratos representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a expressão de caveolina-1 (verde) nos capilares do PVN (RECA-1, vermelho) e a colocação de ambas (amarelo). Barra de calibração = 50µm, 3V, terceiro ventrículo cerebral. **(B)** Comparação da densidade integrada de caveolina-1 no PVN dos grupos 4 experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 5-7 cortes/rato, 5-7 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar, † vs S.....59

Figura 17 - Equações de regressão linear correlacionando no PVN o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral **(A)** e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, **B**) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, **C**). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 6. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$60

Figura 18 - Equações de regressão linear correlacionando no NTS o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral **(A)** e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, **B**) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, **C**). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 6. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$62

Figura 19 - Equações de regressão linear correlacionando no RVLM o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral **(A)** e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, **B**) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, **C**). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 6. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$63

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1 - Listagem das velocidades/tempos utilizados nos testes de esforço máximo.....	30
Tabela 2 - Variabilidade da PAS e IP e seus componentes espectrais de muito baixa (VLF), baixa (LF) e alta (HF) frequência.....	43
Tabela 3 - Comparação do percentual de extravasamento do FITC-10 kDa no PVN, NTS e RVLM dos 4 grupos experimentais.....	45
Tabela 4 – Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do PVN nos 4 grupos experimentais.....	48
Tabela 5 - Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do NTS nos 4 grupos experimentais.....	52
Tabela 6 - Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do RVLM nos 4 grupos experimentais.....	55
Tabela 7 - Coeficientes de correlação (r), valores de P e equações de regressão linear correlacionando para a 3 áreas estudadas as alterações induzidas pela hipertensão e treinamento aeróbio sobre o número de vesículas transcitóticas e o extravasamento do FITC-10kDa e sobre o extravasamento do FITC e as variabilidades da pressão arterial sistólica (Var. PAS) intervalo de pulso (Var. IP).....	61
Quadro 1 - Modelo representativo das estruturas que formam a barreira hematoencefálica e estrutura da junção oclusiva em maior aumento. Reproduzido de Keaney & Campbell, 2015.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V - terceiro ventrículo
ANGII - angiotensina II
AT1- receptor de angiotensina II do tipo 1
AVC - acidente vascular cerebral
BHE - barreira hematoencefálica
DEMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECA – enzima conversora de angiotensina
EPM - erro padrão da média
FC - frequência cardíaca
FITC - isotiocianato de fluoresceína dextran
HA- hipertensão arterial
HF - componente de alta frequência da análise espectral
IP - intervalo de pulso
JO – junção oclusiva
KPBS – Tampão fosfato de potássio
LF - componente de baixa frequência da análise espectral
MB – membrana basal
NTS - núcleo do trato solitário
PA - pressão arterial
PAM - pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PBS - tampão fosfato de sódio
PC – peso do coração
PFA - paraformaldeído
PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo
ROD - rodamina dextran
RVLM - bulbo rostro-ventrolateral
SHR - ratos espontaneamente hipertensos
SHR-S - ratos espontaneamente hipertensos sedentários
SHR-T - ratos espontaneamente hipertensos treinados
SNC - sistema nervoso central
SNS - sistema nervoso simpático
SRA - sistema renina angiotensina
TEM - teste de esforço máximo
TF - treinamento físico
VE – ventrículo esquerdo
VLF - componente de frequência muito baixa da análise espectral

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1 Hipertensão arterial	21
1.2 Controle neural da circulação	21
1.3 Barreira hematoencefálica na hipertensão arterial	22
1.4 Treinamento aeróbio, hipertensão arterial e BHE	25
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais e aprovação do Comitê de Ética	29
3.2 Avaliação da capacidade aeróbia máxima	29
3.3 Protocolo de treinamento aeróbio e sedentarismo	30
3.4 Canulação arterial	30
<i>3.4.1 Confeção das cânulas</i>	30
<i>3.4.2 Procedimento cirúrgico</i>	30
3.5 Mensuração da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais	31
3.6 Análise espectral dos parâmetros cardiovasculares	31
3.7 Injeção intravascular de corantes fluorescentes e análise da integridade da BHE	32
3.8 Quantificação digital da permeabilidade da BHE	32
3.9 Obtenção do tecido cerebral e técnica para análise ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão	35
3.10 Análise ultraestrutural dos capilares pela microscopia eletrônica de transmissão	35
<i>3.10.1 Perímetro luminal e abluminal, área do capilar endotelial e diâmetro da luz vascular</i>	36
<i>3.10.2 Espessura da membrana basal (MB)</i>	36
<i>3.10.3 Contagem das vesículas luminais, abluminais e totais</i>	36
<i>3.10.4 Análise das junções oclusivas (JO)</i>	36
<i>3.10.5 Quantificação da cobertura do capilar pelos pericitos</i>	36
3.11 Ensaios de Imunofluorescência	36
<i>3.11.1 Obtenção dos tecidos encefálicos</i>	36
<i>3.11.2 Protocolo de imunofluorescência</i>	37
<i>3.11.3 Análise histológica</i>	37

3.12 Razão do peso ventricular pelo peso corporal (PVE/PC)	38
3.13 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Eficácia do treinamento	39
4.2 Evolução do peso corporal	39
4.3 Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a hemodinâmica basal, variabilidade da PAS e IP e seus componentes espectrais	41
4.4 Razão do peso ventrículo esquerdo/peso corporal	43
4.5 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a permeabilidade da BHE no PVN, NTS e RVLM	43
4.6 Análise ultraestrutural da BHE pela microscopia eletrônica de transmissão	47
4.7 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de caveolina-1 no PVN	58
4.8 Correlações entre o extravasamento do FITC-10kDa, vesículas transcelulares e parâmetros autonômicos	59
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	76

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Hipertensão arterial

A pressão arterial (PA), definida como a força exercida pelo sangue sobre as paredes arteriais, é condicionada por alterações da capacitância e retorno venoso, do débito cardíaco e da resistência periférica os quais movimentam o sangue através do sistema cardiovascular determinando momento a momento o conteúdo de sangue presente em cada segmento vascular (CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; MICHELINI, 2012; IRIGOYEN). É de fundamental importância para a perfusão adequada de todos os tecidos corporais que a PA seja mantida em níveis relativamente constantes ao longo da vida do indivíduo.

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada pela manutenção de níveis pressóricos elevados da PA ($\geq 140/90$ mmHg para a PA sistólica/diastólica, BARROSO et al., 2020). Constitui-se em um dos mais frequentes problemas de saúde pública, sendo o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares e a elevada mortalidade em todo mundo, uma vez que a hipertensão crônica se encontra intimamente relacionada a eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica, doença renal crônica entre outros (ARQUIVO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA, 2016; BASU; MILLETT, 2013; JIA et al., 2014). Várias são as etiologias da hipertensão arterial, usualmente classificadas em hipertensão primária (de causa não identificada e de maior incidência, englobando cerca de 90-95% dos hipertensos) e hipertensão secundária (cujas causas são conhecidas, mas de incidência bastante reduzida). Evidências experimentais têm indicado que a hipertensão primária cursa com um importante componente neuro-hormonal, apresentando hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA) e desequilíbrio no controle autonômico da circulação, com predominância do tônus simpático ao coração e vasos em detrimento da atividade parassimpática ao coração (CAMPOS et al., 2001; CHAAR et al., 2015; CERONI et al., 2009; FARACO; IADECOLA, 2013; FERRARIO, 1990; MASSON et al., 2014, 2015; OSBORN; ENGLAND, 1990).

1.2 Controle neural da circulação

Várias são as áreas encefálicas envolvidas com o controle autonômico da circulação. A geração do tônus simpático e parassimpático envolve a atividade coordenada entre vias aferentes que carregam informações de receptores periféricos ao núcleo do trato solitário (NTS) e deste ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e vias eferentes que se

projetam do hipotálamo a várias áreas do tronco cerebral, incluindo entre elas o próprio NTS, a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), onde se localizam os corpos celulares dos neurônios pré-motores simpáticos e os núcleos ambíguo e dorsal motor do vago, onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI; STERN, 2009; MICHELINI, 2012; IRIGOYEN et al., 2001).

Diferentes fatores podem condicionar a hipertonia simpática na hipertensão. Entre eles o ‘upregulation’ do eixo Ang II-ECA-Receptor AT₁ do SRA cerebral com aumento da disponibilidade da angiotensina II (Ang II) e concomitante ativação do estresse oxidativo, das citocinas pró-inflamatórias os quais direta ou indiretamente aumentam a atividade de neurônios pré-motores simpáticos e conseqüentemente o tônus simpático à periferia (CHAAR et al., 2015; DiBONA, 2004; MASSON et al., 2014, 2015; PATON et al., 2007; SHI et al., 2010; ZUBCEVIC et al., 2011). Também a Ang II circulante, agindo em regiões desprovidas da BHE (órgãos circunventriculares), pode contribuir para o aumento da atividade simpática periférica. Além destes efeitos do SRA plasmático e tecidual, o grupo de Stern e cols (BIANCARDI et al., 2014) identificou em ratos hipertensos crônicos uma outra via pela qual a Ang II plasmática poderia potencializar a hipertonia simpática: utilizando-se de corantes fluorescentes de alto e baixo peso molecular e de Ang II marcada injetados endovenosamente, verificaram haver lesão da barreira hematoencefálica (BHE) no PVN, NTS e RVLM, importantes áreas encefálicas de controle autonômico da circulação. Demonstraram haver extravasamento do corante de baixo peso molecular e acesso de Ang II marcada ao parênquima cerebral, com prejuízo da perfusão cerebral, o que intensificava ainda mais a ativação neuronal. Realmente, a má perfusão ou a hipoperfusão cerebral tem sido apontadas por Paton et cols como uma das possíveis causas da elevada excitabilidade neuronal e hipertonia simpática na hipertensão neurogênica (PATON et al., 2008; WAKI et al., 2011).

1.3 Barreira hematoencefálica na hipertensão arterial

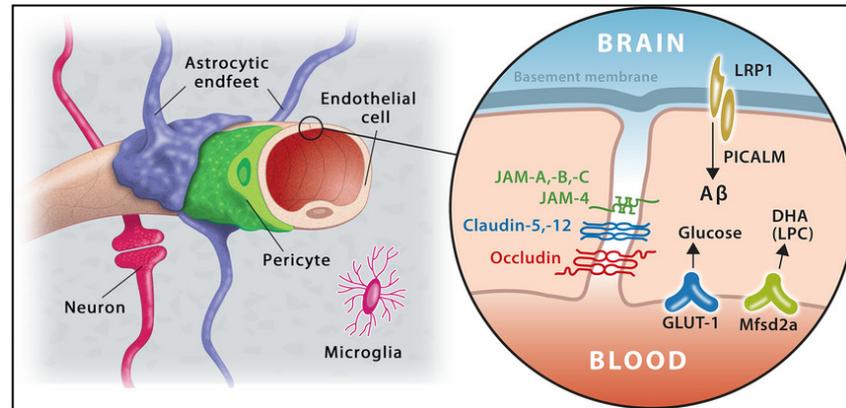
Uma vez instalada a hipertensão arterial promove, paralelamente à hipertonia simpática, a ativação a nível plasmático e tecidual do eixo vasoconstritor, trófico, pró-oxidativo e pró-inflamatório do SRA os quais levam à hipertrofia cardíaca e ao remodelamento vascular com aumento da razão parede/luz em artérias e arteríolas periféricas e cerebrais, resultando em aumento mantido da resistência vascular e importante prejuízo da perfusão tecidual. Os trabalhos do grupo de Stern e cols (BIANCARDI et al., 2014;

BIANCARDI; STERN, 2016) foram importantes em demonstrar que além das vias clássicas de ativação do SRA, a hipertensão crônica comprometia a seletividade da BHE em áreas de controle autonômico, e que o acesso de Ang II plasmática a estas áreas aumentava sua disponibilidade local potencializando suas ações deletérias. Sabe-se que a Ang II ativa vias intracelulares que aumentam o estresse oxidativo e a produção de citocinas pró-inflamatórias, e, conseqüentemente a excitabilidade neuronal e a atividade simpática (CAPONE et al., 2011; SHI et al., 2010; ZUBCEVIC et al., 2011). A maior disponibilidade de Ang II no PVN, NTS e RVLM subsequente à lesão da BHE (BIANCARDI et al., 2014) é, portanto, bastante lesiva ao controle cardiovascular por determinar marcante aumento da hipertonia simpática.

Em outras áreas cerebrais como o córtex, hipocampo e striatum os efeitos deletérios da permeabilidade da BHE determinando déficits cognitivos e motores já eram conhecidos de longa data (MUELLER; HEISTAD, 1980; TAMAKI et al., 1984). Apenas a partir dos trabalhos do grupo de Stern e cols é que se confirmou a possibilidade de a hipertensão arterial crônica comprometer também a seletividade da BHE no PVN, NTS e RVLM e prejudicar o controle autonômico da circulação, o que abriu uma nova linha de pesquisa destinada à investigação dos mecanismos passíveis de afetar o funcionamento da BHE na hipertensão.

Sabe-se que a BHE (Figura 1), uma interface regulatória que separa a circulação periférica do sistema nervoso central (SNC), é formada por um sistema celular complexo composto por células endoteliais que se apoiam na membrana basal contínua, os pericitos que se encontram embebidos na membrana basal e recobrem aproximadamente 30% da circunferência capilar e os podócitos dos astrócitos que envolvem e revestem externamente os capilares (ABBOTT et al., 2006; KEANEY; CAMPBELL, 2015). O endotélio dos capilares encefálicos formam, devido à presença de junções oclusivas entre as células endoteliais (Figura 1), uma *barreira paracelular física* bloqueando o transporte paracelular de substâncias hidrossolúveis (o que ocorre livremente na maioria dos demais endotélios), permitindo apenas o transporte transcelular entre o capilar e o interstício (ABBOTT et al., 2006; KEANEY; CAMPBELL, 2015). Funcionalmente há também uma “*barreira transcelular*” uma vez que o transporte de macromoléculas através do citoplasma celular é bastante reduzido nos capilares encefálicos quando comparado ao observado em capilares periféricos, e, uma “*barreira enzimática*” representada por um complexo conjunto de enzimas (acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, monoamina oxidase, gama-glutamyltranspeptidase, entre outras) que degradam diferentes compostos químicos (ANDREONE et al., 2017). Embora a micróglia não faça parte da estrutura física da BHE, ela participa de sua

funcionalidade através da liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Figura 1, KEANEY; CAMPBELL, 2015).



Quadro 1- Modelo representativo das componentes da a barreira hematoencefálica (célula endotelial, membrana basal, pericitos e podócitos dos astrócitos) e, em maior aumento, o contato entre 2 células endoteliais indicando as proteínas que constituem as junções oclusivas. Reproduzido de Keaney & Campbell, 2015.

Estes constituintes e os neurônios adjacentes formam a chamada **unidade neurovascular** cuja função primordial é regular precisamente a transferência de íons, moléculas e células entre o sangue e o tecido neural, mantendo a constância do ambiente extracelular do parênquima cerebral, além de proteger o SNC de agentes patogênicos. Sabe-se que a BHE está completamente formada ao nascer, mantendo sua funcionalidade durante toda vida nos indivíduos hígidos (HAGAN; BEN-ZVI, 2015). Por outro lado, a disfunção da BHE pode levar à desregulação iônica e hormonal, à alteração da sinalização neuronal, assim como à entrada de células e moléculas imunes no SNC, processos estes que levam à hiperexcitabilidade neuronal, podendo inclusive em situações mais graves evoluir para degeneração neuronal (BLANCHETTE; DANEMAN, 2015; DANEMAN; PRAT, 2015).

Como trabalhos anteriores de nosso laboratório já haviam demonstrado em ratos hipertensos espontâneos (SHR) que a hipertensão arterial desencadeava importante ativação do SRA cerebral no PVN, NTS e RVLM e disfunção autonômica (FELIX; MICHELINI, 2007; CHAAR et al., 2015; SANGALETI et al., 2004), buscamos identificar nesta preparação a possível participação da BHE. Ao analisarmos o estado funcional da BHE durante a instalação da hipertensão, observamos que ela se encontrava íntegra na fase pré-hipertensiva, mas disfuncional após a instalação da hipertensão (BUTTLER et al., 2017). Observamos ainda que o aumento da permeabilidade da BHE na fase crônica da hipertensão era acompanhada de aumento da disponibilidade local de Ang II e correlacionava-se

positivamente com o aumento da atividade simpática vasomotora e cardíaca e importante disfunção autonômica (BUTTLE et al., 2017). Neste trabalho pudemos ainda demonstrar pela primeira vez na literatura que tanto o aumento da permeabilidade da BHE quanto a disponibilidade de Ang II e a disfunção autonômica eram prontamente corrigidos pelo treinamento aeróbio de moderada intensidade (BUTTLE et al., 2017).

1.4 Treinamento aeróbio, hipertensão arterial e BHE

Trabalhos de nosso e outros laboratórios têm demonstrado a eficácia do treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade em determinar em ratos hipertensos crônicos redução acentuada da atividade do SRA encefálico, em diminuir a sinalização celular desencadeada pela Ang II, reduzindo marcadamente a produção de espécies reativas de oxigênio, a ativação da micróglia e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (AGARWAL et al., 2011; CHAAR et al., 2015; MASSON et al., 2014, 2015; PELLEGRIN et al., 2015; SILVA et al., 2017). Importante ressaltar que as adaptações benéficas ao treinamento nos SHR correlacionavam-se com aumento da sensibilidade do reflexo barorreceptor, aumento da variabilidade da frequência cardíaca, redução da variabilidade da pressão arterial e sensível melhora do controle autonômico da circulação os quais eram acompanhados da instalação da bradicardia de repouso e queda parcial da pressão arterial (CHAAR et al., 2015; MASSON et al., 2014, 2015).

Estudos anteriores em animais submetidos à isquemia cerebral e outras doenças cerebrovasculares já haviam demonstrado os efeitos protetores do treinamento à integridade da BHE em outras áreas cerebrais (não diretamente ligadas ao controle neural da circulação), diminuindo sua permeabilidade e melhorando a locomoção, a memória e a cognição (DAVIS et al., 2007; DE SENNA et al., 2015; BERTRAN et al., 2016; GUO et al., 2008). Em nosso trabalho pioneiro relativo aos efeitos do treinamento aeróbio sobre a permeabilidade da BHE em SHR, havíamos observado que apenas 2 semanas de exercício repetitivo eram eficazes em reverter e normalizar o elevado extravasamento da barreira no PVN, NTS e RVLM e corrigir a disfunção autonômica, valores esses que eram mantidos em níveis de normalidade até o final das 8 semanas experimentais (Buttler et al., 2017). Mais recentemente quantificando a funcionalidade da BHE e a expressão de caveolina-1 no PVN de ratos hipertensos e normotensos submetidos ao treinamento e sedentarismo pudemos observar uma correlação positiva entre a expressão de caveolina-1 e a atividade simpática periférica, sugerindo uma possível participação da caveolina-1 na disfunção da BHE (FRAGAS et al., 2021). Em

conjunto todos esses trabalhos indicam que o treinamento aeróbio é eficaz em corrigir a elevada permeabilidade da BHE não só no córtex, hipocampo e striatum, mas também em áreas neurais de controle cardiovascular. Sabemos que a passagem de substâncias através da BHE pode ser determinada pelo transporte transcelular (a chamada transcitose) e/ou pelo transporte paracelular, mas desconhecemos o(s) mecanismo(s) que condicionam a elevada permeabilidade da BHE na hipertensão assim como aquele(s) que condicionam a correção da funcionalidade da BHE induzida pelo treinamento.

Dados conflitantes têm sido relatados: há evidências de que a 'lesão' da BHE seja devida à quebra/perda de proteínas constituintes das junções oclusivas no córtex e hipocampo de hipertensos (MOHAMMADI; DEGHANI, 2014; PELISCH et al., 2011), assim como preservação das mesmas, indicando via paracelular intacta (UENO et al., 2004). Comprometimento do transporte transendotelial e ausência de alterações nas junções oclusivas foram observados em ratos submetidos à isquemia cerebral subsequente ao acidente vascular cerebral (KRUEGER et al., 2013). Kukuc et al., (2002) sugeriram que fatores hemodinâmicos poderiam estar relacionados com a gênese da lesão da BHE e a disfunção endotelial. Por outro lado, tratando ratos hipertensos espontâneos e renais crônicos com losartan, Biancardi e cols (2014) reportaram redução significativa do extravasamento da BHE após bloqueio dos receptores AT₁, mas manutenção da lesão da BHE nos ratos tratados com hidralazina, sugerindo o envolvimento da Ang II na indução de déficits da BHE. De fato, trabalhos experimentais têm demonstrado que aumento na disponibilidade de Ang II, via receptores AT₁, modula a função das células endoteliais, aumenta a permeabilidade da BHE e causa edema cerebral, efeitos esses parcialmente revertidos pelo bloqueio farmacológico do SRA (BIANCARDI et al., 2014; BIANCARDI et al., 2015; CAPONE et al., 2011; FLEEGAL-DE-MOTTA et al., 2009; PELISCH et al., 2011).

Frente à nossa observação anterior de que o elevado extravasamento do corante de baixo peso molecular indicativo do aumento da permeabilidade da BHE no PVN dos SHR sedentários era acompanhado de aumento da expressão gênica e proteica de caveolina-1, que a redução do extravasamento nos SHR treinados ocorria simultaneamente à redução significativa da expressão da caveolina-1 (FRAGAS et al., 2021), e, sabendo-se que a caveolina-1 é um dos principais constituintes das vesículas transcitóticas, é nossa hipótese de trabalho que tanto o aumento da permeabilidade da BHE na hipertensão crônica quanto sua normalização após o treinamento aeróbio sejam devidos a alterações para mais e para menos (respectivamente) da transcitose. Ainda a observação de que a hipertensão não alterava

expressão gênica de claudina-5 (um constituinte das junções oclusivas) (FRAGAS et al., 2021) sugeria a inalteração do transporte paracelular pela hipertensão, o que deverá ser confirmado experimentalmente.

2 OBJETIVOS

Com o objetivo de se avaliar os efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre as vias transcelular e paracelular de transporte através da BHE, comparamos em SHR e seus controles normotensos (Wistar) sedentários (S) e treinados (T) as alterações ultraestruturais da BHE em capilares do PVN, NTS e RVLM procurando correlacionar essas alterações à permeabilidade da barreira e ao controle autonômico da circulação.

São nossos objetivos específicos:

- Avaliar nos SHR-S, SHR-T, Wistar-S e Wistar-T os parâmetros hemodinâmicos assim como a variabilidade da pressão arterial, da frequência cardíaca e seus componentes espectrais,

- Quantificar no PVN, NTS e RVLM dos diferentes grupos experimentais a permeabilidade da BHE através do extravasamento ou não de corante de baixo peso molecular ao parênquima cerebral em presença de disfunção ou inalteração da funcionalidade da BHE, respectivamente,

- Analisar nas mesmas áreas dos mesmos animais a ultraestrutura dos capilares encefálicos avaliando as alterações induzidas pela hipertensão e treinamento aeróbio sobre os diferentes constituintes da BHE como a célula endotelial (morfologia, densidade das vesículas transcitóticas, integridade das junções oclusivas), a membrana basal e os pericitos.

- Confirmar possíveis efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a transcitose avaliando no PVN dos mesmos grupos experimentais os efeitos sobre a expressão de caveolina-1, um dos principais constituintes das vesículas transcelulares,

- Correlacionar nos SHR-S e SHR-T, Wistar-S e Wistar-T as possíveis alterações da transcitose com a permeabilidade da BHE e a permeabilidade da BHE com os parâmetros funcionais e o controle autonômico da circulação quantificados antes do sacrifício dos animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e aprovação do Comitê de Ética

Para o presente estudo, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) pertencentes às linhagens espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar com peso aproximado de 200-250g e cerca de 12 semanas de idade no início dos protocolos experimentais. Todos os animais, provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/ Rede USP de Biotérios), foram alojados no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Os ratos foram alocados em caixas com 3-4 animais, temperatura controlada de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Os ratos foram pesados antes e após a realização dos testes de esforço para acompanhamento da massa corporal. Todos os procedimentos descritos neste projeto estão de acordo com princípios para experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-ICB/USP sob o número CEUA 93/2017.

3.2 Avaliação da capacidade aeróbia máxima

A primeira semana foi destinada à adaptação dos ratos à corrida em esteira ergométrica (Millenium, Inbramed), adaptada para ratos (5 sessões de 0,4-0,7 km/h, 0% inclinação, 10 minutos/dia). A capacidade aeróbia máxima foi avaliada pelo teste indireto de esforço máximo durante a realização de exercício escalonado. O teste foi iniciado com uma velocidade inicial de 0,3 km/h, seguido de incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal. Este teste realizado antes do início dos protocolos experimentais possibilitou não só a determinação da intensidade do treinamento, como também a alocação de ratos com igual desempenho aos grupos sedentário (S) e treinado (T). Os testes de esforço máximo foram também repetidos para todos os ratos ao final dos protocolos para avaliação do ganho da capacidade aeróbia durante os protocolos S e T. Os ratos considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos dos protocolos experimentais.

Tabela 1 - Listagem das velocidades/tempos utilizados nos testes de esforço máximo.

Tempo de Corrida	Velocidade
0-3 min	0,3 km/h
3 min 1s - 6 min	0,6 km/h
6 min 1s – 9 min	0,9 km/h
9 min 1s – 12 min	1,2 km/h
12 min 1s – 15 min	1,5 km/h
15 min 1s – 18 min	1,8 km/h
18 min 1s – 21 min	2,1 km/h

3.3 Protocolo de treinamento aeróbio e sedentarismo

Após a realização do 1º teste de esforço máximo, os ratos foram submetidos ao protocolo de treinamento físico (T) que consistiu de corrida em esteira, 1 hora/dia, 5 dias/semana com intensidade de 50-60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço máximo e 0% de inclinação (MASSON et al., 2014; CHAAR et al., 2015; SILVA Jr et al., 2015), ou mantidos S por 4 semanas. Os ratos alocados aos grupos S foram colocados uma vez por semana na esteira por 5 minutos a 0,4-0,7 km/h (o que não se constitui em treinamento), apenas para manter a adaptação à esteira, à semelhança dos ratos do grupo T.

3.4 Canulação arterial

3.4.1 Confeção das cânulas. As cânulas arteriais 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 4 cm de extensão (para a artéria femoral) ou 2,5 cm de extensão (para a carótida) que foram soldadas, por aquecimento, à parte distal de maior calibre (diâmetro interno: externo = 0,50:1,50 mm) com aproximadamente 17 cm de comprimento (artéria femoral) e 8 cm de comprimento (carótida). As cânulas foram preenchidas com solução salina 0,9% esterilizada e ocluídas com pino de metal.

3.4.2 Procedimento cirúrgico. Após o período de 4 semanas de T ou S os ratos foram anestesiados (cloridrato de quetamina 100 mg/kg e cloridrato de xilazina 20 mg/kg, ip.) para dissecação da artéria femoral e implantação de cânula arterial para o registro dos parâmetros

hemodinâmicos. A cânula foi introduzida na artéria, fixada e exteriorizada no dorso do animal (FELIX; MICHELINI, 2007; BUTTLER et al, 2017). Os ratos foram, após a cirurgia, tratados com antibiótico (penicilina 3000 U, *im.*) e anti-inflamatório (Cetroprofeno, 3mg/kg, *sc*) e permaneceram em repouso por aproximadamente 24 horas. Para a injeção de corantes fluorescentes os ratos foram novamente anestesiados após os registros funcionais; a artéria carótida direita foi dissecada e uma segunda cânula foi introduzida no sentido cranial. Os ratos foram mantidos anestesiados e após a injeção dos corantes aguardou-se 20 minutos para circulação cerebral dos corantes, período após o qual os animais foram sacrificados.

3.5 Mensuração da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais

No dia subsequente, cerca de 24 -25 horas após a canulação arterial e de 26-27 horas após a última sessão de treinamento (no caso dos grupos T), a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram continuamente monitoradas por um período de 30-40 min após o cessar da atividade exploratória, estando os animais acordados e com livre movimentação. A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs, Lakewood, CO, USA), acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) e ao sistema digital de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália) para registro contínuo da PA pulsátil, PA média (PAM) e FC (derivada do batimento-a-batimento da PA pulsátil).

3.6 Análise espectral dos parâmetros cardiovasculares

A análise espectral dos parâmetros cardiovasculares no domínio da frequência foi realizada como descrito anteriormente por Soares et al., (2004). Resumidamente, as análises, abrangendo tanto o domínio do tempo quanto o da frequência, foram avaliadas em condição de repouso para cada animal, utilizando-se uma média de três períodos de 5 minutos de registro contínuo, selecionados após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. A densidade espectral foi obtida através da transformação rápida de Fourier pelo método de Welch e janelas de Hanning com sobreposição de 50%. A aquisição contínua dos sinais permitiu a obtenção de séries temporais de PA e FC utilizadas para análise da variabilidade da PA sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP, indicativo da variabilidade da FC), bem como de seus respectivos componentes espectrais de *very low* (VLF, <0,20 Hz), *low-frequency* (LF, 0,20-0,75 Hz) e *high-frequency* (HF, >0.75 Hz). Esta análise foi realizada no *software* Matlab

6.0, através de uma rotina específica para este *software*, conforme descrito por CERONI et al., 2009; MASSON et al., 2014).

3.7 Injeção intravascular de corantes fluorescentes e análise da integridade da BHE

Para se confirmar nossas observações anteriores e poder correlacionar a funcionalidade da BHE com os demais resultados já obtidos no laboratório, administramos os corantes fluorescentes em 04 animais de cada grupo experimental (WISTAR-S, WISTAR-T, SHR-S e SHR-T). A análise da permeabilidade da BHE foi realizada após os registros hemodinâmicos com os ratos anestesiados pelo cloridato de quetamina e cloridato de xilazina (mesma dose utilizada para a canulação arterial). Os corantes fluorescentes Rodamina dextran de 70kDa e o Isoticianato de Fluoresceína dextran (FITC) de 10kDa (Sigma Aldrich, ambos na concentração de 10 mg/mL, 2.86 µl/g) foram infundidos juntos a uma velocidade de ≈ 1 ml/min. pela cânula da carótida inserida no sentido cranial, de forma que os corantes passassem primeiro pelo cérebro (BIANCARDI et al., 2014; BUTTLER et al, 2017). Após 20 minutos para efetiva recirculação, os ratos ainda anestesiados foram decapitados. Os encéfalos foram removidos e pós-fixados em paraformaldeído 4%, seguido por crioproteção em tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 30% de sacarose por 3-4 dias a 4 °C. Os encéfalos foram seccionados em criostato (cortes coronais de 30 µm, Leica, CM 3050, Germany) abrangendo a extensão do PVN, NTS e RVLM. As imagens foram examinadas e fotografadas com o microscópio fluorescente LEICA DMLB (Leica Microsystems, Germany) acoplado a uma câmera ExiBlue (Imaging, Canada).

3.8 Quantificação digital da permeabilidade da BHE

As fotomicrografias obtidas através do software Image-Pro Plus v. 7.01 (Media Cybernetics, USA) foram processadas pelo software ImageJ (NIH, USA), para quantificação do extravasamento da BHE. A permeabilidade da BHE foi avaliada pela habilidade das pequenas moléculas de FITC-10kDa em extravasar parcialmente do leito intravascular para o parênquima encefálico, em presença de algum tipo de lesão/disfunção da BHE (BIANCARDI et al., 2014; BUTTLER et al, 2017). Esta técnica de quantificação, desenvolvida pelo grupo do Prof. Dr. Javier Stern (Georgia State University, USA) (BIANCARDI et al., 2014), precisou ser padronizada para nossas condições experimentais (microscopia e câmera de fluorescência e software de aquisição Image-Pro Plus 3D v7.01, Media Cybernetics). A Figura 1 exemplifica passo-a-passo o procedimento para análise de extravasamento do FITC-

10kDa realizada. Os painéis 1a e 1b representam o mesmo corte unilateral esquerdo do PVN de um animal SHR-S, fotografado com filtros para a Rodamina e FITC, respectivamente. Após procedimento para remoção do background, o qual consiste no cálculo do threshold para as imagens colocalizadas, restam imagens binárias para a Rodamina (1c) e FITC (1d). Estas foram então colocalizadas no software formando as imagens 3e e 3f (em 32 bits e 8 bits, respectivamente). A imagem em 32 bits não é utilizada para o cálculo, apenas serve para termos uma ideia visual do extravasamento do FITC: a cor verde indica o FITC que pode ser extravasado na presença de lesão da BHE e a cor vermelha representa a Rodamina, de maior peso molecular, que permanece dentro dos capilares, identificando-os; o branco corresponde à colocalização dos dois corantes. Da imagem colocalizada em 8 bits, subtraímos a imagem 1d (FITC binário) e temos como resultado a imagem 1g, que representa apenas o FITC extravasado. Através do comando 'measure' do software, obtemos automaticamente o valor de porcentagem de área de FITC extravasado para a imagem analisada (1h). Esse procedimento foi realizado em todos os cortes, para os lados direito e esquerdo do PVN, NTS e RVL. Os valores utilizados para comparação entre os grupos são das médias aritméticas para todos os cortes de cada animal. Foram analisados de 7 a 9 cortes do PVN de cada animal, 7 A 10 cortes do NTS e 5 A 7 cortes do RVLM em 4 ratos por grupo experimental.

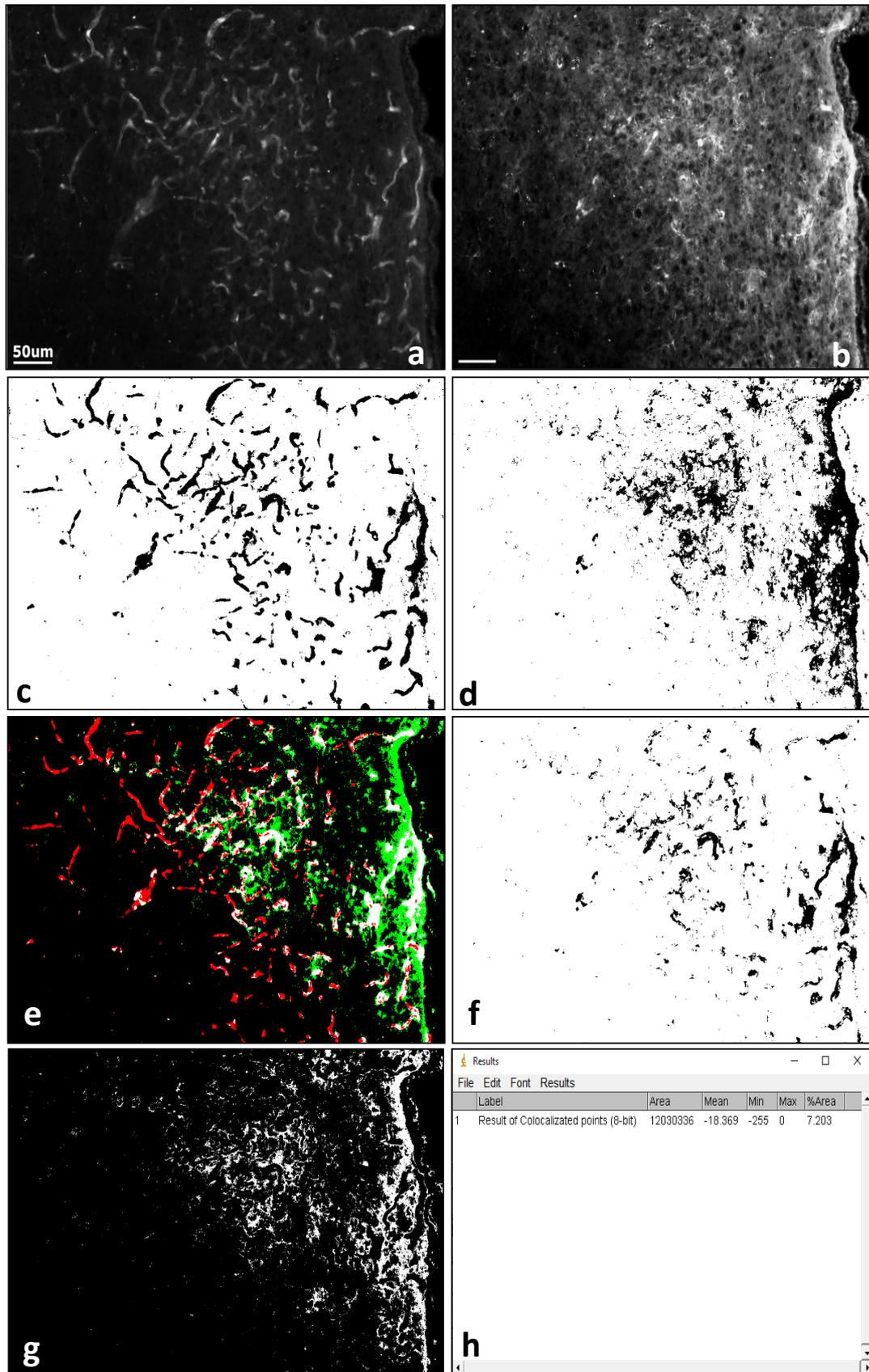


Figura 1- Diferentes passos do processo de quantificação do extravasamento de FITC. **a-** PVN com filtro para Rodamina; **b-** PVN com filtro para o FITC; **c-** imagem binária para a Rodamina; **d-** imagem

binária para o FITC; **e**- colocalização da Rodamina e FITC (imagem em 32 bits), o vermelho corresponde à Rodamina, o verde ao FITC e o branco à colocalização dos dois corantes; **f**- colocalização de Rodamina e FITC (imagem em 8 bits); **g**- resultado da subtração das imagens colocalizada de FITC 8 bits; **h**- resultado da porcentagem de área extravasada pelo FITC.

3.9 Obtenção do tecido cerebral e técnica para análise ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão

Para análise da microscopia eletrônica de transmissão, utilizamos 03 animais/grupo experimental. Ao término dos registros funcionais, os ratos foram profundamente anestesiados (3x a dose aplicada nas cirurgias); imediatamente após a parada respiratória, foi realizada uma incisão ventral na linha mediana da região torácica para abertura do tórax e exposição do coração. Os ratos foram perfundidos (bomba peristáltica, Manostat Corporation) via ventrículo esquerdo com solução salina estéril (com abertura do átrio direito para extravasamento do sangue), seguida de perfusão com solução fixadora de Karnovski modificada, contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído a 0,1M de tampão fosfato de sódio em pH 7,3. O encéfalo foi retirado e imerso em solução pós-fixadora contendo 2,5% de glutaraldeído por 2 horas, sendo a seguir lavado em tampão fosfato de sódio e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% por 2 horas a 4°C. Em seguida foi corado (overnight) com acetato uranila, desidratado em série crescente de álcool (a partir do álcool 60% até 100%) e incluso em resina pura. Foram obtidos cortes semifinos com 400 nm de espessura no ultramicrotomo (LEICA EMUC6). Os cortes semifinos foram transferidos para lâminas de vidro e corados com azul de toluidina, para selecionar as áreas adequadas para os cortes ultrafinos de 60 nm de espessura. Em seguida, os blocos foram submetidos à ultramicrotomia com lâmina de diamante. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 4% (WATSON, 1958) e com citrato de chumbo a 0,4% (REYNOLDS, 1963) e dispostos em tela de cobre de 200 “mesh” para análise ao microscópio eletrônico de transmissão no Instituto de Ciências Biomédicas I (FEI Tecnai G20 200 Kv) e no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantã (Zeiss, Leo 906 E 120 Kv).

3.10 Análise ultraestrutural dos capilares pela microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de capilares das diferentes áreas autonômicas (PVN, NTS e RVLM) dos 4 grupos experimentais capturadas, foram analisadas através do software ImageJ (NIH, USA). Foram obtidas imagens de 20-25 capilares/área em 3 ratos/grupo experimental). Em cada capilar foram analisados os seguintes parâmetros:

3.10.1 Perímetro luminal e abluminal, área do capilar endotelial e diâmetro da luz vascular. Para obtenção dos perímetros utilizamos cortes transversais dos capilares e acompanhamos com o mouse a superfície luminal e abluminal da célula endotelial, unindo os pontos inicial e final. Em todas as imagens foram analisadas primeiramente o lado luminal e em seguida o abluminal. Automaticamente o programa calculava também as áreas compreendidas pelo perímetro abluminal (externo) e pelo luminal (interno): a diferença entre elas correspondia à área ocupada pela célula endotelial ($\text{Área capilar} = \text{área externa} - \text{área interna}$). Para o diâmetro foi utilizada a divisão entre o perímetro interno e o valor de Pi (3,1416).

3.10.2 Espessura da membrana basal (MB). Para esta análise, foram demarcados em cada capilar 4 pontos correspondentes ao ‘norte’, ‘sul’, ‘leste’ e ‘oeste’, nos quais mensuramos a espessura da MB. A média destes valores correspondia à espessura média da MB.

3.10.3 Contagem das vesículas luminais, abluminais e totais. Para se evitar a inclusão de vesículas não transcitóticas (por exemplo, endossomos, exossomos, lisossomos, etc, dificilmente distinguíveis das vesículas de transporte ao nível da microscopia eletrônica) quantificamos apenas as vesículas em formação ou ainda “presas” nas membranas luminal e abluminal de cada capilar, sendo a somatória de ambas apresentadas como vesículas totais/capilar. As vesículas luminais e abluminais foram também quantificadas como número vesículas/ μm da borda luminal e abluminal).

3.10.4 Análise das junções oclusivas (JO). Para esta análise foram quantificadas e extensão da borda de contato entre 2 células endoteliais, a extensão da JO propriamente dita e a razão entre elas, indicativa da porcentagem de ocupação da borda celular pela JO.

3.10.5 Quantificação da cobertura do capilar pelos pericitos. Foi quantificada a extensão do pericito em contato com a borda abluminal do capilar (tendo entre eles a membrana basal), sendo esta medida apresentada como porcentagem do perímetro abluminal do capilar em questão.

3.11 Ensaios de Imunofluorescência

3.11.1 Obtenção dos tecidos encefálicos

Cerca de 6 animais/grupo foram utilizados nesta análise. Os ratos foram anestesiados profundamente e, imediatamente após a parada respiratória, perfundidos, via ventrículo esquerdo, com bomba peristáltica a uma taxa de aproximadamente 20 ml/min. Primeiramente

foi utilizada uma solução Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DEMEM) oxigenada por 10 minutos, seguida por perfusão com uma solução de PFA a 4% (300ml) por aproximadamente 20 minutos. Os animais foram então decapitados para a retirada dos encéfalos, os quais foram pós-fixados por 48h horas em PFA 4% e em seguida crioprottegidos em solução sacarose a 20% e 30% por 24h cada a 4 °C.

3.11.2 Protocolo de imunofluorescência.

Cortes coronais sequenciais de 30 µm de espessura abrangendo toda a extensão do PVN, segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2009), foram obtidos em criostato Leica (CM3050, Germany), coletados em solução PBS 0,1M a 4 °C e armazenados em solução anti-freeze. Antes da incubação com os anticorpos específicos, os cortes passaram por um pré-tratamento com solução contendo 1% de borohidreto de sódio, peróxido de hidrogênio (1%) e álcool metílico (10%) em tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M; após 3 lavagens em KPBS 0,02M com duração de 10 minutos cada, os cortes foram pré-incubados em soro normal de burro a 5% (S30-10ML, Millipore Temceula, CA, EUA) por 1 h e a seguir incubados overnight com os seguintes anticorpos primários: rabbit anti Caveolin-1 (1:100, Cell Signaling, MA, EUA) e mouse anti- Endothelial Cell antibody (RECA, 1:800, ABCAM, Cambridge, Reino Unido). Os anticorpos primários foram diluídos em KPBS 0,02M contendo Triton X-100 a 0,3% (detergente para quebrar os lipídios de membrana facilitando a ligação dos anticorpos com as proteínas) e soro normal de burro (2%). A seguir os cortes foram incubados com anticorpos secundários Alexa 488 donkey anti-rabbit (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-rabbit IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., MD, EUA) e Alexa 594 donkey anti-mouse (Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., MD, EUA), ambos a uma diluição de 1:500 em KPBS 0,02M contendo Triton X-100 a 0,3% e soro normal de burro (1%) por 1 h. Após outras 3 lavagens de 10 min em KPBS 0,02M, os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas (solução contendo 0,5% de gelatina de pele bovina e 0,05% de CrK (SO₄)). As lâminas foram montadas em meio de montagem Slowfade Gold Antifade reagent (Life Technologies, CA, EUA) e lamínula, evitando-se a formação de bolhas e armazenadas a 4 °C no escuro.

3.11.3 Análise histológica

Os cortes sequenciais do PVN foram analisados (Zeiss Axioimager A1 microscope, München Germany, acoplado a uma câmera Zeiss AxioCam 512 colour camera) para localização da área de interesse - o PVN ventromedial com grande envolvimento no controle

autônomo da circulação como demonstrado por trabalhos anteriores de nosso laboratório (Cavalleri et al., 2011; Santos et al., 2018; Rocha-Santos et al., 2020). Áreas selecionadas foram fotografadas com aumento de 20x e as fotomicrografias analisadas pelo software ImageJ (NIH, USA). A expressão de caveolina-1 e RECA no PVN ventromedial foi quantificada em uma mesma área de interesse (retângulo cujo perímetro media 20,85 cm). Os valores obtidos foram expressos em densidade integrada (% área x intensidade do sinal). Foram analisados 5-7 cortes por rato, 5-7 ratos/grupo experimental.

3.12 Razão do peso ventricular pelo peso corporal (PVE/PC)

Do coração, retirado do animal *post-mortem*, separou-se o ventrículo esquerdo (VE) que foi pesado em balança semi-analítica (Micronal B400). A razão entre peso do VE/peso corporal (PVE/PC em mg/g) foi utilizada como índice de hipertrofia cardíaca.

3.13 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm EPM. A evolução do desempenho em esteira e do peso corporal, foi analisada por ANOVA de 2 fatores para medidas repetidas. As variáveis funcionais (PAM, FC, parâmetros da análise espectral), a quantificação de extravasamento do FITC-10kDa através da BHE, os dados ultraestruturais dos capilares encefálicos (valores obtidos pela microscopia eletrônica) e a expressão de caveolina-1 e RECA foram analisados pela ANOVA fatorial de 2 fatores, comparando-se os efeitos entre grupos (SHR e Wistar) e condições experimentais (treinamento e sedentarismo). O teste post-hoc foi o de Tukey. Análises de correlação entre alterações ultraestruturais de BHE e sua permeabilidade assim como entre a permeabilidade da BHE e dados funcionais obtidos nos mesmos animais foram realizadas pela estatística de Pearson.

Para estas análises foi utilizado o software GraphPad Prism 8 e o nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Eficácia do treinamento

Foram realizadas 2 séries de experimentos com os 4 grupos experimentais cada. Em ambos os experimentos os ratos com 3 meses de idade foram submetidos a um período inicial de adaptação em esteira após o que realizaram o teste de esforço máximo (protocolo escalonado como descrito em Métodos). Foram a seguir submetidos aos protocolos de treinamento ou sedentarismo por 4 semanas, realizando-se ao final dos mesmos novos testes de esforço máximo. Os resultados para todos os animais são apresentados na Figura 2. Os SHR apresentaram desde o início dos protocolos maior capacidade aeróbia ($1,30 \pm 0,03$ km/h e vs. $0,99 \pm 0,06$ km/h, nos Wistar), característica que se manteve ao longo dos experimentos. Os grupos T (SHR-T e Wistar-T) mostraram ganho significativo na capacidade aeróbia após as 4 semanas experimentais ($1,80 \pm 0,09$ km/h e $1,39 \pm 0,03$ km/h, respectivamente); por outro lado, houve redução no desempenho dos grupos mantidos em sedentarismo. Deve-se ressaltar que mesmo com capacidade aeróbia inicial diferente, ambos os grupos apresentaram similar ganho de desempenho em esteira (SHR-T= $+0,51 \pm 0,06$ km/h e Wistar-T= $+0,40 \pm 0,04$ km/h).

4.2 Evolução do peso corporal

A evolução do peso corporal dos 4 grupos durante os protocolos experimentais é apresentada na Figura 3.

Desde o início dos protocolos os SHR apresentavam menor peso corporal quando comparados aos Wistar (SHR: 291 ± 5 g vs. Wistar: 382 ± 5 g), observação esta que foi mantida ao longo dos protocolos experimentais. Houve em todos os grupos ganho de peso corporal no decorrer dos protocolos, apresentando na 4^a. semana experimental os seguintes valores: SHR-S: 328 ± 7 g, SHR-T: 318 ± 8 g, Wistar-S: 441 ± 8 g e Wistar-T: 415 ± 7 g.

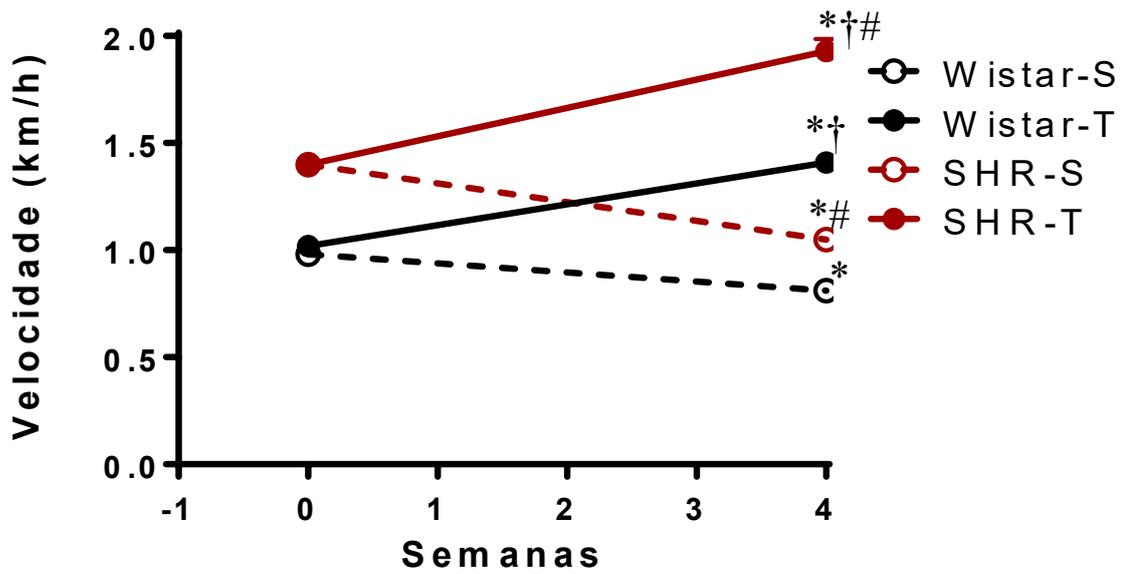


Figura 2 - Evolução do desempenho em esteira (km/h) dos SHR e Wistar submetidos aos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) durante as 4 semanas experimentais. $n = 20-22$ ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Semana 0, † vs. T, # vs. Wistar.

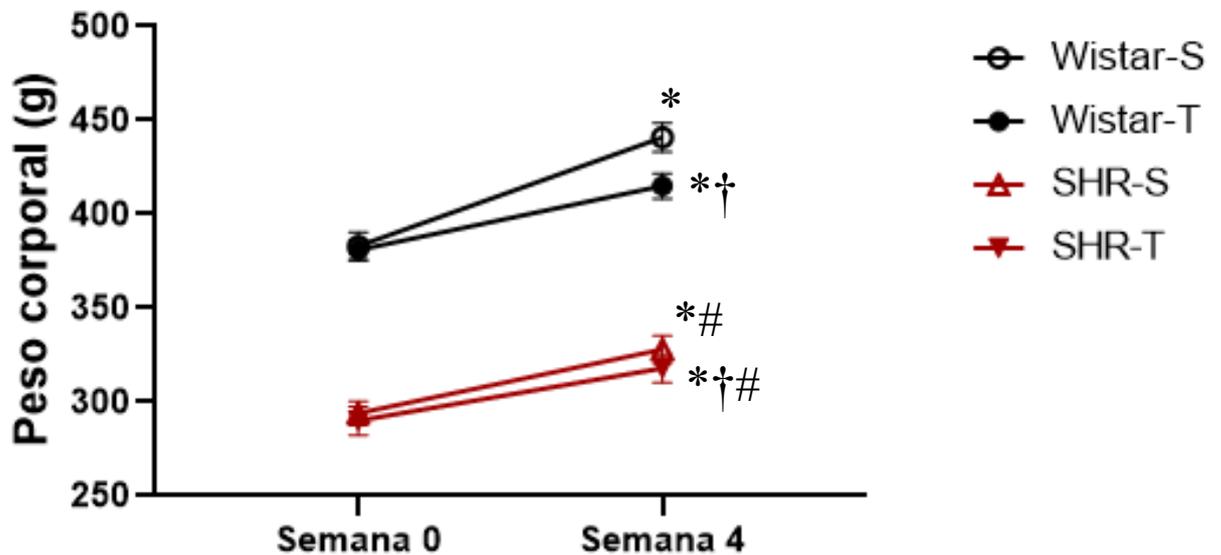


Figura 3 - Evolução do peso corporal dos grupos SHR e Wistar, treinados (T) e sedentários (S) entre as semanas 0 e 4. $n = 20-22$ ratos/grupo Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Semana 0, † vs. Wistar-T, # vs. Wistar.

4.3 Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a hemodinâmica basal, variabilidade da PAS e IP e seus componentes espectrais

Ao término dos protocolos de T ou S os animais foram anestesiados para canulação arterial e registro da PA e FC basais no dia subsequente, estando os ratos acordados e com livre movimentação. As mensurações foram feitas pelo menos 24 a 30 horas após a última sessão de T. Os registros foram obtidos por 30-40 minutos após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares (dados na Figura 4).

Como esperado, os SHR-S apresentaram a PA média (PAM) significativamente elevada quando comparados aos Wistar-S (170 ± 4 mmHg vs. 109 ± 2 mmHg, $P < 0,05$). Houve após T queda parcial, mas significativa da PAM nos SHR-T (155 ± 4 mmHg, correspondendo a uma redução de 8%, Figura 4A), mas nenhuma diferença foi observada nos ratos normotensos (Wistar-T = 109 ± 4 mmHg). A FC basal apresentava-se ligeiramente elevada nos SHR-S vs. Wistar-S (367 ± 7 e 352 ± 5 b/min, respectivamente). Em ambos os grupos houve após 4 semanas de treinamento instalação da bradicardia de repouso com quedas significativas da FC basal (SHR-T = 337 ± 5 b/min, Wistar-T = 327 ± 5 b/min, correspondendo a reduções de 8% e 7%, respectivamente, Figura 4B).

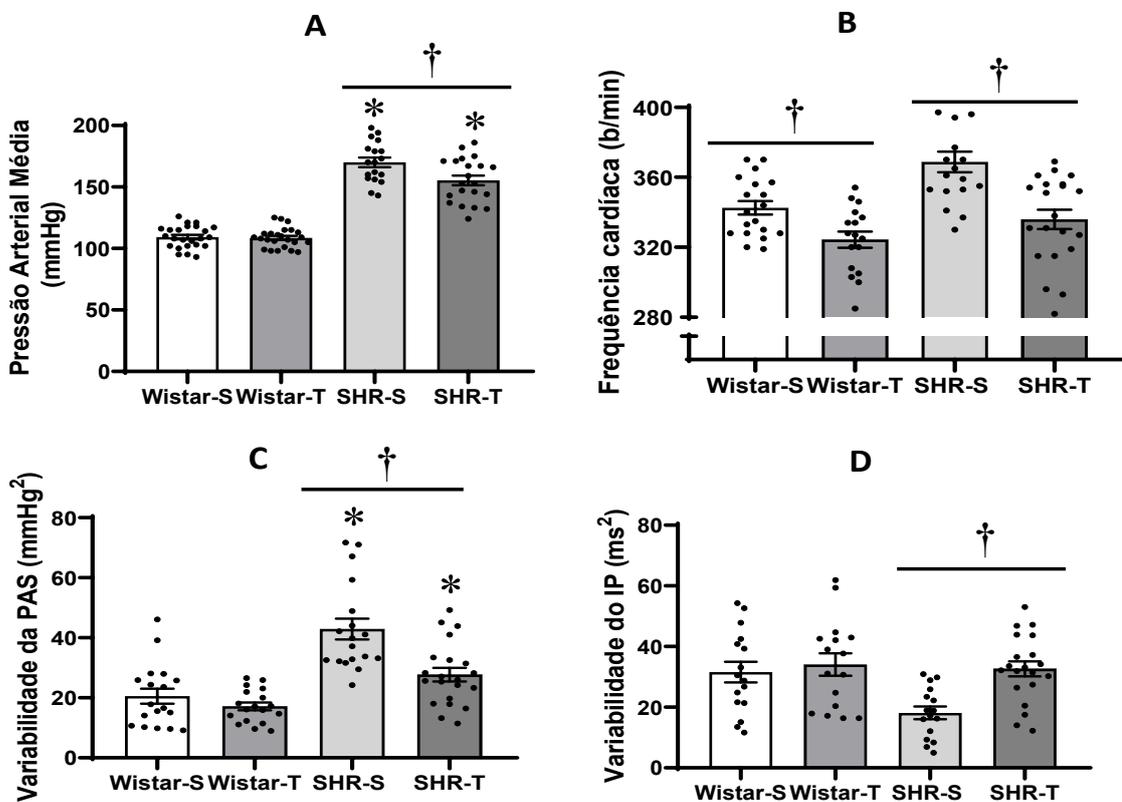


Figura 4 - Comparação dos valores de pressão arterial média (**A**, PAM), frequência cardíaca (**B**, FC), variabilidade da pressão arterial sistólica (**C**, PAS) e variabilidade do intervalo de pulso (**D**, IP) ao final dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) nos grupos Wistar e SHR. $n = 18-20$ ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar, † vs S.

Analizamos também a variabilidade e os componentes espectrais da PAS e FC (indicada pela variabilidade do IP) sugestivas da modulação simpática e parassimpática sobre os efeitores cardiovasculares. Os SHR-S demonstraram elevada variabilidade da PAS quando comparados aos Wistar-S (SHR-S: $42,18 \pm 3,80$ vs. Wistar-S: $21,65 \pm 3,10$ mmHg², Figura 4C), a qual foi acompanhada de aumento do componente LF-PAS, indicativo de elevada atividade simpática vasomotora periférica e de aumento do componente VLF-PAS indicativo de elevada modulação hormonal (Tabela 2). O treinamento determinou queda significativa da variabilidade da PAS nos SHR (SHR-S= $42,18 \pm 3,80$ para SHR-T: $31,41 \pm 3,03$ mmHg²), assim como do LF-PAS (SHR-S= $9,21 \pm 1,68$ para SHR-T: $6,64 \pm 0,99$ mmHg²).

Observamos também que os SHR-S apresentavam redução da variabilidade do IP ($18,95 \pm 2,63$ ms² vs. $33,12 \pm 4,41$ ms² nos Wistar-S, Figura 4C), aumento do componente LF-IP ($10,46 \pm 1,93$ ms² vs. $5,77 \pm 0,57$ nos Wistar-S) e redução do componente HF-IP ($5,06 \pm 0,52$ ms² vs. $7,96 \pm 1,03$ ms² nos Wistar-S, Tabela 2), com aumento significativo do balanço simpato-vagal ao coração, como demonstrado pela razão LF/HF (SHR-S: $0,59 \pm 0,02$ ms², Wistar-S: $0,40 \pm 0,05$ ms², Tabela 2). Por sua vez o T determinou nos SHR-T aumento marcante da variabilidade do IP (de $18,95 \pm 2,63$ para $34,12 \pm 2,78$ ms², uma elevação de 80% quando comparado aos SHR-S, Tabela 2), acompanhado de redução de 41% na atividade simpática (SHR-T: $6,22 \pm 0,59$ ms²) e aumento de 95% na atividade vagal ao coração (SHR-T: $9,89 \pm 0,79$ ms²). Estas alterações determinaram redução significativa do balanço simpato-vagal ao coração dos SHR treinados (SHR-T = $0,28 \pm 0,02$ ms², Tabela 2). Nenhuma alteração significativa dos componentes vagal e simpático foi observada nos ratos Wistar-T quando comparados a seus controles sedentários (Tabela 2).

Pela análise espectral foi também possível calcularmos a magnitude do barorreflexo espontâneo através dos índices α LF e α HF, cujos valores são apresentados na Tabela 2. Observamos que ambos os índices se encontravam reduzidos nos SHR-S vs. Wistar-S ($0,42 \pm 0,06$ e $1,60 \pm 0,10$ ms/mmHg para α LF e α HF, correspondendo a quedas de 50% e 20%, respectivamente, Tabela 2). Observamos também que o treinamento foi eficaz em aumentar ambos os índices do barorreflexo espontâneo nos SHR-T vs. SHR-S (α LF: de $0,42 \pm 0,06$ para $0,68 \pm 0,06$ ms/mmHg; α HF: de $1,60 \pm 0,10$ para $2,36 \pm 0,10$ ms/mmHg). Nos ratos normotensos

o T determinou aumento significativo do α HF (de $2,00\pm 0,15$ para $2,71\pm 0,20$ ms/mmHg, Tabela 2).

Tabela 2 - Variabilidade da PAS e IP e seus componentes espectrais de muito baixa (VLF), baixa (LF) e alta (HF) frequência.

	Wistar-S (n=18)	Wistar -T (n=17)	SHR-S (n=17)	SHR-T (n=18)
Variabilidade PAS (mmHg ²)	21.65±3.10	17.14±1.38	42.18±3.80 *	31.41±3.03 *†
LF-PAS (mmHg ²)	6.15±0.66	6.21±0.82	9.21±1.68*	6.64±0.99†
VLF-PAS (mmHg ²)	7.70±1.47	6.01±0.97	18.01±2.23 *	12.21±1.16 *†
Variabilidade IP (ms ²)	33.12±4.41	37.71±4.36	18.95±2.63*	34.12±2.78 †
LF-IP (ms ²)	5.77±0.57	5.46±0.56	10.46±1.93 *	6.22±0.59 †
HF-IP (ms ²)	7.96±1.03	8.14±0.83	5.06±0.52*	9.89±0.79 †
Razão LF/HF	0.40±0.05	0.41±0.05	0.59±0.02 *	0.28±0.02 †
α LF (ms/mmHg)	0.84±0.06	1.04±0.07	0.42±0.06*	0.68±0.06 *†
α HF (ms/mmHg)	2.00±0.15	2.71±0.20 †	1.60±0.10*	2.36±0.10 †

Valores são média±EPM; *n* é o número de ratos em cada grupo experimental. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.

4.4 Razão do peso ventrículo esquerdo/peso corporal

Analizamos também ao final dos protocolos T e S a razão do peso do VE/peso corporal (PVE/PC). Os SHR quando comparados aos Wistar apresentaram aumento significativo da razão PVE/PC, indicativa de hipertrofia cardíaca (SHR-S: $2,74\pm 0,13$ mg/g; SHR-T: $2,89\pm 0,16$ mg/g; Wistar-S: $1,84\pm 0,04$ mg/g; Wistar-T: $1,94\pm 0,04$ mg/g). Observamos ainda que o treinamento em esteira não modificou a razão PVE/PC em nenhum dos grupos experimentais.

4.5 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a permeabilidade da BHE no PVN, NTS e RVLM

Para confirmarmos a presença ou não de disfunção da BHE, ratos dos 4 grupos experimentais foram, após o registro dos parâmetros hemodinâmicos, anestesiados para a administração *ia.* dos corantes fluorescentes como especificado em Métodos. Após 20 min os

animais foram sacrificados para remoção e fixação do encéfalo e obtenção das áreas autonômicas, que foram processadas pela imunofluorescência. A Figura 5A ilustra para o PVN o maior ou menor extravasamento do corante de baixo peso molecular (FITC-10kDa, verde) para o parênquima cerebral frente à presença ou ausência de disfunção da BHE. Observamos nos Wistar-S e Wistar-T que os capilares (marcados com Rodamina-70kDa, vermelho) apresentavam permeabilidade bastante reduzida da BHE; em contraste, houve grande acúmulo de FITC-10kDa no interstício do PVN dos SHR-S, o qual foi marcadamente reduzido nos SHR-T após as 4 semanas de treinamento. Dados quantitativos confirmaram estas observações (Tabela 3 e Figura 5B). O extravasamento do FITC-10kDa bastante reduzido nos Wistar-S ($3,46 \pm 1,00$ % da área do PVN analisada), foi significativamente aumentado nos SHR-S ($11,44 \pm 0,61$ %); por sua vez o treinamento determinou marcante redução do FITC-10kDa no parênquima cerebral ($3,42 \pm 1,30$ %, Tabela 3, Figura 5B), igualando-o ao apresentado pelos grupos normotensos. Observamos também que o treinamento reduziu parcialmente sem alterar significativamente o extravasamento do corante de baixo peso molecular nos Wistar-T vs. Wistar-S Tabela 3, Figura 5B).

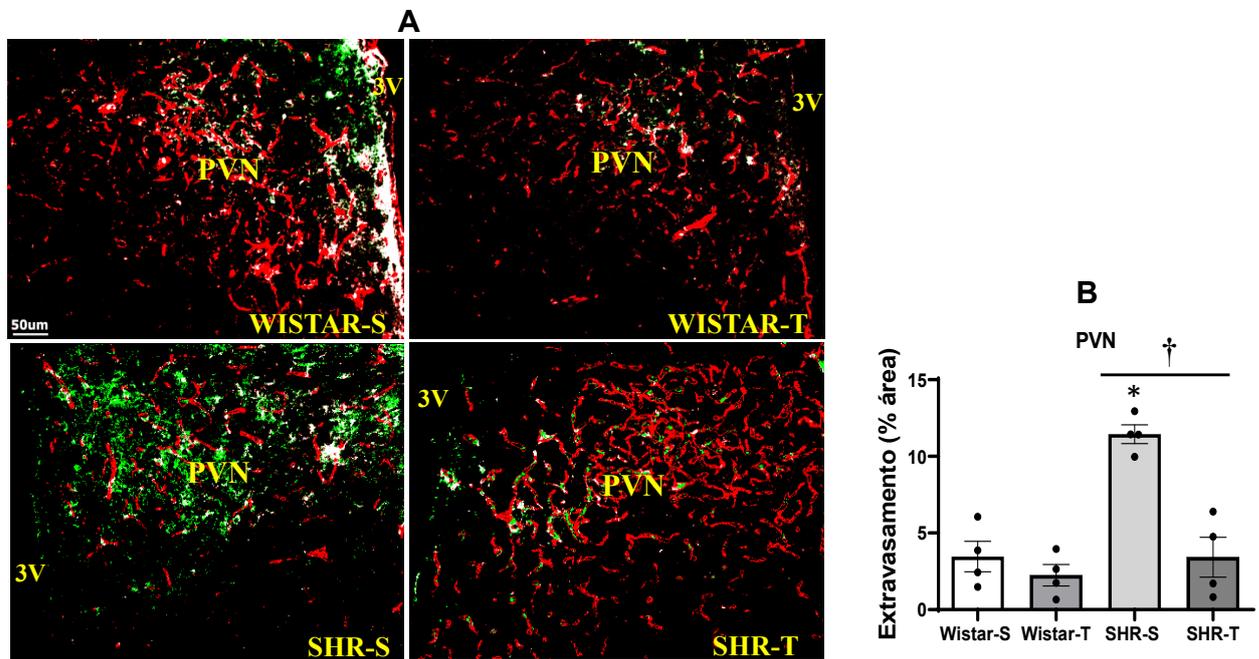


Figura 5 – (A) Fotomicrografias obtidas em 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do PVN (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. 3V, terceiro ventrículo cerebral. (B) Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no PVN. (barra de calibração = 50µm). n = 7 a 9 cortes/rato, 4 ratos/grupo. Significâncias (P < 0,05) * vs. Wistar, † vs S.

A comparação de fotomicrografias do NTS em animais dos 4 grupos experimentais mostrou comportamento semelhante ao PVN com baixa permeabilidade nos animais normotensos e maior acúmulo de FITC-10kDa no interstício do NTS dos SHR-S, o qual também foi reduzido nos SHR-T após 4 semanas de treinamento (Figura 6A). Os dados quantitativos indicaram que também no NTS o extravasamento do FITC-10kDa encontrava-se bastante elevado nos SHR-S ($10,52 \pm 1,02$ %) quando comparado aos Wistar-S ($5,76 \pm 1,38$ %) e que o treinamento foi eficaz em reduzir e normalizar o extravasamento do corante de baixo peso molecular no parênquima cerebral dos SHR-T ($2,97 \pm 0,58$ %, Tabela 3, Figura 6B). Neste núcleo o treinamento também não alterou significativamente o extravasamento do corante de baixo peso molecular nos Wistar-T vs. Wistar-S (Tabela 3 e Figura 6B).

Tabela 3- Comparação do percentual de extravasamento do FITC-10 kDa no PVN, NTS e RVLM dos 4 grupos experimentais.

	Wistar-S	Wistar-T	SHR-S	SHR-T
PVN	$3,46 \pm 1,00$	$2,25 \pm 0,70$	$11,44 \pm 0,61^*$	$3,42 \pm 1,30 \dagger$
NTS	$5,76 \pm 1,38$	$3,03 \pm 0,65$	$10,52 \pm 1,02^*$	$2,97 \pm 0,58 \dagger$
RVLM	$5,74 \pm 0,36$	$4,06 \pm 0,56$	$8,31 \pm 1,09$	$3,98 \pm 0,44 \dagger$

Valores são média \pm EPM; $n = 3-4$ ratos em cada grupo experimental. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar, \dagger vs S.

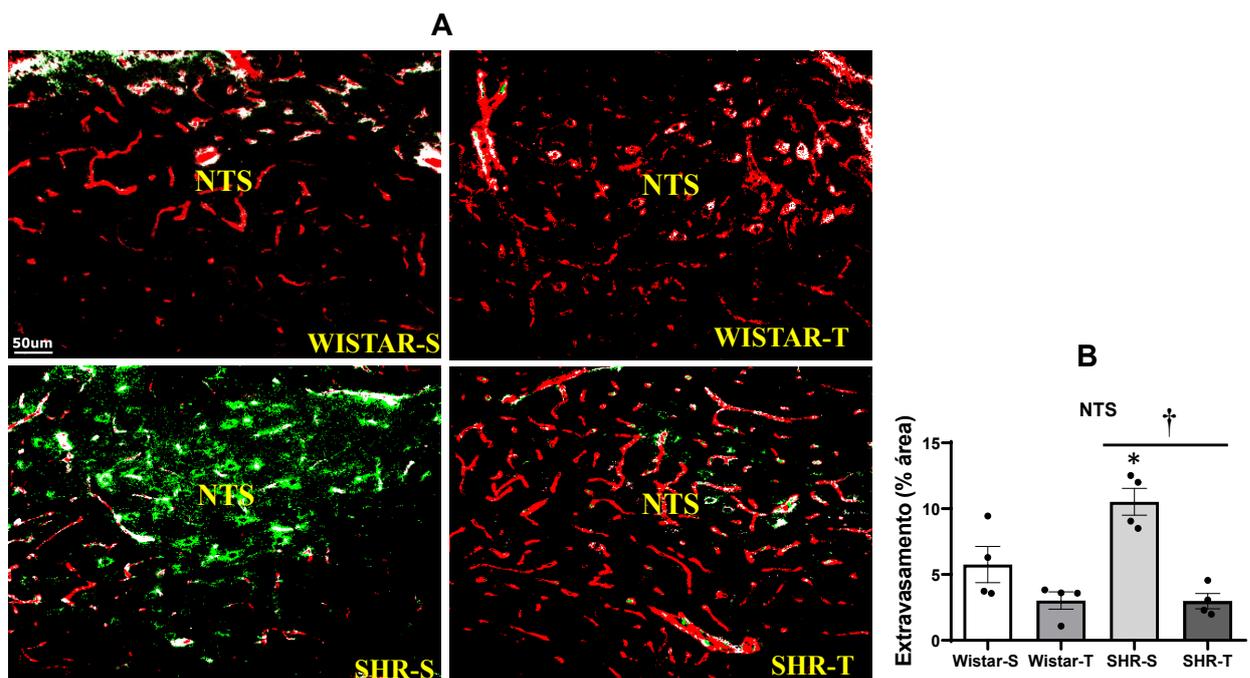


Figura 6 – (A) Fotomicrografias obtidas de 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do NTS (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. **(B)** Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no NTS. (barra de calibração = 50 μ m). n = 7 a 10 cortes/rato, 4 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.

No RVLM também verificamos comportamento similar ao observado no PVN e NTS. As fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (Figura 7A) ilustram intenso extravasamento do FITC nos SHR-S quando comparados aos grupos normotensos e que o treinamento foi eficiente em reduzi-lo nos SHR-T. Dados quantitativos confirmam estas observações: houve nos SHR-S vs. Wistar-S aumento de 45% no extravasamento de FITC-10kDa ao parênquima cerebral que, no entanto, não atingiu níveis de significância provavelmente devido à grande variabilidade dos valores (Tabela 3, Figura 7B). Não obstante, o treinamento foi eficaz em determinar redução significativa do extravasamento nos SHR-T vs. SHR-S (de 8,31 \pm 1,09 % para 3,98 \pm 0,44 %, correspondendo a uma redução de 52%, Tabela 3, Figura 7B). Neste núcleo também não observamos alterações significativas no extravasamento do corante de baixo peso molecular nos Wistar-T vs. Wistar-S (Tabela 3 e Figura 7B).

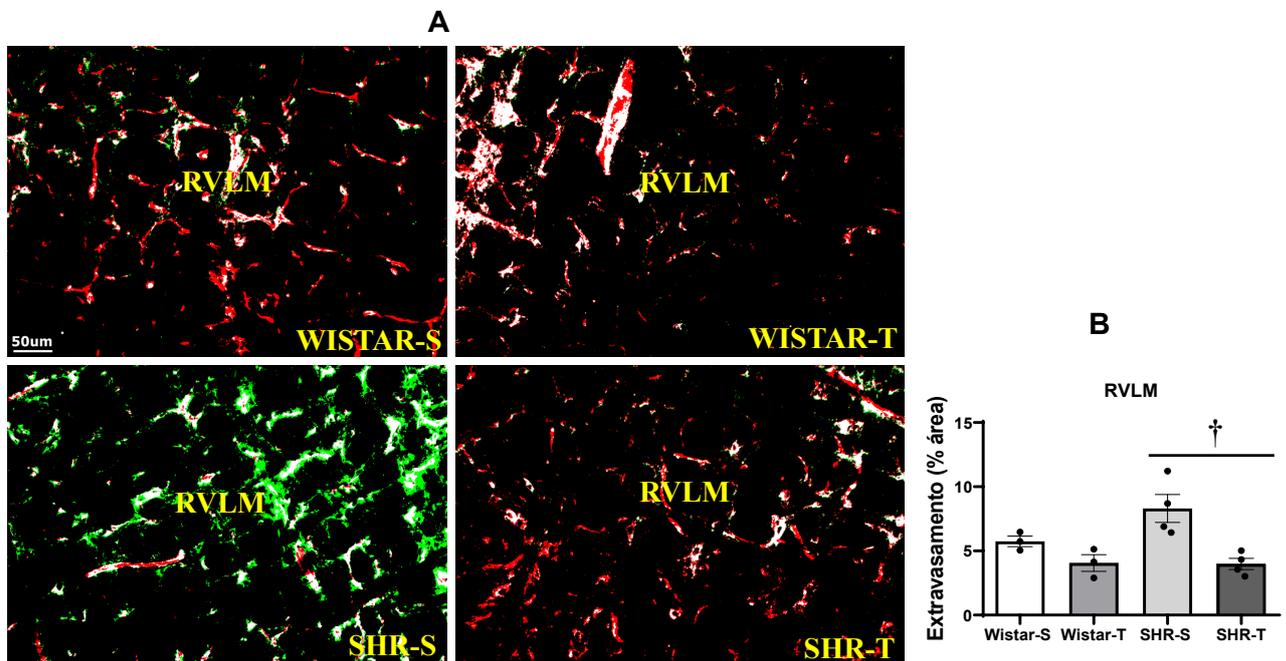


Figura 7 – (A) Fotomicrografias obtidas de 4 ratos representativos dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T ilustrando os capilares do RVLM (marcados em vermelho pela Rodamina-70kDa) e o extravasamento do FITC-10kDa (verde) ao parênquima cerebral apenas na presença de disfunção da BHE. **(B)** Comparação da porcentagem de extravasamento do corante FITC-10kDa no RVLM. (barra de calibração = 50 μ m). n = 5 a 7 cortes/rato, 3-4 ratos/grupo. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.

4.6 Análise ultraestrutural da BHE pela microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 8 ilustra fotomicrografias em diferentes aumentos de um capilar encefálico obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão no PVN de um rato SHR submetido ao treinamento por 4 semanas. As setas indicam alguns dos componentes da BHE que foram analisados e quantificados. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

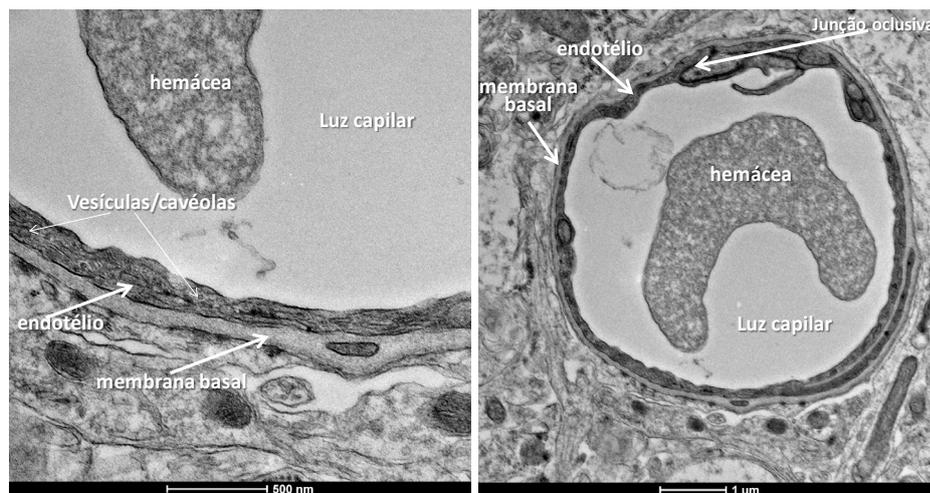


Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de um capilar do PVN de um SHR-T em diferentes aumentos. *À direita*, em menor aumento o capilar em corte transversal (barra de calibração = 1 μm) mostrando a presença da junção oclusiva (região mais escura, correspondente ao depósito de material eletrodense) que ocupa todo o espaçamento entre as bordas de 2 células endoteliais, as quais se apoiam na membrana basal. *À esquerda*, em maior aumento (barra de calibração = 500 nm) detalha a célula endotelial mostrando internamente algumas vesículas/cavéolas de transporte transendotelial.

As alterações induzidas pela hipertensão no calibre de capilares do PVN foram quantificadas pelo perímetro luminal (interno) e abluminal (externo) da célula endotelial e são indicados na Tabela 4. O perímetro interno foi significativamente maior nos hipertensos quando comparado aos normotensos, não sendo em nenhum dos grupos alterado pelo treinamento (SHR-S= 22,81±0,75, SHR-T= 24,46±1,20 vs. Wistar-S = 17,44±0,55, Wistar-T= 18,98±0,87 μm). O perímetro externo também foi significativamente maior no SHR-S comparado ao Wistar-S (25,97±0,87 vs. 19,28±0,58 μm, respectivamente); por sua vez, o treinamento aumentou o perímetro externo nos animais normotensos (21,49±0,98 vs. 19,28±0,58 μm nos Wistar-S). Estas alterações foram confirmadas pela medida do diâmetro dos capilares que mostraram nos hipertensos aumento médio de 31% quando comparados aos normotensos (SHR-S= 7,26±0,24, SHR-T= 7,79±0,38, Wistar-S= 5,55±0,18, Wistar-T= 6,04±0,28 μm) porém sem alteração pelo treinamento aeróbio.

Para calcular a área média ocupada pelos capilares do PVN nos diferentes grupos experimentais, quantificamos a área da luz vascular (perímetro interno) que foi subtraída da área abrangida pelo perímetro externo, resultando na área do capilar propriamente dita (valores indicados na Tabela 4). Quando comparados aos Wistar-S, os SHR-S apresentavam maior área capilar ($12,04 \pm 1,26 \mu\text{m}^2$ vs. $5,63 \pm 0,48 \mu\text{m}^2$, Tabela 4), um valor que foi parcialmente reduzido (-21%, $P > 0,05$) após o treinamento. Embora não significativo, o treinamento determinou resposta inversa nos Wistar-T vs. Wistar-S (+28%, $P > 0,05$, Tabela 4).

Ao analisarmos a espessura da membrana basal verificamos que não houve diferenças entre os SHR-S e Wistar-S ($0,075 \pm 0,004 \mu\text{m}$ e $0,072 \pm 0,002 \mu\text{m}$, respectivamente Tabela 4), contudo os SHR-T apresentaram redução de 15% da espessura da membrana basal quando comparados a seus controles normotensos ($0,064 \pm 0,003 \mu\text{m}$, vs. $0,072 \pm 0,002 \mu\text{m}$ nos Wistar-T).

As fotomicrografias eletrônicas nos permitiram ainda avaliar a porcentagem da cobertura dos capilares pelos pericitos. Nem a hipertensão, nem o treinamento modificam a cobertura dos capilares do PVN pelos pericitos nos SHR (valores na Tabela 4). No entanto, nos ratos normotensos o treinamento foi acompanhado de aumento na cobertura dos pericitos ($42,87 \pm 2,90\%$, correspondendo a um aumento de 36% quando comprado aos Wistar-S).

Tabela 4 – Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do PVN nos 4 grupos experimentais.

	Wistar-S	Wistar -T	SHR-S	SHR-T
Perímetro interno (μm)	$17,44 \pm 0,55$	$18,98 \pm 0,87$	$22,81 \pm 0,75^*$	$24,46 \pm 1,20^*$
Perímetro externo (μm)	$19,28 \pm 0,58$	$21,49 \pm 0,98^\dagger$	$25,97 \pm 0,87^*$	$27,28 \pm 1,23$
Diâmetro da luz capilar (μm)	$5,55 \pm 0,18$	$6,04 \pm 0,28$	$7,26 \pm 0,24^*$	$7,79 \pm 0,38^*$
Área interna (μm^2)	$20,21 \pm 1,22$	$24,61 \pm 2,70$	$32,09 \pm 1,95^*$	$40,34 \pm 3,43^*$
Área externa (μm^2)	$25,84 \pm 1,50$	$33,15 \pm 3,37$	$44,13 \pm 2,47^*$	$51,67 \pm 4,19^*$
Área capilar (μm^2)	$5,63 \pm 0,48$	$7,22 \pm 0,61$	$12,04 \pm 1,26^*$	$9,55 \pm 0,80$
Espessura da MB (μm)	$0,072 \pm 0,002$	$0,080 \pm 0,003$	$0,075 \pm 0,004$	$0,064 \pm 0,003^*$
Cobertura dos pericitos (%)	$31,48 \pm 2,03$	$42,87 \pm 2,90^\dagger$	$28,62 \pm 2,77$	$28,82 \pm 3,08^*$
Borda dos capilares (μm)	$1,39 \pm 0,17$	$0,81 \pm 0,09^\dagger$	$1,25 \pm 0,13$	$1,09 \pm 0,12$
Comprimento das JOs (μm)	$0,54 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,07$	$0,74 \pm 0,10$
Junção oclusiva/borda capilar (%)	$40,17 \pm 3,65$	$72,14 \pm 4,45^\dagger$	$46,75 \pm 4,19$	$67,00 \pm 6,32^\dagger$
Vesículas totais/capilar (n)	$4,69 \pm 0,43$	$3,00 \pm 0,46$	$8,03 \pm 1,00^*$	$3,61 \pm 0,60^\dagger$
Vesículas luminais/capilar (n)	$1,88 \pm 0,26$	$2,24 \pm 0,37$	$3,23 \pm 0,36^*$	$1,35 \pm 0,23^\dagger$
Vesículas luminais/um (n)	$0,110 \pm 0,015$	$0,119 \pm 0,018$	$0,141 \pm 0,015$	$0,067 \pm 0,015^\dagger$
Vesículas abluminais/capilar (n)	$2,81 \pm 0,34$	$0,76 \pm 0,20^\dagger$	$5,14 \pm 0,88^*$	$2,26 \pm 0,43^\dagger$
Vesículas abluminais/um (n)	$0,152 \pm 0,019$	$0,048 \pm 0,014^\dagger$	$0,208 \pm 0,038$	$0,101 \pm 0,022^\dagger$

Valores são média \pm EPM e foram obtidos em 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. MB= Membrana basal; JO= Junção Oclusiva. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar, \dagger vs S.

Para análise do transporte transcelular no PVN foram contados em todos os capilares analisados, o número de vesículas em formação e/ou ainda “presas” na face luminal e abluminal do endotélio, as quais foram normalizadas pela quantificação do respectivo perímetro. Este cuidado evitou erros de medida, uma vez dada a aparência similar, poderíamos confundir outras estruturas circulares (endossomos, exossomos, lisossomos, por exemplo) com as vesículas transcitóticas. A Figura 9A ilustra e compara a ocorrência de vesículas transcitóticas em capilares do PVN de ratos representativos dos quatro grupos experimentais, mostrando que a proporção de vesículas nos SHR-S é bem maior que a de seu controle normotenso e que o treinamento determina redução das mesmas nos 2 grupos, com efeito mais intenso nos SHR-T. Os valores obtidos nestas contagens são apresentados na Tabela 4 e comparados na Figura 9B. Verificamos que os capilares do PVN dos SHR-S possuíam maior número de vesículas totais ($8,03 \pm 1,00$ vesículas/capilar), que os dos Wistar-S ($4,69 \pm 0,43$ vesículas/capilar), correspondendo a um aumento de 71%, e, que o treinamento determinou nos hipertensos, significativa redução e normalização do número de vesículas/capilar (de $8,03 \pm 1,00$ nos SHR-T para $3,61 \pm 0,60$ vesículas/capilar nos SHR-S, Tabela 4, Figura 9B). Não houve diferença significativa nos Wistar-T vs Wistar-S. O mesmo padrão foi observado quando analisamos separadamente o número de vesículas luminiais e abluminiais por capilar (Tabela 4). Ao avaliarmos a ocorrência de vesículas por μm da borda luminal e abluminal também observamos redução significativa de sua ocorrência nos SHR-T vs. SHR-S, mas as diferenças entre SHR-S e Wistar-S foram menos evidentes.

PVN

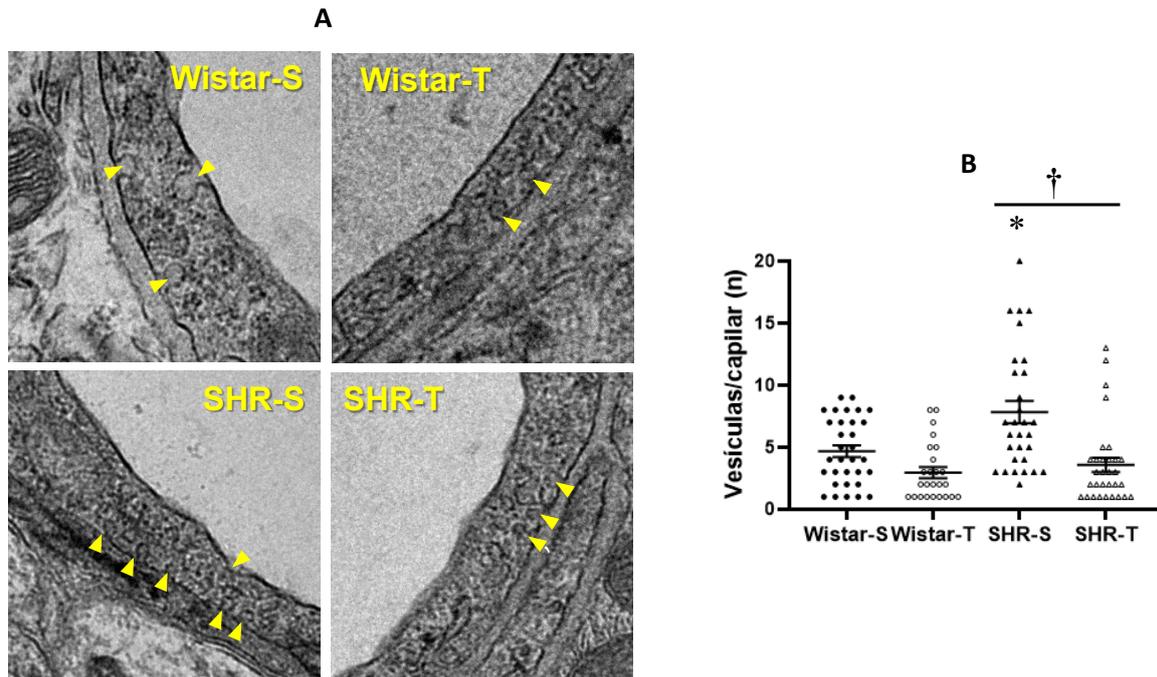


Figura 9 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no PVN. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. **(B)** Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25-30$ capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar † vs. S.

A comparação entre Wistar-T e Wistar-S apenas indicou redução significativa das vesículas abluminiais após o treinamento aeróbico (Tabela 4). Portanto, a hipertensão cursa com aumento significativo do número de vesículas transcitóticas e o exercício determina importante redução e normalização da ocorrência de vesículas nos SHR-T.

Nosso outro objetivo era analisar se a hipertensão e o treinamento aeróbico alteravam ou não as junções oclusivas (JO) que limitam o transporte paracelular através da BHE. A Figura 10A ilustra e compara a ocorrência e a extensão das junções oclusivas em capilares do PVN. Para esta análise quantificamos a extensão da borda de contato entre 2 células endoteliais e a extensão das JO, calculando a porcentagem da borda capilar ocupada pela JO (valores na Tabela 4). Não houve entre os grupos alterações significativas na extensão das junções oclusivas, mas a borda de contato entre os capilares apresentava-se ligeiramente menor nos SHR-T e reduzida nos Wistar-T vs, respectivos controles, de forma que porcentagem de ocupação das bordas entre capilares pelas JO foi aumentada pelo treinamento aeróbico em ambos os grupos: de $46,75 \pm 4,19\%$ nos SHR-S para $67,00 \pm 6,32\%$ nos SHR-T e de $40,17 \pm 3,65\%$ nos Wistar-S para $72,14 \pm 4,45\%$ Wistar-T (Tabela 4, Figura 10B).

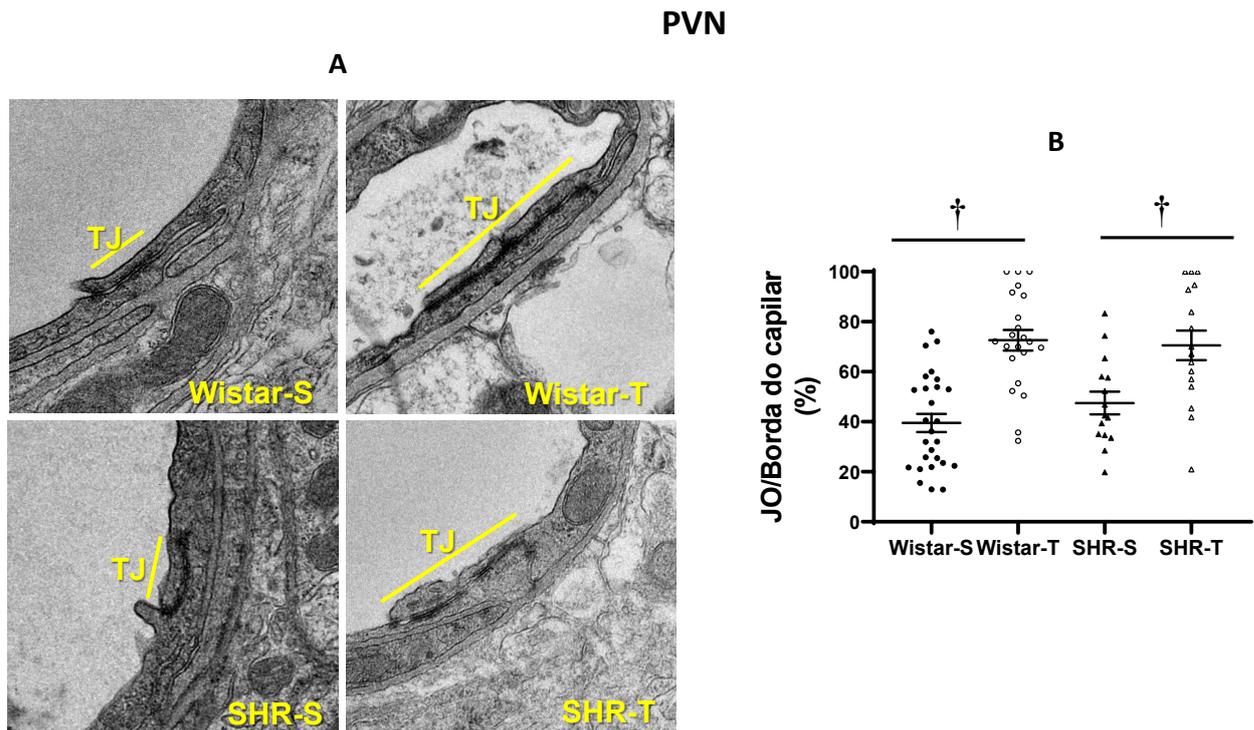


Figura 10- Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação das bordas entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do PVN. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). **(B)** Comparação da porcentagem de ocupação das bordas celulares pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 25/30 capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias (P < 0,05) * vs. Wistar † vs. S.

Também analisamos alterações ultraestruturais em capilares do NTS (Tabela 5). À semelhança do PVN, os perímetros interno e externo, e o diâmetro da luz capilar encontravam-se significativamente elevados nos SHR-S quando comparados aos Wistar-S. No entanto, esses valores não se mantiveram elevados nos SHR-T vs. SHR-S (Tabela 5). Houve também nos SHR-S aumento da área ocupada pelo capilar ($10,18 \pm 1,09 \mu\text{m}^2$ vs. $7,02 \pm 0,65 \mu\text{m}^2$ nos Wistar-S), a qual foi significativamente reduzida pelo treinamento (SHR-T = $6,24 \pm 0,71 \mu\text{m}^2$, Tabela 5). A espessura da membrana basal dos capilares do NTS não foi alterada pela hipertensão, mas aumentada pelo treinamento apenas no grupo Wistar-T ($0,090 \pm 0,004 \mu\text{m}$, correspondendo a um aumento de 32% quando comparada aos Wistar-S). O mesmo padrão de resposta foi apresentado pela cobertura dos capilares pelos pericitos: não alterada pela hipertensão, mas aumentada pelo treinamento apenas nos Wistar-T (+64% vs. Wistar-S, Tabela 5).

Tabela 5 - Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do NTS nos 4 grupos experimentais.

	Wistar-S	Wistar -T	SHR-S	SHR-T
Perímetro interno (μm)	17,17 \pm 0,49	18,51 \pm 0,67	19,73 \pm 0,85*	17,27 \pm 0,53
Perímetro externo (μm)	19,49 \pm 0,52	21,43 \pm 0,75	22,77 \pm 0,99*	19,42 \pm 0,61†
Diâmetro da luz capilar (μm)	5,46 \pm 0,16	5,89 \pm 0,22	6,28 \pm 0,27*	5,50 \pm 0,17
Área interna (μm^2)	20,23 \pm 1,33	20,94 \pm 2,09	28,66 \pm 2,74*	21,86 \pm 1,32
Área externa (μm^2)	27,25 \pm 1,57	30,09 \pm 2,52	38,84 \pm 3,44*	28,10 \pm 1,66†
Área capilar (μm^2)	7,02 \pm 0,65	9,15 \pm 0,86	10,18 \pm 1,09*	6,24 \pm 0,71†
Espessura da MB (μm)	0,068 \pm 0,003	0,090 \pm 0,004†	0,061 \pm 0,002	0,073 \pm 0,006*
Cobertura dos pericitos (%)	24,42 \pm 2,04	40,03 \pm 4,00†	25,97 \pm 3,48	25,38 \pm 2,56*
Borda dos capilares (μm)	0,87 \pm 0,10	1,13 \pm 0,12	1,32 \pm 0,16	1,06 \pm 0,12
Comprimento das JOs (μm)	0,43 \pm 0,06	0,71 \pm 0,06†	0,53 \pm 0,10	0,68 \pm 0,08
Junção oclusiva/borda capilar (%)	45,73 \pm 5,28	65,93 \pm 4,0†	38,63 \pm 4,09	64,47 \pm 4,18†
Vesículas totais/capilar (n)	4,93 \pm 0,63	3,96 \pm 0,57	7,29 \pm 0,98	4,13 \pm 0,60†
Vesículas luminais/capilar (n)	2,41 \pm 0,42	1,48 \pm 0,24	2,07 \pm 0,27	0,94 \pm 0,19†
Vesículas luminais/um (n)	0,125 \pm 0,021	0,080 \pm 0,012	0,106 \pm 0,014	0,061 \pm 0,014
Vesículas abluminais/capilar (n)	2,52 \pm 0,48	2,61 \pm 0,54	5,21 \pm 0,94*	3,19 \pm 0,56
Vesículas abluminais/um (n)	0,136 \pm 0,027	0,145 \pm 0,034	0,226 \pm 0,036	0,166 \pm 0,028

Valores são média \pm EPM e foram obtidos em 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo MB= Membrana basal; JO= Junção oclusiva. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.

A Figura 11A ilustra e compara a ocorrência de vesículas transcitóticas em capilares do NTS de ratos representativos dos quatro grupos experimentais, mostrando que a proporção de vesículas nos SHR-S foi bem maior que a de seu controle normotenso e que o treinamento determinou redução das mesmas nos 2 grupos, com efeito mais intenso nos SHR-T. Dados quantitativos (Tabela 5, Figura 11B) mostram que os SHR-S também apresentaram maior número de vesículas/capilar quando comparados aos respectivos controles (7,29 \pm 0,98 vs. 4,93 \pm 0,63 vesículas/capilar nos Wistar-S) e que o treinamento reduziu o número destas vesículas nos SHR-T (4,13 \pm 0,60 vesículas/capilar, correspondendo a uma redução de 43%), sem a alteração no grupo Wistar-T. Ao analisarmos separadamente o número de vesículas da superfície luminal e abluminal (Tabela 5), verificamos que o treinamento foi eficiente em reduzir as vesículas luminais nos SHR-T (0,94 \pm 0,19 vs. 2,07 \pm 0,27 vesículas/capilar nos SHR-S), mas não alterou significativamente as vesículas abluminais que se encontraram com maior expressão nos SHR-S (5,21 \pm 0,94 vs. 2,52 \pm 0,48 vesículas/capilar nos Wistar-S). Quando a expressão das vesículas foi normalizada pela extensão da borda luminal e abluminal, não verificamos diferenças significativas intra e inter os grupos (Tabela 5).

NTS

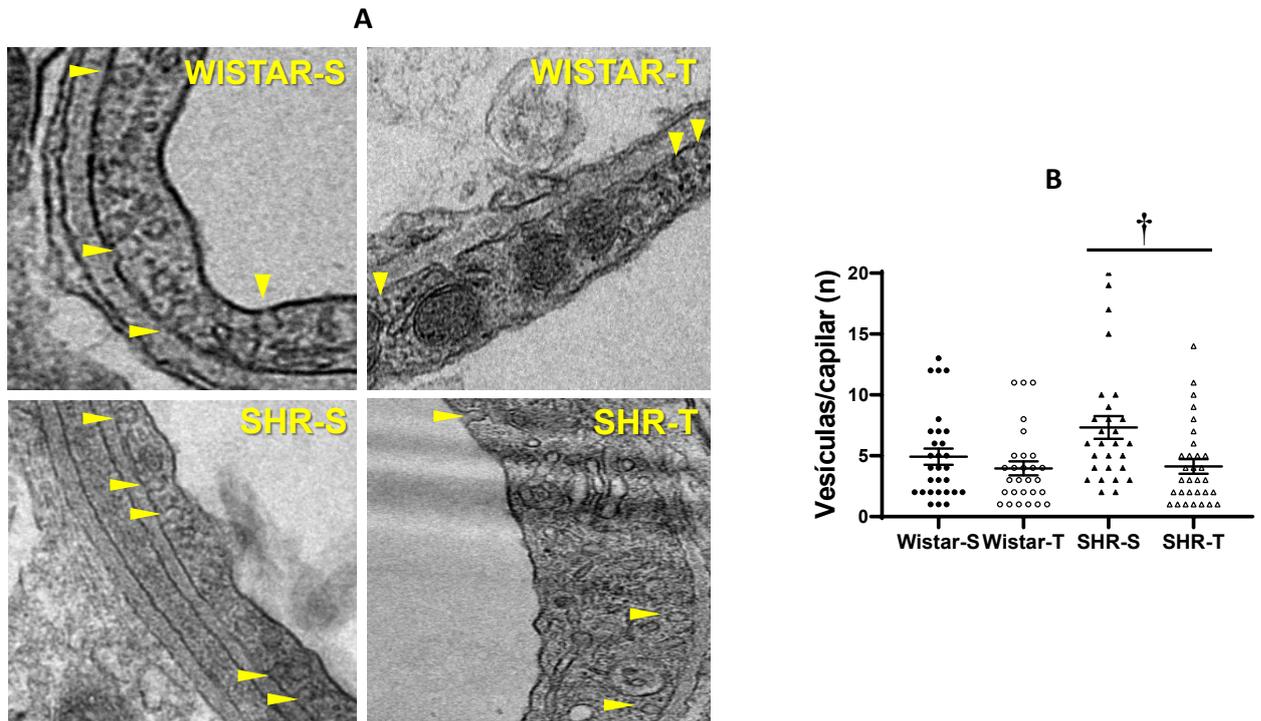


Figura 11 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no NTS. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. **(B)** Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25-30$ capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar † vs. S.

A Figura 12A ilustra e compara para os 4 grupos experimentais a ocorrência e a extensão das junções oclusivas em capilares do NTS. A extensão das junções oclusivas apresentava-se aumentada nos Wistar-T vs. Wistar-S ($0,71 \pm 0,06$ vs. $0,43 \pm 0,06$ μm , respectivamente) e ligeiramente maior nos SHR-T vs. SHR-S ($P > 0,05$), sem alterações na extensão da borda de contato entre os capilares, de forma que a porcentagem de ocupação das bordas entre capilares pelas junções oclusivas foi significativamente aumentada pelo treinamento aeróbio em ambos os grupos: de $38,63 \pm 4,0$ % nos SHR-S para $64,47 \pm 4,1$ % nos SHR-T e de $45,73 \pm 5,2$ % nos Wistar-S para $65,93 \pm 4,0$ % nos Wistar-T (Tabela 5, Figura 12B).

NTS

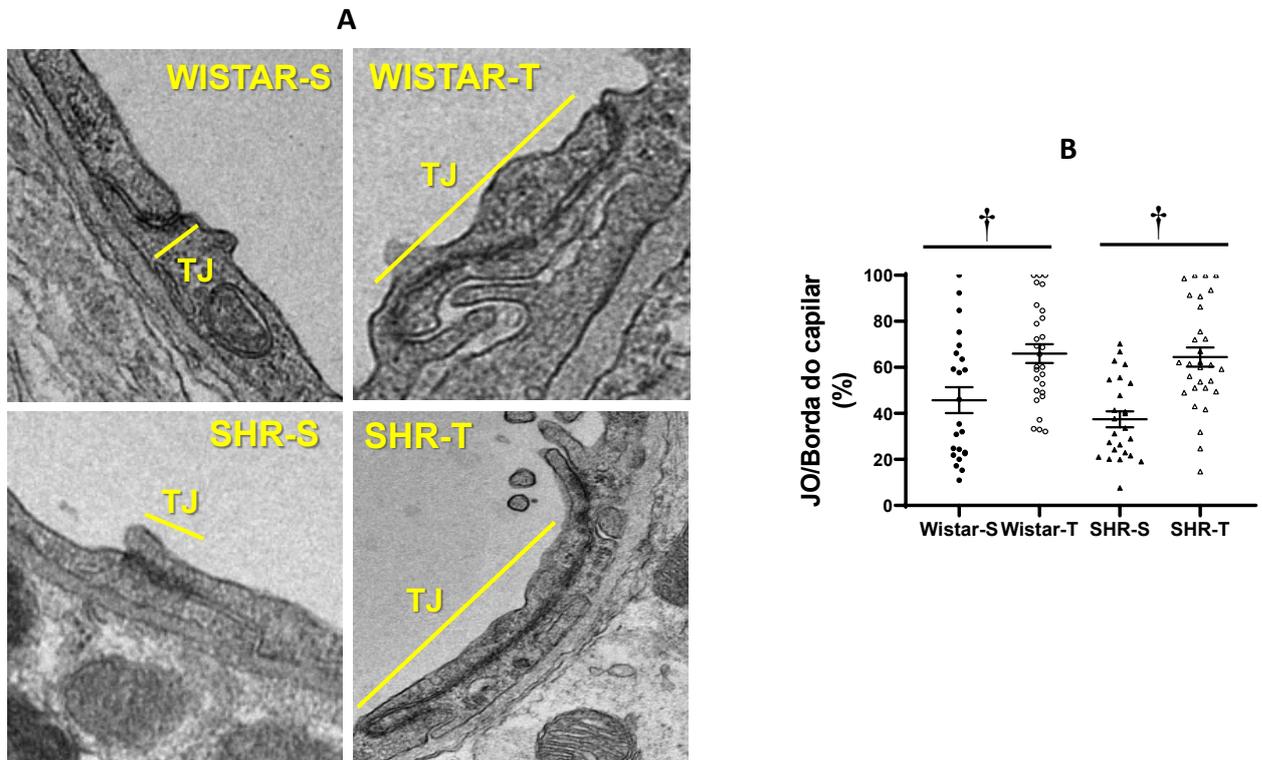


Figura 12- Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação da borda entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do NTS. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). **(B)** Comparação da porcentagem de ocupação das bordas celulares pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25/30$ capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar † vs. S.

As alterações ultraestruturais em capilares do RVLM também foram analisadas (Tabela 6). À semelhança do PVN e do NTS, o perímetro interno e externo e o diâmetro da luz capilar encontravam-se significativamente elevados nos SHR-S quando comparados aos Wistar-S. No entanto, esses valores não se mantiveram elevados nos SHR-T vs. SHR-S (Tabela 6). Houve nos SHR-S aumentos na área interna e externa dos capilares, mas a diferença entre elas indicativa da área do capilar propriamente dito, não mostrou aumento significativo quando comparado aos Wistar-S. Por outro lado, quando comparados aos respectivos controles, o treinamento aumentou a área dos capilares do RVLM nos Wistar-T, sem alterar nos SHR-T (dados na Tabela 6). A espessura da membrana basal dos capilares do RVLM encontrava-se reduzida em 19% em ambos os grupos hipertensos quando comparados aos respectivos controles normotensos, não sendo em nenhum dos grupos alterada pelo treinamento aeróbio (Tabela 6). Quanto à cobertura dos capilares do RVLM pelos pericitos não observamos alterações nem pela hipertensão, nem pelo treinamento físico.

Tabela 6 - Dados quantitativos da ultraestrutura de capilares do RVLM nos 4 grupos experimentais.

	Wistar-S	Wistar -T	SHR-S	SHR-T
Perímetro interno (μm)	15,69 \pm 0,43	16,04 \pm 0,44	18,29 \pm 0,66*	16,95 \pm 0,73
Perímetro externo (μm)	17,75 \pm 0,49	19,02 \pm 0,50	20,27 \pm 0,71*	18,64 \pm 0,78
Diâmetro da luz capilar (μm)	4,99 \pm 0,14	5,11 \pm 0,14	5,82 \pm 0,21*	5,40 \pm 0,23
Área interna (μm^2)	17,66 \pm 1,04	16,56 \pm 1,25	24,54 \pm 1,82*	21,38 \pm 2,01
Área externa (μm^2)	23,21 \pm 1,33	24,71 \pm 1,61	30,82 \pm 2,22*	26,74 \pm 2,30
Área capilar (μm^2)	5,55 \pm 0,60	8,16 \pm 0,84†	6,28 \pm 0,59	5,35 \pm 0,46*
Espessura da MB (μm)	0,072 \pm 0,002	0,078 \pm 0,002	0,058 \pm 0,002*	0,063 \pm 0,003*
Cobertura dos pericitos (%)	32,92 \pm 2,16	25,96 \pm 2,03	27,52 \pm 2,69	33,96 \pm 3,13
Borda dos capilares (μm)	1,28 \pm 0,16	1,11 \pm 0,11	1,22 \pm 0,22	1,30 \pm 0,26
Comprimento das JOs (μm)	0,71 \pm 0,11	0,77 \pm 0,09	0,78 \pm 0,17	0,90 \pm 0,16
Junção oclusiva/borda capilar (%)	54,76 \pm 3,94	70,66 \pm 4,47	59,64 \pm 5,11	71,25 \pm 5,19
Vesículas totais/capilar (n)	4,53 \pm 0,59	4,13 \pm 0,50	7,44 \pm 0,85*	3,96 \pm 0,77†
Vesículas luminais/capilar (n)	1,65 \pm 0,30	1,34 \pm 0,25	1,44 \pm 0,23	0,67 \pm 0,21
Vesículas luminais/um (n)	0,105 \pm 0,018	0,084 \pm 0,016	0,078 \pm 0,013	0,039 \pm 0,012
Vesículas abluminais/capilar (n)	2,88 \pm 0,50	2,83 \pm 0,38	6,00 \pm 0,78*	3,29 \pm 0,71†
Vesículas abluminais/um (n)	0,158 \pm 0,026	0,152 \pm 0,020	0,313 \pm 0,049*	0,181 \pm 0,036†

Valores são média \pm EPM e foram obtidos em 25-30 capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo MB= Membrana basal; JO= Junção oclusiva. Significâncias (P <0,05) * vs. Wistar, † vs S.

A Figura 13A ilustra e compara a ocorrência de vesículas transcitóticas em capilares do RVLM de ratos representativos dos quatro grupos experimentais. De forma análoga ao observados no PVN e NTS, a proporção de vesículas nos SHR-S encontrava-se aumentada quando comparada a seu controle normotenso, mas foi reduzida em ambos os grupos experimentais, com efeito mais intenso nos SHR-T. Dados quantitativos (Tabela 6, Figura 13B) mostram que os SHR-S apresentaram maior número de vesículas/capilar quando comparados aos respectivos controles (7,44 \pm 0,85 vs. 4,53 \pm 0,59 vesículas/capilar nos Wistar-S) e que o treinamento reduziu o número destas vesículas nos SHR-T (3,96 \pm 0,77 vesículas/capilar, correspondendo a uma redução de 47%), sem alterar significativamente no grupo Wistar-T. Nos capilares do RVLM o aumento das vesículas totais observado nos SHR-S bem como sua redução pelo treinamento foram determinados principalmente pelas alterações das vesículas abluminais (+108% nos SHR-S vs. Wistar-S e -45% nos SHR-T vs. SHR-S, Tabela 6). Em relação às vesículas luminais não identificamos diferenças significativas nem pela hipertensão, nem pelo treinamento aeróbio (Tabela 6).

RVLM

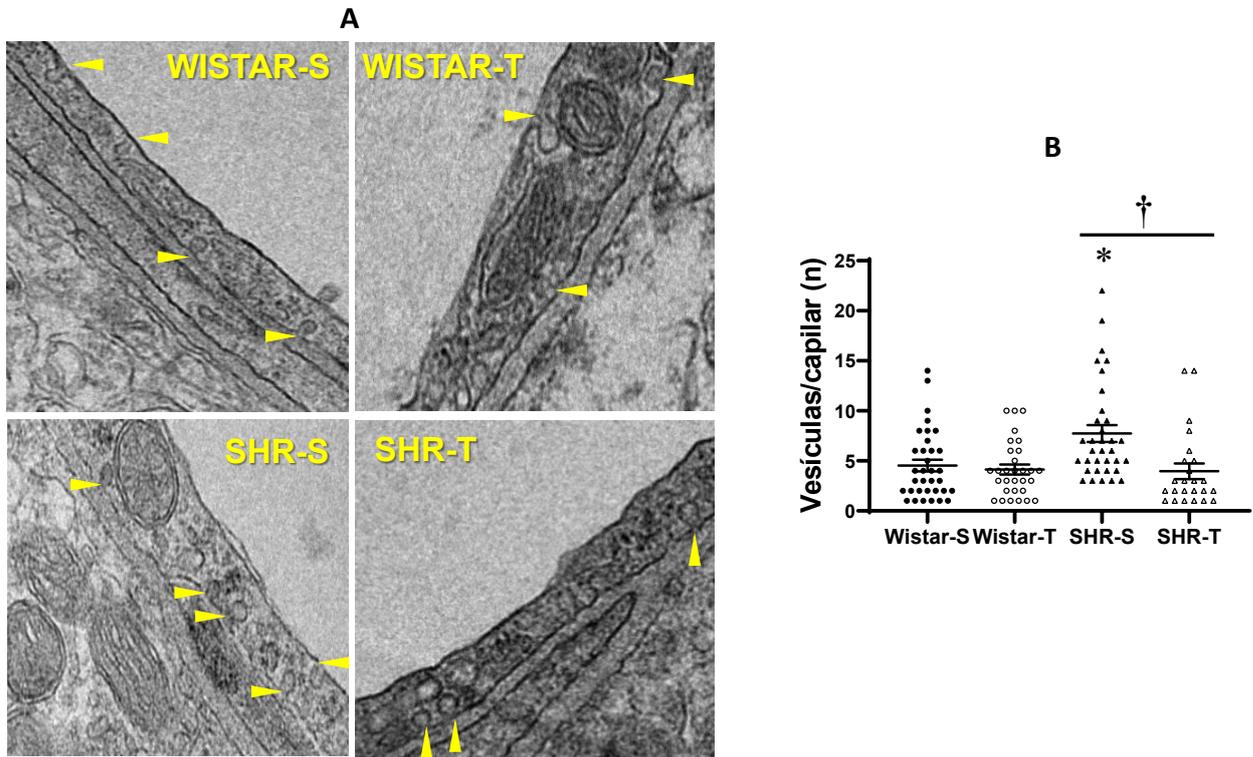


Figura 13 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre o número de vesículas totais por capilar no RVLM. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando as vesículas (setas amarelas) em formação nas bordas luminal e abluminal. **(B)** Comparação do número total de vesículas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25-30$ capilares/grupo quantificados em 3 ratos/grupo. Significâncias ($P < 0,05$) * vs. Wistar † vs. S.

A Figura 14A ilustra e compara para os 4 grupos experimentais a ocorrência e a extensão das junções oclusivas em capilares do RVLM. Observamos pouca diferença na extensão das junções oclusivas entre SHR-S e Wistar-S, mas aumento da extensão das mesmas nos grupos treinados. Dados quantitativos (Tabela 6, Figura 14B) mostraram que a hipertensão não alterou a porcentagem de ocupação das bordas entre capilares pelas junções oclusivas, mas o treinamento a aumentou em 19% nos SHR-T (de $59,64 \pm 5,11\%$ para $71,25 \pm 5,19\%$) e em 29% nos Wistar-T (de $54,76 \pm 3,94\%$ para $70,66 \pm 4,47\%$). Houve alteração significativa do fator condição, mas a comparação entre os 4 grupos experimentais não atingiu níveis de significância provavelmente devido à elevada variabilidade dos valores.

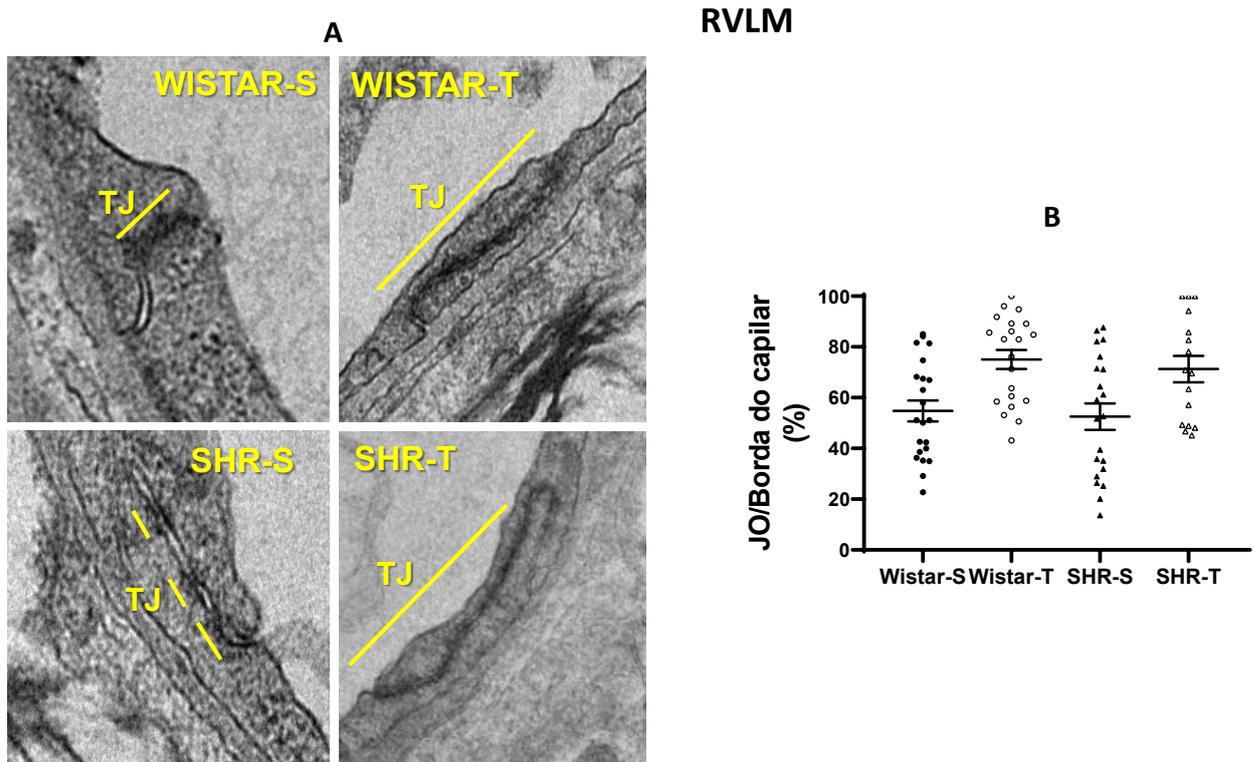


Figura 14 - Comparação dos efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a porcentagem de ocupação da borda entre 2 células endoteliais pela junção oclusiva (TJ) em capilares do RVLM. **(A)** Fotomicrografias de animais representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a extensão das TJ (barras amarelas). **(B)** Comparação da porcentagem de ocupação da borda celular pelas junções oclusivas nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25/30$ capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo.

Sabendo-se que os pericitos além de secretar substâncias que interferem com estrutura/atividade da BHE, podem modificar o fenótipo contrátil dos capilares encefálicos, e, tendo observado nas áreas estudadas algumas alterações na extensão da cobertura dos capilares pelos pericitos, comparamos na Figura 15 os efeitos da hipertensão e da atividade física regular sobre a extensão de cobertura em capilares no PVN, NTS e RVLM por pericitos (Figura 15). Em todas as áreas a hipertensão não alterou a porcentagem de cobertura dos capilares pelos pericitos, mas o treinamento aeróbio foi eficaz em aumentar significativamente no PVN (de $31,48 \pm 2,03\%$ para $42,87 \pm 2,90\%$) e no NTS (de $24,42 \pm 2,04\%$ para $40,03 \pm 4,00\%$), sem a alterar no RVLM, dos ratos normotensos (Figura 15). De forma oposta ao observado nos ratos normotensos o treinamento físico não foi capaz de alterar em nenhuma das áreas autonômicas a extensão da cobertura dos capilares pelos pericitos nos ratos hipertensos (Figura 15, dados quantitativos nas Tabelas 4, 5 e 6).

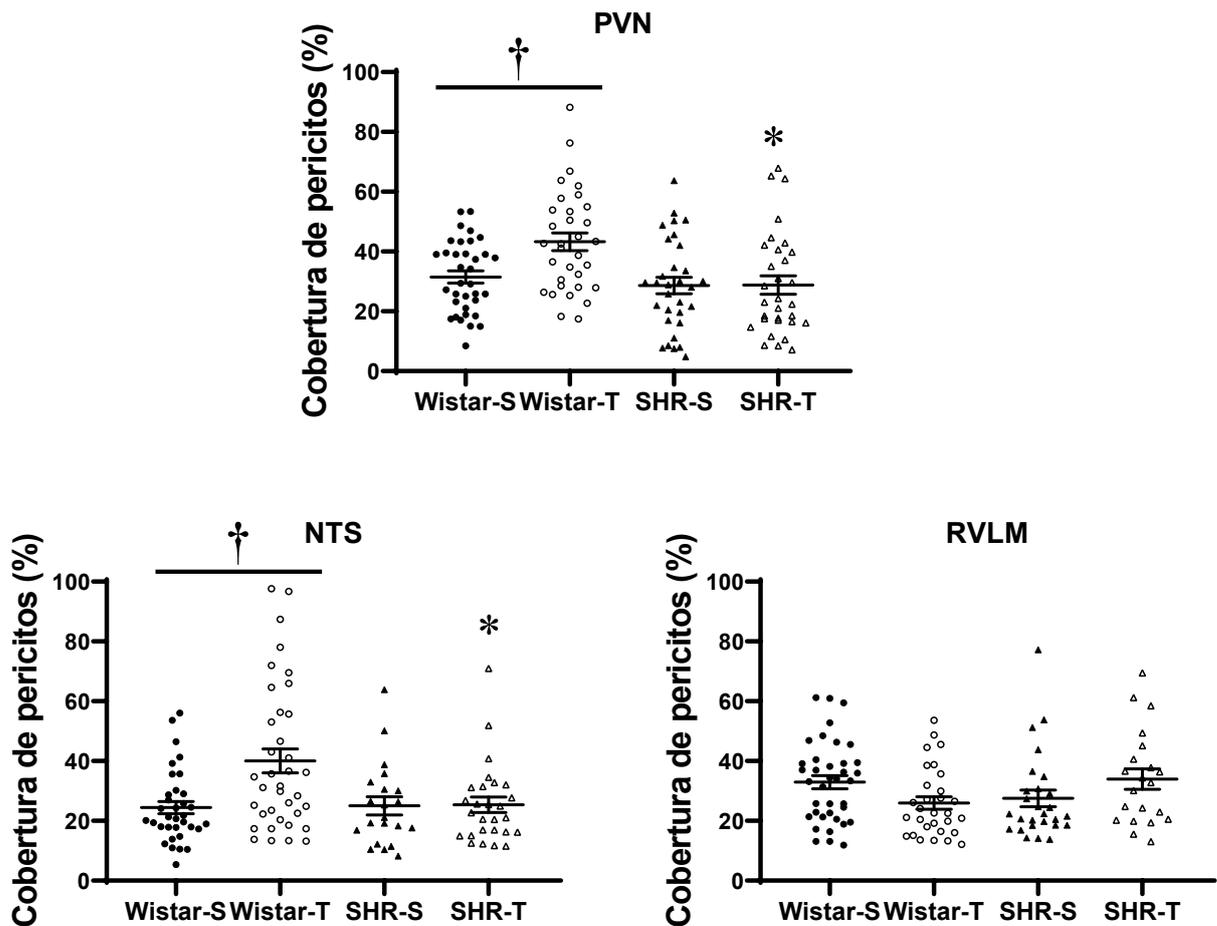


Figura 15 - Comparação da porcentagem de cobertura pelos pericitos em capilares do PVN, NTS e RVLM nos 4 grupos experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). $n = 25/30$ capilares/grupo, quantificados em 3 ratos/grupo. Significância ($P < 0,05$) † vs. S.

4.7 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbico sobre a expressão de caveolina-1 no PVN

Com a intenção de validar nossa técnica para a contagem apenas das vesículas transcelulares (e não de outras não diretamente envolvidas nesse tipo de transporte) e para confirmar as respostas obtidas investigarmos as alterações induzidas pela hipertensão e exercício sobre a expressão de caveolina-1, a principal proteína constituinte das vesículas transcelulares. Para tanto os encéfalos de alguns animais dos grupos Wistar-S, Wistar-T, SHR-S e SHR-T foram processados pela imunofluorescência de dupla marcação para a RECA-1 que marca o endotélio dos capilares encefálicos (vermelho) e para quantificação da expressão proteica de caveolina-1 (verde).

A Figura 16A compara as imagens de microscopia de fluorescência em animais representativos dos 4 grupos experimentais. Observamos que a coloração verde é mais intensa

nos SHR-S, indicando maior expressão de caveolina-1 neste grupo experimental. Esta observação foi confirmada pela quantificação da densidade integrada da caveolina-1 como indicado na Figura 16B: a hipertensão foi acompanhada de importante aumento na expressão de caveolina-1 ($139,25 \pm 10,50$ nos SHR-S vs. $86,27 \pm 7,74$ ua. nos Wistar-S, correspondendo a um aumento de 61%). Por sua vez, o treinamento aeróbio foi eficaz em reduzir e normalizar a densidade de caveolina-1 ($81,18 \pm 5,78$ ua nos SHR-T), sem alterar nos Wistar-T. Este padrão em tudo reproduziu os efeitos da hipertensão e treinamento aeróbio observado sobre a contagem das vesículas transcitóticas como documentado pela comparação das Figuras 16B e 9B.

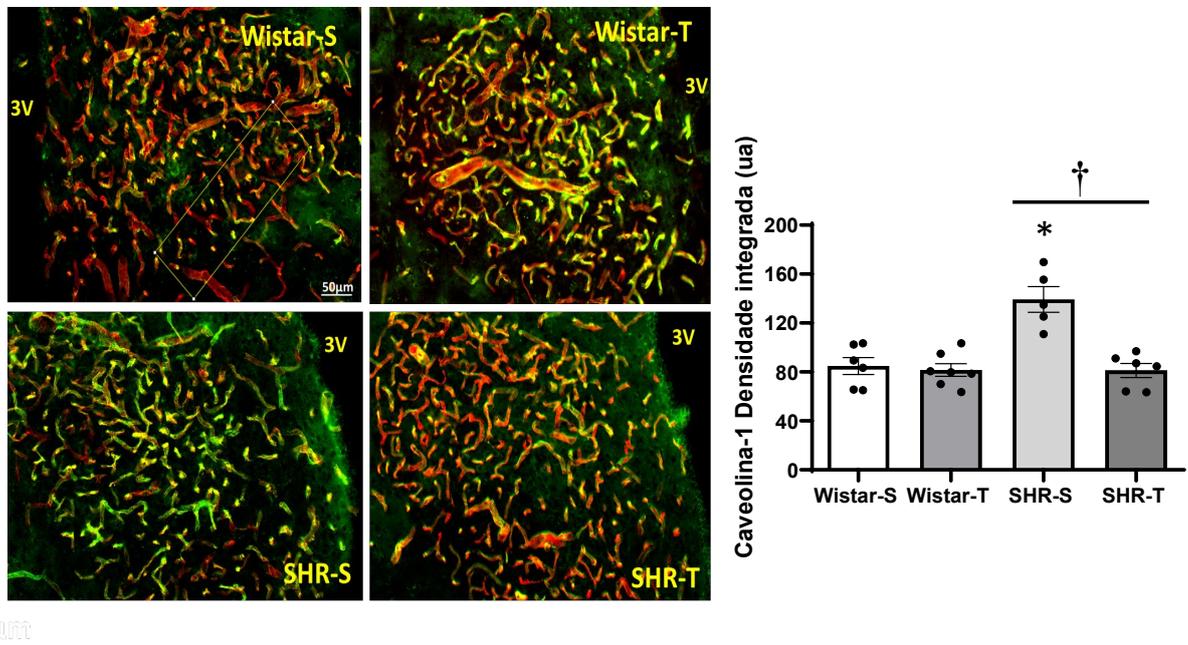


Figura 16 - (A) Fotomicrografias do PVN obtidas de ratos representativos dos 4 grupos experimentais ilustrando a expressão de caveolina-1 (verde) nos capilares do PVN (RECA-1, vermelho) e a colocação de ambas (amarelo). Barra de calibração = 50µm, 3V, terceiro ventrículo cerebral. **(B)** Comparação da densidade integrada de caveolina-1 no PVN dos grupos 4 experimentais ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). n = 5-7 cortes/rato, 5-7 ratos/grupo. Significâncias (P < 0,05) * vs. Wistar, † vs S.

4.8 Correlações entre o extravasamento do FITC-10kDa, vesículas transcelulares e parâmetros autonômicos

Para avaliar se as alterações induzidas pela hipertensão e treinamento aeróbio na ultraestrutura e funcionalidade da BHE contribuíam ou não para a disfunção autonômica na hipertensão e sua correção após treinamento, correlacionamos a ocorrência de vesículas transcelulares no PVN, NTS e RVLM com a permeabilidade da BHE, assim como a permeabilidade da barreira com os parâmetros autonômicos. As Figuras 17, 18 e 19 ilustram

essas correlações para o PVN, NTS e RLLM, respectivamente e a Tabela 7 apresenta as retas de regressão linear, os coeficientes de correlação e valores de P obtidos.

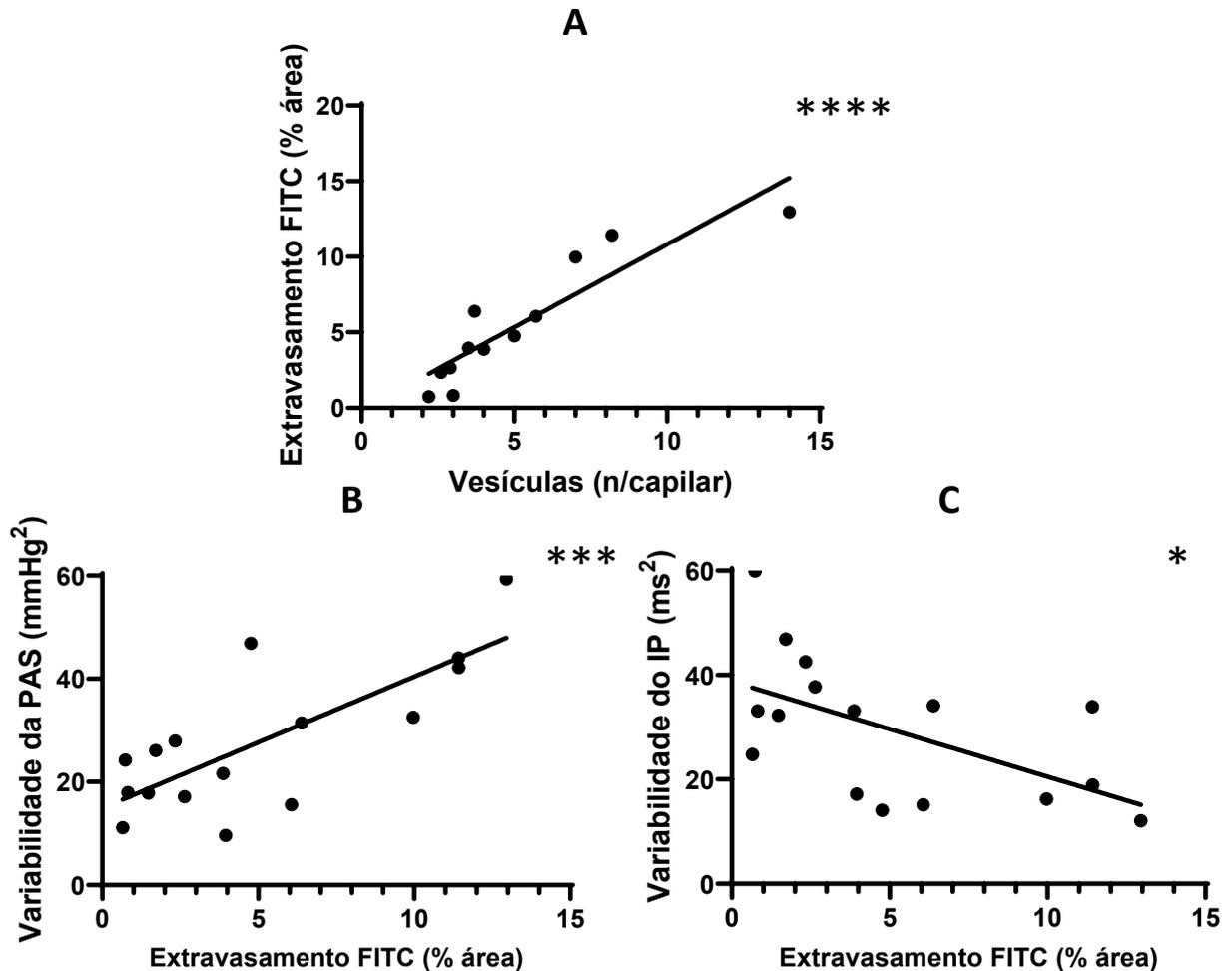


Figura 17 - Equações de regressão linear correlacionando no PVN o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral (A) e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, B) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, C). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 7. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Observamos uma forte correlação positiva ($r = 0,905$) entre a ocorrência de vesículas em capilares do PVN e o extravasamento de FITC-10kDa observado nesta área, indicando que o extravasamento do FITC para o parênquima cerebral é mediado pela transcitose vesicular (Figura 17, Tabela 7). Por sua vez, o extravasamento do FITC-10kDa correlacionou-se positivamente com a variabilidade da PAS e negativamente com a variabilidade do IP, demonstrando que a elevada permeabilidade da BHE na hipertensão assim como sua correção pelo exercício repetitivo, determinadas pela maior ou menor transcitose, são os mecanismos que contribuem sobremaneira para a disfunção autonômica na hipertensão e sua correção após o treinamento aeróbio (Figura 17, Tabela 7).

Tabela 7 - Coeficientes de correlação (r), valores de P e equações de regressão linear correlacionando para a 3 áreas estudadas as alterações induzidas pela hipertensão e treinamento aeróbio sobre o número de vesículas transcitóticas e o extravasamento do FITC-10kDa e sobre o extravasamento do FITC e as variabilidades da pressão arterial sistólica (Var. PAS) intervalo de pulso (Var. IP).

Vesículas x Extravasamento FITC	Equação de regressão linear	r	P
PVN	$Y = 1,10 x - 0,16^{****}$	0,905	<0,0001
NTS	$Y = 1,40 x - 1,66^{**}$	0,808	0,0015
RVLM	$Y = 1,12 x + 0,44^{**}$	0,743	0,0056
Extravasamento FITC x Var. PAS			
PVN	$Y = 2,55 x + 14,91^{***}$	0,761	0,0006
NTS	$Y = 3,17 x + 10,94^{***}$	0,776	0,0004
RVLM	$Y = 3,85 x + 5,50^*$	0,617	0,0143
Extravasamento FITC x Var. IP			
PVN	$Y = -1,82 x + 38,74^*$	-0,567	0,0220
NTS	$Y = -2,46 x + 42,63^{**}$	-0,628	0,0091
RVLM	$Y = -3,16 x + 48,03^*$	-0,607	0,0127

Significâncias são: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$.

Em relação ao NTS (Figura 18, Tabela 7), também observamos forte correlação positiva ($r = 0,808$ - ligeiramente menor que a observada para o PVN) entre o número de vesículas/capilar e o extravasamento do FITC-10kDa quantificado nesta área, indicando ser a transcitose vesicular o mecanismo responsável pelo extravasamento do corante de baixo peso molecular ao parênquima do NTS. Da mesma forma que o observado para o PVN, houve correlações significantes entre alterações na permeabilidade da BHE com ambas, a variabilidade da PAS (correlação positiva) e a variabilidade do IP (correlação negativa). Estes dados reforçam nossa observação de que a disfunção autonômica na hipertensão e sua correção após treinamento aeróbio são condicionadas por alterações para mais e para menos do transporte transcelular e a consequente alteração da permeabilidade da BHE (Figura 18, Tabela 7).

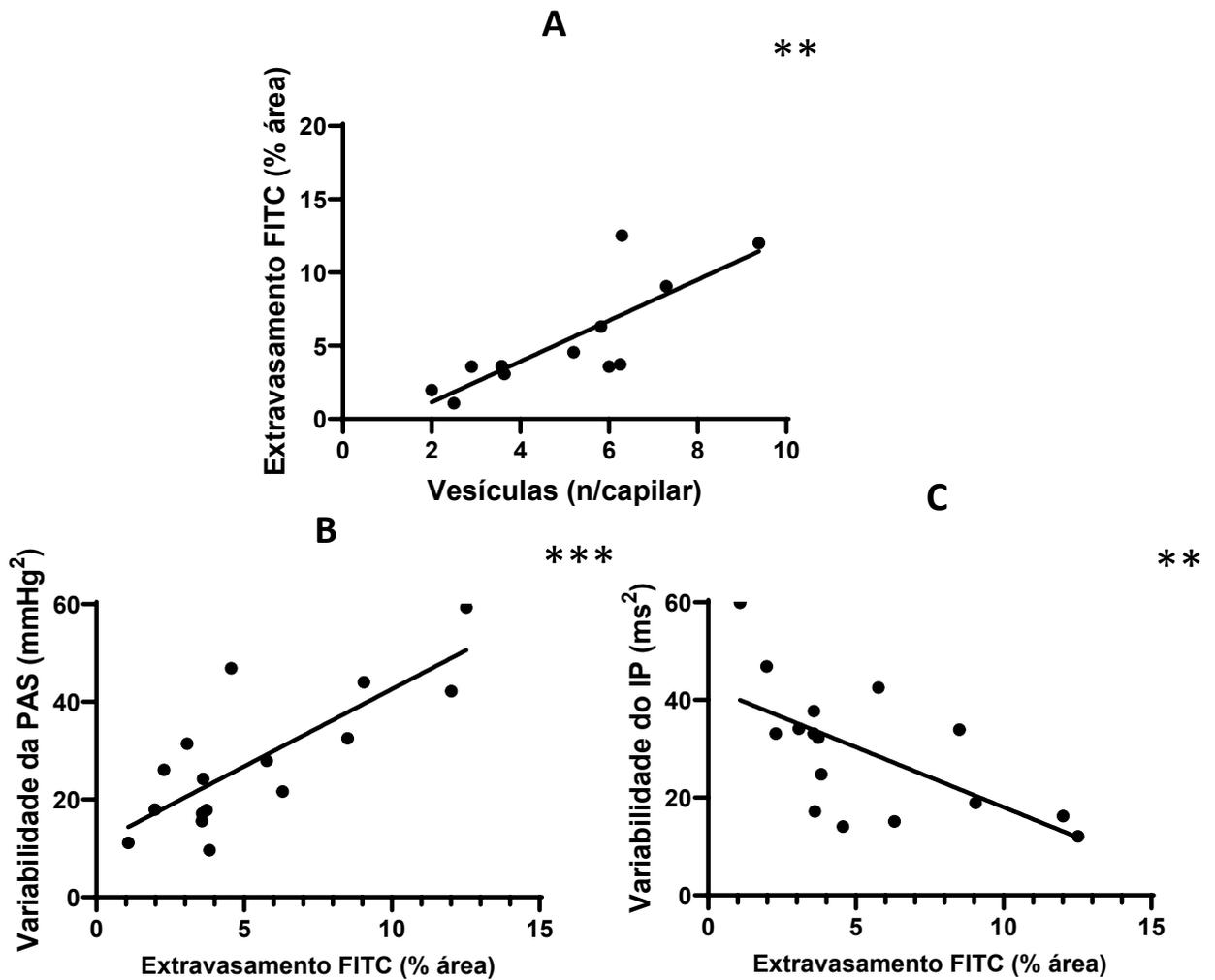


Figura 18 - Equações de regressão linear correlacionando no NTS o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral (A) e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, B) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, C). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 7. ****** $P < 0.01$; ******* $P < 0.001$.

Também no RVLM observamos uma significativa correlação positiva ($r = 0,743$), embora de menor intensidade que as observadas no PVN e NTS, entre a ocorrência de vesículas em capilares do RVLM e o extravasamento de FITC-10kDa observado nesta área, confirmando que alterações da transcitose vesicular induzidas por hipertensão e exercício repetitivo constituem o mecanismo responsável pelo maior ou menor extravasamento do corante de baixo peso molecular ao parênquima cerebral em áreas de controle autônomo (Figura 19, Tabela 7). Da mesma forma que o observado para o PVN e NTS, houve correlações significantes entre alterações na permeabilidade da BHE com ambas, a variabilidade da PAS (correlação positiva) e a variabilidade do IP (correlação negativa). Estas observações juntamente com aquelas obtidas no PVN e NTS comprovam que alterações para mais e para menos do transporte transcelular e a consequente alteração da permeabilidade da

BHE são mecanismos determinantes da disfunção autonômica na hipertensão e sua correção após treinamento aeróbio (Figuras 17, 18, 19 e Tabela 7).

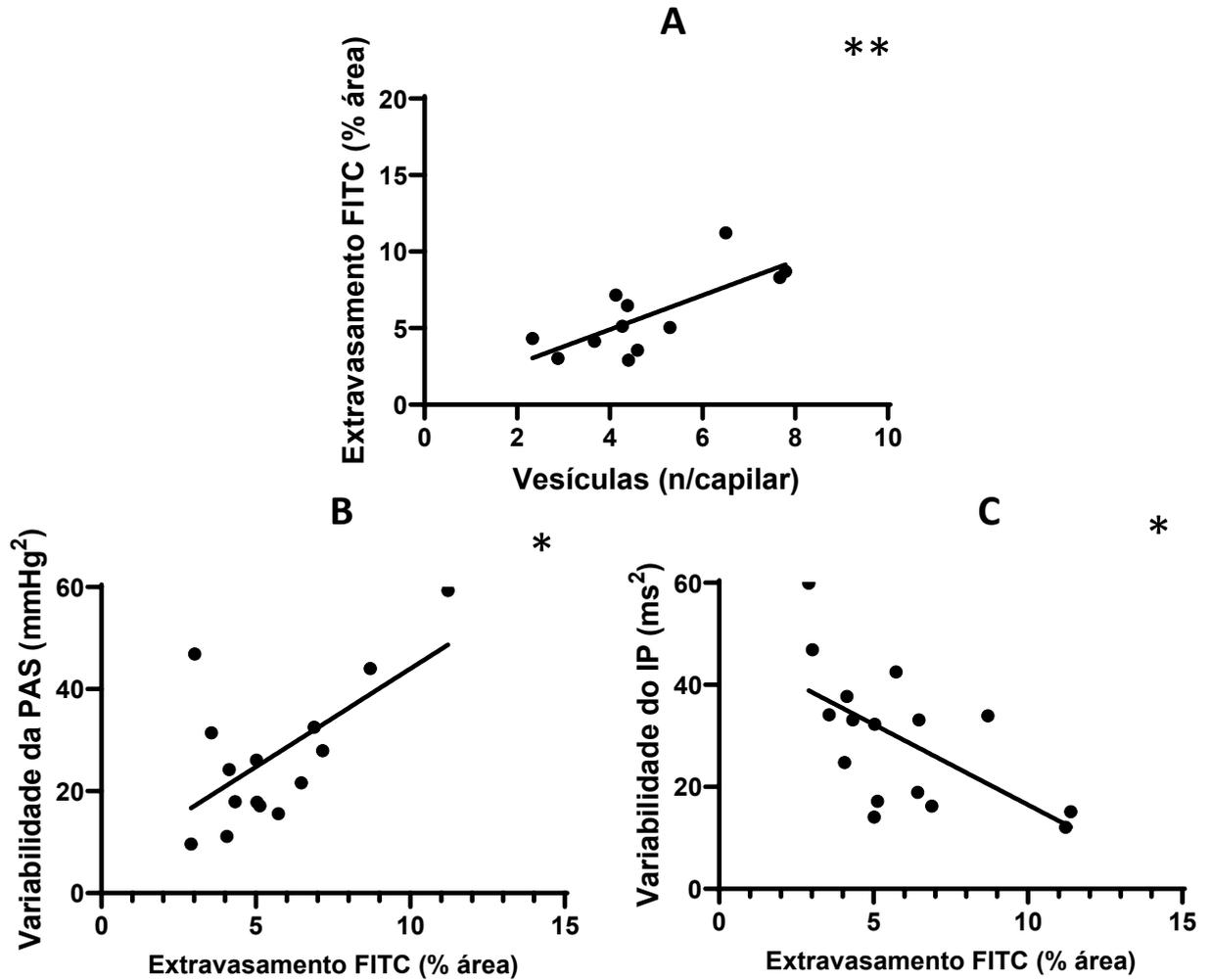


Figura 19 - Equações de regressão linear correlacionando no RVLM o número de vesículas transcitóticas com o extravasamento do FITC-10kDa ao parênquima cerebral (A) e o extravasamento do FITC com a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS, B) e a variabilidade do intervalo de pulso (IP, C). Equações de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e valores de P são apresentados na Tabela 7. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmaram observações anteriores de nosso e outros laboratórios indicando que a hipertensão é acompanhada de disfunção autonômica e elevada permeabilidade da BHE em áreas de controle autonômico da BHE e que o treinamento físico é eficaz em normalizar esta permeabilidade, corrigindo também a disfunção autonômica (BIANCARDI et al., 2014; BIANCARDI; STERN, 2016; BUTTLER et al., 2017; CERONI et al., 2009; CHAAR et al., 2015; MASSON et al., 2014, 2015; FRAGAS et al., 2021). Adicionalmente várias observações originais foram feitas:

- a elevada permeabilidade da BHE no PVN, NTS e RVLM de hipertensos crônicos é determinada pelo elevado número de vesículas transcelulares o que aumenta significativamente a transcitose através da célula endotelial;

- não há na hipertensão comprometimento das junções oclusivas e do transporte paracelular;

- o treinamento aeróbio normaliza em hipertensos a permeabilidade da BHE em núcleos autonômicos e a sua disfunção por corrigir a transcitose, reduzindo marcadamente o transporte vesicular através do endotélio;

- há no PVN, NTS e RVLM forte correlação positiva entre o número de vesículas transcitóticas e a permeabilidade da BHE e entre a permeabilidade da BHE e o prejuízo autonômico, indicando ser a transcitose o principal mecanismo determinante tanto da disfunção autonômica na hipertensão quanto de sua correção pelo treinamento aeróbio;

- o treinamento aeróbio determina nos normotensos e hipertensos grande aumento da densidade das junções oclusivas e de sua porcentagem de ocupação das bordas de contato entre 2 células endoteliais fortalecendo as junções oclusivas que limitam o transporte paracelular;

- nos normotensos o exercício repetitivo apenas causa reduções de pequena magnitude na transcitose de áreas autonômicas, mas aumenta significativamente a cobertura dos capilares do PVN e NTS pelos pericitos.

É bem conhecido que a BHE age como uma barreira seletiva entre a circulação sistêmica e o sistema nervoso central, restringindo a entrada de substâncias circulantes no parênquima cerebral (ABBOT et al., 2006; DANEMAN; PRAT, 2015). Não somente a presença de junções oclusivas de alta resistência entre as bordas das células endoteliais bloqueiam o transporte paracelular de substâncias hidrossolúveis, mas também a transcitose através da célula endotelial é mantida em níveis excepcionalmente baixos (ANDREONE et

al., 2017; KEANEY; CAMPBELL, 2015; TIETZ; ENGELHARDT, 2009). Portanto a presença de BHE intacta, evitando o extravasamento de substâncias plasmáticas ao parênquima cerebral, mantém um adequado meio intersticial para o funcionamento dos neurônios.

Sabe-se também que doenças neurodegenerativas, o acidente vascular cerebral, o trauma (DE VRIES et al, 1997; FARACO; IADECOLA, 2013; KRUGER et al., 2013; ROSENBERG, 2014; ZLOKOVIC, 200) assim como a hipertensão crônica (BIANCARDI et al., 2014; BUTTLER et al., 2017; FRAGAS et al., 2021) exibem importante extravasamento de substâncias plasmáticas no parênquima cerebral de diferentes áreas encefálicas que deveriam ser protegidas pela BHE. Embora a disfunção de barreira seja conhecida, há poucas e conflitantes informações sobre os mecanismos que condicionam os mecanismos de transporte nas diferentes patologias: ausência de lesões estruturais na BHE foram reportadas no acidente vascular cerebral (KRUGER et al., 2013), quebra das junções oclusivas foram descritas no hipocampo, córtex e em células endoteliais humanas em cultura (GUO et al., 2019; PELISH et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Observou-se também durante oclusão transitória da artéria cerebral média aumento precoce da transcitose seguido mais tardiamente de perda das proteínas das junções oclusivas (JIAO et al., 2001; KNOWLAND et al., 2014). Em modelos experimentais de hipertensão, exceto por observações de lesões no glicocálice no hipotálamo de SHR (UENO et al., 2004), redução da expressão gênica de claudinas no córtex de hipertensos por coarctação (MOHAMMED; DEGHANI, 2014) e perda das junções oclusivas no hipocampo de ratos Dahl sensíveis (PELISH et al., 2013; ZHANG et al., 2015), não há dados indicando os mecanismos que condicionam o aumento da permeabilidade da BHE em áreas autonômicas. Se pouco se sabe sobre os mecanismos desencadeados pela hipertensão, praticamente nada se conhece sobre os mecanismos que determinam a correção da funcionalidade da BHE de hipertensos após o treinamento aeróbio. Apenas em trabalho anterior (FRAGAS et al., 2021), utilizando a expressão gênica e proteica de caveolina-1 como marcador da transcitose, havíamos sugerido seu envolvimento no transporte através da BHE.

Os dados relativos às alterações na ocorrência de vesículas transcitóticas e na expressão de caveolina-1 (o principal constituinte destas vesículas) em ratos hipertensos sedentários e treinados no presente trabalho vieram confirmar que tanto a lesão da BHE com consequente aumento de sua permeabilidade na hipertensão quanto a normalização de seu funcionamento após treinamento aeróbio são determinados por alterações para mais e para menos, respectivamente, da formação de vesículas transcelulares no endotélio capilar,

indicando ser a transcitose o principal mecanismo determinante destas alterações. Aumentos da transcitose no PVN de ratos hipertensos (BIANCARDI et al., 2014, BUTTLER et al., 2017), no córtex cerebral de camundongos submetidos ao acidente vascular cerebral (KNOWLAND et al., 2014; NAHIRNEY et al., 2016) e em cultura de células tratadas com angiotensina II (GUO et al., 2019) já haviam sido observados. Confirmamos agora que a hipertensão desregula em áreas autonômicas uma propriedade funcional intrínseca dos capilares cerebrais em manter um baixo fluxo de vesículas transcelulares. Adicionalmente mostramos que o treinamento aeróbio é eficaz em corrigir esta disfunção por reduzir e normalizar a ocorrência de vesículas transcelulares mesmo na persistência da hipertensão. Em trabalho anterior Andreone et al. 2017 já haviam identificado que a baixa taxa de transcitose em camundongos intactos era devida a supressão da formação de vesículas.

Um achado concordante com o aumento da transcitose e a maior ocorrência de vesículas transcelulares em hipertensos sedentários assim como com sua normalização após redução da transcitose induzida pelo treinamento, foi a observação do aumento significativo da área ocupada pela célula endotelial nos SHR-S, e, a normalização da mesma observada nos SHR-T após o treinamento. Outra observação interessante foi a de que enquanto no PVN o aumento das vesículas totais/capilar era determinado por aumentos proporcionais das vesículas luminais e abluminais, no NTS e RVLM o aumento das vesículas totais era devido às vesículas abluminais. Nos SHR-S vs. Wistar-S, a ausência de significância das vesículas luminais e abluminais quando normalizadas pelos respectivos perímetros pode ser explicada pelo aumento do diâmetro da luz capilar determinado nos capilares do PVN, NTS e RVLM pela elevada pressão de perfusão dos mesmos. Por outro lado, observamos no PVN dos SHR-T vs. SHR-S redução significativa da contagem de vesículas luminais e abluminais/ μm mesmo na persistência do aumento do diâmetro da luz capilar, indicativo da elevada eficiência do treinamento aeróbio em reduzir a ocorrência das vesículas transcelulares.

Nossos dados indicaram ainda não haver na hipertensão crônica alteração aparente da ultraestrutura das junções oclusivas, sugestiva de inalteração do transporte paracelular. As junções oclusivas formadas por clusters de proteínas transmembrana (claudina, ocludina, molécula de adesão juncional) conectadas a complexos de adesão do citoesqueleto (zônula occludens) e junções aderentes basais (VE-caderina PECAM) formam uma barreira paracelular de alta resistência à passagem de moléculas e íons hidrossolúveis e limitam sobremaneira a passagem de elementos sanguíneos ao parênquima cerebral (DANEMAN; PRAT, 2015). Em nosso trabalho anterior já havíamos observado em ratos hipertensos a

inalteração da expressão gênica de claudina-5, occludina, e zônula occludens-1 quando comparados a seus controles normotensos sugerindo uma possível ausência de efeito da hipertensão sobre a estrutura das junções oclusivas (FRAGAS et al., 2021). Ausência de alterações em junções oclusivas foram também relatadas no córtex de SHR (HOM et al., 2007) e camundongos (NAHIRNEY et al., 2016) portadores de acidente vascular cerebral e em ratos submetidos à isquemia focal por oclusão unilateral da artéria cerebral média (KRUEGER et al., 2013). Em conjunto esses dados reforçam nossa observação de que permeabilidade da BHE aumentada na hipertensão não indica necessariamente prejuízo do transporte paracelular por lesão das junções oclusivas.

Outro achado original deste trabalho foi o de que o treinamento aeróbio induziu marcante aumento na densidade das junções oclusivas e da porcentagem que elas ocupam nas bordas de contato entre 2 células endoteliais, tanto nos animais hipertensos quanto nos normotensos, sugestivo da maior presença de proteínas transmembrana e junções aderentes. Nenhuma informação há na literatura sobre possíveis efeitos do exercício repetitivo sobre a estrutura/funcionalidade das junções oclusivas. Embora a microscopia eletrônica não nos permita identificar os constituintes das junções oclusivas, é bem provável que a claudina-5, uma proteína essencial à formação da barreira paracelular (DANEMAN; PRAT, 2015), tenha sua expressão aumentada, como sugerido por sua expressão gênica em trabalho anterior (FRAGAS et al., 2021). Em camundongos deficientes de claudina-5, Nitta et al. (2003) mostraram importante perda da seletividade da BHE, o que sugere que o aumento da densidade das junções oclusivas e muito possivelmente da expressão de claudina-5 induzidos pelo treinamento são acompanhados de maior seletividade da BHE e maior resistência oferecida pelas mesmas ao transporte de substâncias hidrossolúveis e elementos sanguíneos pela via paracelular. Esta sugestão deverá ainda ser confirmada em trabalhos futuros.

Nossos resultados mostraram também que ratos normotensos respondem ao exercício repetitivo apenas com reduções de pequena magnitude na transcitose de áreas autonômicas, mas aumento significativo da cobertura dos capilares do PVN e NTS pelos pericitos. Pericitos são células perivasculares de origem mesodérmica, cujos processos alongados envolvem os capilares periféricos e cerebrais, com uma cobertura mais extensa e pronunciada nestes últimos. Sabe-se que os pericitos além de sua função contrátil, regulando o diâmetro dos capilares e conseqüentemente o fluxo sanguíneo local (KEANEY; CAMPBELL, 2015), também têm importante papel na manutenção da integridade da BHE por participar da regulação da transcitose e induzir a polarização dos podócitos dos astrócitos que envolvem

completamente os capilares encefálicos, como comprovado em estudos em camundongos deficientes em pericitos (ARMULIK et al., 2010; ZHAO; ZLOKOVIC, 2014). Os pericitos, portanto, mantêm a funcionalidade da BHE, a qual estaria facilitada nos normotensos treinados.

A hipertensão arterial (exceto pelo RVLM em que observamos uma redução de 19%) não alterou a espessura da membrana basal na qual se apoiam as células endoteliais e se inserem o pericitos. Por sua vez o treinamento aeróbio aumentou em 32% a espessura da membrana basal apenas nos capilares do NTS dos normotensos treinados. A membrana basal constituída por laminina, colágeno, elastina, fibronectina, proteoglicanos e outras glicoproteínas propiciam uma barreira adicional para moléculas e substâncias atravessarem antes de acessarem o parênquima cerebral onde se encontram os neurônios. Não há na literatura informações sobre possíveis efeitos da hipertensão e do exercício repetitivo sobre a estrutura e a permeabilidade da membrana basal, de forma que a interpretação da funcionalidade de nossos achados depende de estudos futuros.

Observação importante do presente trabalho foi a de que a normalização da transcitose induzida pelo treinamento aeróbio (e a conseqüente correção da permeabilidade da BHE) nos ratos hipertensos foi acompanhada de melhora substancial no controle autonômico da circulação, como indicado pela redução de ambos, atividade simpática vasomotora e balanço simpato-vagal ao coração. De fato, em todas as áreas autonômicas, o número de vesículas/capilar encontrava-se fortemente correlacionada com a permeabilidade da BHE e, por sua vez, a permeabilidade da BHE correlacionava-se positivamente com a variabilidade da pressão arterial e negativamente com a variabilidade da frequência cardíaca. Estes resultados confirmam ser a transcitose através da célula endotelial o principal mecanismo condicionante tanto da disfunção da BHE na hipertensão quanto de sua restauração pelo treinamento aeróbio.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto nossos dados experimentais demonstram que em áreas de controle autonômico tanto a elevada permeabilidade da BHE na hipertensão quanto sua correção pelo treinamento aeróbio são mediados por alterações para mais e para menos da transcitose através da célula endotelial dos capilares encefálicos, sugerindo ser este o principal mecanismo que modula o funcionamento da BHE nestas condições experimentais. Indicam ainda serem as alterações na transcitose as principais responsáveis pela disfunção autonômica (transcitose aumentada carreando constituintes plasmáticos ao parênquima cerebral) assim como por sua correção (transcitose normalizada, evitando o acesso de constituintes plasmáticos que podem interferir com o funcionamento de neurônios préautonômicos). Nossos resultados sugerem ainda não haver alteração do transporte paracelular na hipertensão, indicando não ser esta via o fator determinante da disfunção da BHE induzida pela hipertensão. Por outro lado, o treinamento determina em normotensos e hipertensos aumento da densidade e da extensão das junções oclusivas e uma maior ocupação da borda de contato entre duas células endoteliais pelas junções oclusivas, conferindo maior resistência e seletividade às mesmas.

REFERÊNCIAS*

7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3, supl. 3, 2016.

ABOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature**, v. 7, p. 41-53, 2006.

AGARWAL, D.; WELSCH, M.; KELLER, J.; FRANCIS, J. Chronic Exercise Modulates RAS Components and Improves Balance between pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Brain of SHR. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 6, p. 1069–85, 2011.

ANDREONE, B. J.; CHOW, B. W.; TATA, A.; LACOSTE, B.; BEN-ZVI, A.; BULLOCK, K.; DEIK, A. A.; GINTY, D. D.; CLISH, C. B.; GU, C. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. **Neuron**, v. 94, p. 1-14, 2017.

ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; MÄE, M.; NISANCIOGLU, M. H.; WALLGARD, E.; NIAUDET, C.; HE, L.; NORLIN, J.; LINDBLUM, P.; STRITTMATTER, K.; JOHANSSON, B. R.; BETSHOLTZ, C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. **Nature**, v. 468, p. 557-562, 2010.

BARROSO, W. K. S et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 166, n. 3, p. 516-658, 2021.

BASU, S.; MILLET, C. Social epidemiology of hypertension in middle-income countries: Determinants of prevalence, diagnosis, treatment, and control in the WHO SAGE study. **Hypertension**, v. 62, p. 18-26, 2013.

BERTRAN, S.; BRIXIUS, K.; BRINKMANN, C. Exercise for the diabetic brain: how physical training may help prevent dementia and Alzheimer's disease in T2DM patients. **Endocrine**, v. 53, n. 2, p. 350-363, 2016.

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

BIANCARDI, V. C.; STERN, J. E. Compromised blood-brain barrier permeability: novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centers during hypertension. **J. Physiol.**, v. 594, p. 1591-1600, 2016.

BIANCARDI, V. C.; STRANAHAN, A. M.; KRAUSE, E. G.; STERN, J. E. Crosstalk between AT1 receptors and Toll like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the paraventricular nucleus. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 310, p. H404-H415, 2015.

BLANCHETTE, M.; DANEMAN, R. **Mechanisms of development**, v. 138, p.8-16, 2015.

BUTTLER, L.; JORDÃO, M. T.; FRAGAS, M. G.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Maintenance of blood-brain barrier integrity in hypertension: A novel benefit of exercise training for autonomic control. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2018.

CAMPOS Jr, R.; COLOMBARI, E.; CRAVO, S.; LOPES, O. U. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervosa. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, n. 1, p. 41-54, 2001.

CAPONE, C.; FARACO, G.; PARK, L.; CAO, X.; DAVISSON, R. L., IADECOLA, C. The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 300, p. H397- H407, 2011.

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

CERONI, A.; CHAAR, L. J.; BOMBEIN, R. L.; MICHELINI, L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 6, p. 630-640, 2009.

CHAAR, L. J.; ALVES, T. P.; BATISTA JR, A. M.; MICHELINI, L. C. Early Training-Induced Reduction of Angiotensinogen in Autonomic Areas-The Main Effect of Exercise on Brain Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. **Plos One**, v. 10, p. 1-16, 2015.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood – Brain Barrier. **Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 7, p. 1-24, 2015.

DAVIS, W.; MAHALE, S.; CARRANZA, A.; COX, B.; HAYES, K.; JIMENEZ, D.; DING, Y. Exercise pre-conditioning ameliorates blood–brain barrier dysfunction in stroke by enhancing basal lamina. **Neurological Research**, v. 29, p. 382-387, 2007.

DE VRIES, H. E.; KUIPER, J.; DE BOER, A. G.; VAN, BERKEL, T. J.; BREIMER DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacol Rev.**, v. 49, n. 2, p. 143-155, 1997.

DE SENNA, P. N.; XAVIER, L. L.; BANGATINI, P. B.; SAUR, L.; GALLAND, F.; ZANOTTO, C.; BERNARDI, C.; NARDIN, P.; GONÇALVES, A. A.; ACHAVAL, M. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats. **Brain Research**, v. 1618, p. 75-82, 2015.

DiBONA, G. F. The Sympathetic Nervous System and Hypertension Recent Developments. **Hypertension**, v. 43, p. 147-150, 2004.

FARACO, G.; IADECOLA, C. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p. 810-817, 2013.

FELIX, 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.

FERRARIO, C. M. Importance of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAS) in the Physiology and Pathology of Hypertension: An Overview. **Drugs**, v. 39 (Suppl. 2), p. 1-8, 1990.

FLEEGAL-DE-MOTTA, M. A.; DOGHU, S.; BANKS, W. A. Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT1 receptors in brain endothelial cells. **J. Cerebral Blood Flow Metabol.**, v. 29, p. 640-647, 2009.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2018.

FRAGAS, M. G.; CÂNDIDO, V. B.; DAVANZO, G. G.; ROCHA-SANTOS, C. CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Transcytosis within PVN capillaries: a mechanism determining both hypertension-induced blood-brain barrier dysfunction and exercise-induced correction. **Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.**, v. 321, n. 5, p. R732-R741, 2021.

GUO, M.; COX, B.; MAHALE, S.; DAVIS, W.; CARRANZA, A.; HAYES, K.; SPRAGUE, S.; JIMENEZ, D.; DING, Y. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood– brain barrier dysfunction in stroke. **Neuroscience**, v. 151, p. 340-351, 2008.

GUO, S.; SOM, A. T.; ARAI, K.; LO, E. H. Effects of angiotensin-II on brain endothelial cell permeability via PPARalpha regulation of para- and trans-cellular pathways. **Brain Res.**, 1722: 146353, 2019.

HAGAN N.; BEN-ZVI A. The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 38, p. 7–15, 2015.

HOM, S.; FLEEGAL, M. A.; EGGLETON, R. D.; CAMPOS, C. R.; HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. 1881-1892, 2007.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 55-62, 2001.

JIA, L. L.; KANG, Y.; WANG, F.; LI, H.; ZHANG, Y.; YU, X.; QI, J.; SUO, Y.; TIAN, Z.; ZHU, Z.; ZHU, G.; QIN, D. Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

JIAO, H.; WANG, Z.; LIU, Y.; WANG, P.; XUE, Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. **J. Mol. Neurosci.**, v. 44, n. 2, p. 130–139, 2011.

KEANEY, J.; CAMPBELL, M. The dynamics blood-brain barrier. **FEBS J**, v. 282, p. 4067-4079, 2015.

KNOWLAND, D.; ARAC, A.; SEKIGUCHI, K. J.; HSU, M.; LUTZ, S. E.; PERRINO, J.; STEINBERG, G. K.; BARRES, B. A.; NIMMERJAHN, A.; AGALLIU, D. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. **Neuron**, v. 82, n. 3, p. 603–617, 2014.

KRUEGER, M.; HÄRTIG, W.; REICHENBACH, A.; BECHMANN, I.; MICHALSKI, D. Blood- brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. **Plos ONE**, v. 8, p. e56419, 2013.

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

MASSON, G. S.; COSTA, T. S. R.; YSHII, L.; FERNANDES, D. C.; SOARES, P. P. S.; LAURINDO, F. R.; SCAVONE, C.; MICHELINI, L. C. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **Plos One**, v. 9, p. e94927, 2014.

MASSON, G. S.; NAIR, A. R.; DANGE, R. B.; SILVA-SOARES, P. P.; MICHELINI, L. C.; FRANCIS, J. Toll-like receptor 4 promotes autonomic dysfunction, inflammation and microglia activation in the hypothalamic paraventricular nucleus: Role of endoplasmic reticulum stress. **Plos One**, v.10, n. 3, p. 1-15, 2015.

MICHELINI, L. C. in AIRES, M. M. Fisiologia humana. **Quarta edição**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012.

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

MICHELINI, LISETE C.; STERN, JAVIER E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 9, p. 947-960, 2009.

MOHAMMADI, M. T.; DEGHANI, G. A. Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. **Pathol. Research Pract.**, v. 210, n. 12, p. 985-990, 2014.

MUELLER, S. M.; HEISTAD, D. D. Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier. **Hypertension**, v. 2, n. 6, p. 809-812, 1980.

NAHIRNEY, P.C.; REESON, P.; BROWN, C. E. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 36, n. 2, p. 413-425, 2016.

NITTA, T.; HATA, M.; GOTOH, S.; SEO, Y.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, N.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. **J. Cell Biol.**, v. 161, n. 3, p. 653-660, 2003.

OSBORN, J.W.; ENGLAND, S. K. Normalization of arterial pressure after barodenervation: role of pressure natriuresis. **Am. J. Physiol.**, v.259, n. 6, p. 1172-1180, 1990.

PATON, J. F. R.; WANG, S.; POLSON, J. W.; KASPAROV, S. Signalling across the blood brain barrier by angiotensin II: Novel implications for neurogenic hypertension. **J. Mol. Med.**, v. 86, p. 705-710, 2008.

PATON, J. F.; WAKI, H.; ABDALA, A. P.; DICKINSON, J.; KASPAROV, S. Vascular-brain signaling in hypertension: role of angiotensin II and nitric oxide. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 9, n.3, p. 242-247, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, 2009.

PELISCH, N. N.; HOSOMI, M.; UENO, D.; NAKANO, H.; HITOMI, M.; MOGI, K.; SHIMADA, K.; KOBORI, H.; HORIUCHI, M.; SAKAMOTO, H.; MATSUMOTO, M.; KOHNO, M.; NISHIYAMA, A. Blockade of AT1 Receptors Protects the Blood-Brain

Barrier and Improves Cognition in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*. **Nature**, v. 24, n. 3, p. 362–368, 2011.

PELLEGRIN, M.; AUBERT, J. F.; BOUZOURÈNE, K.; AMSTUTZ, C. MAZZOLAI, L. Voluntary Exercise Stabilizes Established Angiotensin II-Dependent Atherosclerosis in Mice through Systemic Anti-Inflammatory Effects. **Plos One**, v. 24, n. 10, p. 1–12, 2015.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROCHA-SANTOS, C.; BRAGA, D. C.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Activity-dependent neuroplastic changes in autonomic circuitry modulating cardiovascular control: the essential role of baroreceptors and chemoreceptors signaling. **Front Physiol.**, v. 11, n. 309, 2020.

ROSENBERG, G. A. Blood-brain barrier permeability in aging and Alzheimer's disease. **J. Prev. Alzheimers Dis.**, v. 1, n. 3, p. 138–139, 2014.

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

SANTOS, C. R.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Exercise training abrogates age-dependent loss of hypothalamic oxytocinergic circuitry and maintains high parasympathetic activity. **J. Neuroendocrinol.** e12601, 2018.

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

SILVA, J. R. S. D.; ZAMPIERI, T. T.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; ARAGÃO, D. S.; FERNANDER, F. B.; CASARINI, E. E.; MICHELINI, L. C. Downregulation of vascular renin-angiotensin system by aerobic training Focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes. **Circ. J.**, v. 79, p. 1372-1380, 2015.

SILVA, S. D. Jr.; JARA, Z. P.; PERES, R.; LIMA, L. S.; SCAVONE, C.; MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M.; CASARINI D, E.; MICHELINI, L. C. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. 1–19, 2017.

SOARES, P. P.; DA NOBREGA, A.C.; USHIZIMA, M.R.; IRIGOYEN M.C. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Auton.Neurosci.**, v. 113, p. 24-31, 2004.

TAMAKI, K.; SADOSHIMA, S.; HEISTAD, D. D. Increased susceptibility to osmotic disruption of the blood-brain barrier in chronic hypertension. **Hypertension**, v. 6, n. 5, p. 633-638, 1984.

TIETZ, S.; ENGELHARDT, B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. **J. Cell Biol.**, v. 209, n. 4, p. 493–506, 2015.

UENO, M.; SAKAMOTO, H.; TOMIMOTO, H; AKIGUCHI, I., ONODERA, M. HUANG, C. L.; KANENISHI, S. Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats. **Acta Neuropathol.**, v. 107, p. 532-538, 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2018.

WAKI, H.; GOURAND, S. S.; MAEDA, M.; RAIZADA, M. K.; PATON, J. F. Contributions of vascular inflammation in the brainstem for neurogenic hypertension. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 30, n. 3, p. 422-428, 2011.

WATSON, M. L. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. **J Biophys Biochem Cytol.**, v. 4, n. 6, p. 727-730, 1958.

ZHANG, M.; QIN, D. N.; SUO, Y. P.; SU, Q.; LI, H. B.; MIAO, Y. W.; GUO, J.; FENG, Z. P. Q. I, J.; GAO, H. L.; MU, J. J.; ZHU, G. Q.; KANG, Y. M. Endogenous hydrogen peroxide in the hypothalamic paraventricular nucleus regulates neurohormonal excitation in high salt-induced hypertension. **Toxicol Lett**, v. 235, n. 3, p. 206–215, 2015.

ZLOKOVIC, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178-201, 2008.

ZUBCEVIC, J.; WAKI, H.; RAIZADA, M. K.; PATON, J. F. R. Autonomic-immune-vascular interaction: An emerging concept for neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 6, p. 1026-1033, 2011.

ZHAO, Y. L.; SONG, J. N.; ZHANG, M. Role of caveolin-1 in the biology of the blood-brain barrier. **Rev. Neurosci.**, n. 25, n. 2, p. 247–254, 2014.

ZHEN, Z.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier: A Dual life of MFSD2A? **Neuron**, v.82, n. 4, p. 728-730, 2014.

RESEARCH ARTICLE
Neural Control

Transcytosis within PVN capillaries: a mechanism determining both hypertension-induced blood-brain barrier dysfunction and exercise-induced correction

AQ:1-5

 AQ: au  **Matheus Garcia Fragas, Vanessa Brito Cândido,  Gustavo Gastão Davanzo, Carla Rocha-Santos, Alexandre Ceroni, and  Lisete C. Michelini**

 AQGRid1 *Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil*
Abstract

Although hypertension disrupts the blood-brain barrier (BBB) integrity within the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) and increases the leakage into the brain parenchyma, exercise training (T) was shown to correct it. Since there is scarce and contradictory information on the mechanism(s) determining hypertension-induced BBB deficit and nothing is known about T-induced improvement, we sought to evaluate the paracellular and transcellular transport across the BBB within the PVN in both conditions. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and WKY submitted to 4-wk aerobic T or sedentary (S) protocol were chronically catheterized for hemodynamic recordings at rest and intra-arterial administration of dyes (Rhodamine-dextran 70 kDa + FITC-dextran 10 kDa). Brains were harvesting for FITC leakage examination, qPCR evaluation of different BBB constituents and protein expression of caveolin-1 and claudin-5, the main markers of transcytosis and paracellular transport, respectively. Hypertension was characterized by increased arterial pressure and heart rate, augmented sympathetic modulation of heart and vessels, and reduced cardiac parasympathetic control, marked FITC extravasation into the PVN which was accompanied by increased caveolin-1 gene and protein expression, without changes in claudin-5 and others tight junctions' components. SHR-T vs. SHR-S showed a partial pressure reduction, resting bradycardia, improvement of autonomic control of the circulation simultaneously with correction of both FITC leakage and caveolin-1 expression; there was a significant increase in claudin-5 expression. Caveolin-1 content was strongly correlated with improved autonomic control after exercise. Data indicated that within the PVN the transcytosis is the main mechanism governing both hypertension-induced BBB leakage, as well as the exercise-induced correction.

aerobic training; paracellular transport; spontaneously hypertensive rats; tight junctions; transcytotic vesicles

INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) is an important regulatory interface between the central nervous system and the peripheral circulation. It is a complex structure composed by endothelial cells laying on the basement membrane and surrounded by pericytes and astrocytes' endfeet (1, 2). Brain capillaries opposed to the peripheral ones, exhibit low levels of transcytotic vesicles (caveolae) and reduced trafficking across the endothelium (3). The contacts between adjacent endothelial cells are sealed by the presence of tetraspanning tight junctions' proteins that limit the paracellular transport (4). Both the reduced transcytosis and the presence of tight junctions ensure the BBB integrity (5).

The BBB is completely formed at the birth (6). Although the BBB is functionally competent in healthy individuals, several studies showed that its integrity was compromised in

the presence of stroke, trauma, neurodegenerative diseases, dementia, and aging (7–11). BBB dysfunction within the hippocampus and cortex was also shown in hypertensive subjects (12–15). More recently Stern's group provided evidence that chronic hypertension courses with BBB breakdown with access of plasma constituents within the brain parenchyma of autonomic areas controlling the cardiovascular function (16, 17). Studies from our laboratory confirmed these findings showing in addition that the increased BBB leakage within the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), nucleus tractus solitarii, and rostroventrolateral medulla was strongly correlated with autonomic dysfunction (18). We also demonstrated that exercise training was able to reduce leakage and normalize BBB function while correcting the autonomic dysfunction (18).

Although the effects of hypertension and exercise training on BBB function have been described, information regarding

the mechanism(s) conditioning BBB extravasation of plasma molecules in hypertensive subjects are scarce. In addition, nothing is known about the effects of exercise on the correction of BBB function. Therefore, in the present study, we sought to identify the mechanism(s) determining both the increased BBB leakage within the PVN of spontaneously hypertensive rats (SHR) and the restoration of BBB function in the trained SHR. Age-matched WKY served as controls. Special attention is given on the mechanisms controlling the transcellular and paracellular transport across the capillary endothelium.

AQ: 7

METHODS

Animals, Ethical Approval, and Experimental Design

Surgical procedures and experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA 01/2016) in compliance with the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Male SHR and WKY, aged 3 mo, were housed on a 12/12-h light/dark cycle with free access to standard chow and water in the Animal Facilities of Department of Physiology & Biophysics, ICB, University of Sao Paulo. During a 10-day adaptation period, rats were preselected for their ability to walk/run on a treadmill (0.4–0.8 km/h, 0% grade, Millenium, Inbramed, Porto Alegre, Brazil). Only active rats were included in this study. Rats were then submitted to progressive exercise tests to determine maximal individual aerobic capacity and to allocate rats with identical capacities to trained (T) and sedentary (S) groups (19, 20). Aerobic training (50%–60% of maximal exercise capacity, 1 h/day, 5 days/wk) and S protocols were performed for 4 wk. The volume/duration of training was based in a previous experiment in which we observed that 4 wk were enough to reverse the detrimental effects of chronic hypertension on BBB function (18). At the end of experimental protocols, SHR and WKY were submitted again to maximal exercise tests to evaluate their aerobic capacities. Rats were then anesthetized with acepromazine (2.5 mg/kg ip, Syntec, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brazil) followed by ketamine (80 mg/kg ip, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA) + xylazine (12 mg/kg ip, Alcon, Fort Worth, TX) for catheterization of the femoral artery (21). Rats were treated with penicillin (24,000 IU/kg im, Pentabiotico Veterinario, Fontoura Wyeth, Brazil) and ketoprofen (2 mg/kg sc, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo, Brazil) and return to their home cages for recovery.

Functional Measurements

In the following day, 24 h after catheterization and 26–30 h after the last training session, the arterial catheter was connected to the recording system (Power Lab ADInstruments, Australia, 2,000 Hz of sampling frequency). Resting arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were recorded for 30–40 min in conscious unrestrained rats after the cessation of the exploratory activity. Time series of systolic AP (SAP) and pulse interval (PI) were used to evaluate pressure and HR variabilities at the frequency domain as previously described (18). Power spectral density for the low frequency (LF, 0.20–0.75 Hz, indicating sympathetic vasomotor activity and sympathetic + parasympathetic activity to the heart) and the

high frequency (HF, 0.75–3.00 Hz, indicative of the cardiac vagal activity) and LF/HF ratio to the heart were evaluated.

Analysis of the BBB Integrity

After functional recordings, a subgroup of rats of each experimental condition was again anesthetized for catheterization of the right carotid artery. A mixture of dyes—fluorescein isothiocyanate dextran 10 kDa (FITC, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich) and rhodamine isothiocyanate dextran 70 kDa (RHO, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich), 286 μ L/100 g each—were directly administered into the brain vasculature at slow rate. Dyes were allowed to recirculate for 20 min (16). Rats were then deeply anesthetized (overdose of ketamine + xylazine 300 mg/kg + 60 mg/kg ip) for brain harvesting immediately after the respiratory arrest. Brains were postfixed (4% phosphate buffered PFA), cryoprotected (30% sucrose in 0.01 M PBS), and stored until processing.

Sequential coronal PVN slices (30 μ m, Leica CM1850 cryostat) were collected and mounted as previously described (18). Slides were examined on a fluorescence microscope (Leica DMLB, Nussloch, Germany) attached to an ExiBlue camera (Imaging, Canada); PVN images were identified and acquired (Image-Pro Plus software, Media Cybernetics). BBB permeability (evaluated by the capability of small size FITC dextran to remain within intact capillaries or partially leak into the brain parenchyma in the presence of compromised barrier integrity; 16) was quantified within a specific area of interest (AOI) within the ventromedial subnucleus of the medial PVN (ImageJ, NIH).

Real-Time PCR Studies

Other subgroup of rats of each experimental condition were, after the functional measurements, deeply anesthetized and perfused immediately after the respiratory arrest with sterile PBS for blood removal. Brains were maintained in dry ice for obtention of hypothalamic slices (Linear Slicer, PRO7, Japan). Under a magnification lens and using as landmarks the third ventricle (central position), the median eminence (at the bottom), and the optic tract (laterally), the PVN was microdissected with a small sharp blade. Tissue was stored in sterile eppendorfs. Total RNA was extracted using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions and measured by NanoDrop Spectrophotometer (Nano-Drop 2000, Thermo Fisher Scientific). DNase I was used to digest DNA and obtain pure RNA, whose integrity was verified by agarose gel electrophoresis. Total RNA (1 μ g/reaction) was used for first-strand cDNA synthesis as previously described (22). The samples were subjected to qPCR amplification (7500Real Time PCR System, Applied Biosystem) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) assays and specific oligonucleotides customized by Invitrogen (Table 1). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as the reporter gene (19). Each sample was analyzed in duplicate. The mRNA expression data were calculated by cycle threshold (Ct) values using the $\Delta\Delta$ Ct method, and the results expressed as fold increases (22).

Immunofluorescence Assays

Another subgroup of SHR-S, SHR-T, WKY-S, and WKY-T received after the functional measurements an overdose of

T1

Table 1. Oligonucleotides used in qPCR assays

Gene Primers	Sequence (5'-3')	Access Number
Caveolin-1	S: AAATCACAGCCCAGGGAAACC	NM_031556
	A: TAGAGATGTCCCTCGGAGTCTAC	
Claudin-5	S: TTAAGGCACGGGTGGCACTCACG	NM_031701.2
	A: TTAGACGTAGTTCTTCTGTGTCG	
Occludin	S: TTACGGCTATGGAGGGTACAC	NM_031329.2
	A: GACGCTGGTAACAAAGATCAC	
ZO-1	S: GCTCACCAGGGTCAAAATGT	NM_001106266.1
	A: GGCTTAAAGCTGGCAGTGTC	
Laminin- α 2	S: GCCACACGAGACCTGAAAGA	XM_017590488.1
	A: GGAAGCCATTCTCGAACC	
Collagen-IV α 1	S: CCTTTGTGATGCACACCAGC	NM_001135009.1
	A: CACTCGATGAATGGGGCACT	
PDGFR β	S: TCTTTGTGCCAGATCCCACG	NM_031525.1
	A: GTCTGTCACTCGGCATGGAA	
Aquaporin-4	S: TGGGAGTCAACCAGGTTTCATGG	NM_012825.4
	A: GTCCGTTTGGGAATCACAGCTGGC	
HPRT	S: TTTGCTGACCTGCTGGATTAC	NM_012583.2
	A: ACTTTTATGTCCCCGTTGA	

HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; ZO-1, zonula occludens-1. S and A indicate the sense and antisense sequences, respectively. Access number identify the gene in the ncbi.nlm.nih.gov site.

anesthetics and were perfused, immediately after the respiratory arrest, with Dulbecco's modified Eagle's medium (D-8900, Sigma-Aldrich, MS; Daigger Pump, IL), followed by the fixative (4% PFA in 0.1 M PBS), as previously described (23). To evaluate whether previous experimental maneuvers could interfere with protein expression levels, a fourth

subgroup of rats of each experimental condition were not submitted to arterial cannulation. Rats were euthanized and brains perfused after the completion of T and S protocols.

Brains were removed, postfixed (4% PFA 0.1 M for 48 h), cryoprotected (0.1 M Tris-PBS containing sucrose for 48 h), and stored at 4°C until processing (23). Coronal sections of the hypothalamus interesting the PVN (1.7 up to 2.2 mm) caudal to the Bregma (24) were collected in tissue culture wells with 0.01 M PBS at 4°C. Slices were pretreated for 15 min with 1% sodium borohydride (Sigma-Aldrich, MS) in 0.1 M PBS and then treated for 30 min with a solution containing 1% hydrogen peroxide and 10% Methanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) in 0.1 M PBS. After five washes of 5 min each with PBS 0.1 M, slices were blocked with 0.3% Triton X-100 (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) in 3% donkey serum (Jackson ImmunoResearch) for 1 h. PVN sections suspended in 0.3% Triton X-100 and 3% donkey serum were incubated with a mixture of primary antibodies [monoclonal mouse anti-endothelial cell, RECA-1 (Abcam, Cambridge, UK, 1:800 dilution) + polyclonal rabbit caveolin-1 (Cell Signaling, Danvers, MA, 1:100 dilution)] for 48 h at 4°C. Double immunofluorescence reactions were also made with RECA-1, 1:800 dilution + polyclonal rabbit claudin-5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 1:100 dilution). After incubation with primary antibodies, tissues were washed with 0.1 M PBS and submitted to 1 h incubation at room temperature with secondary antibodies anti-mouse Alexa Fluor 594 and anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Jackson

AQ: 8

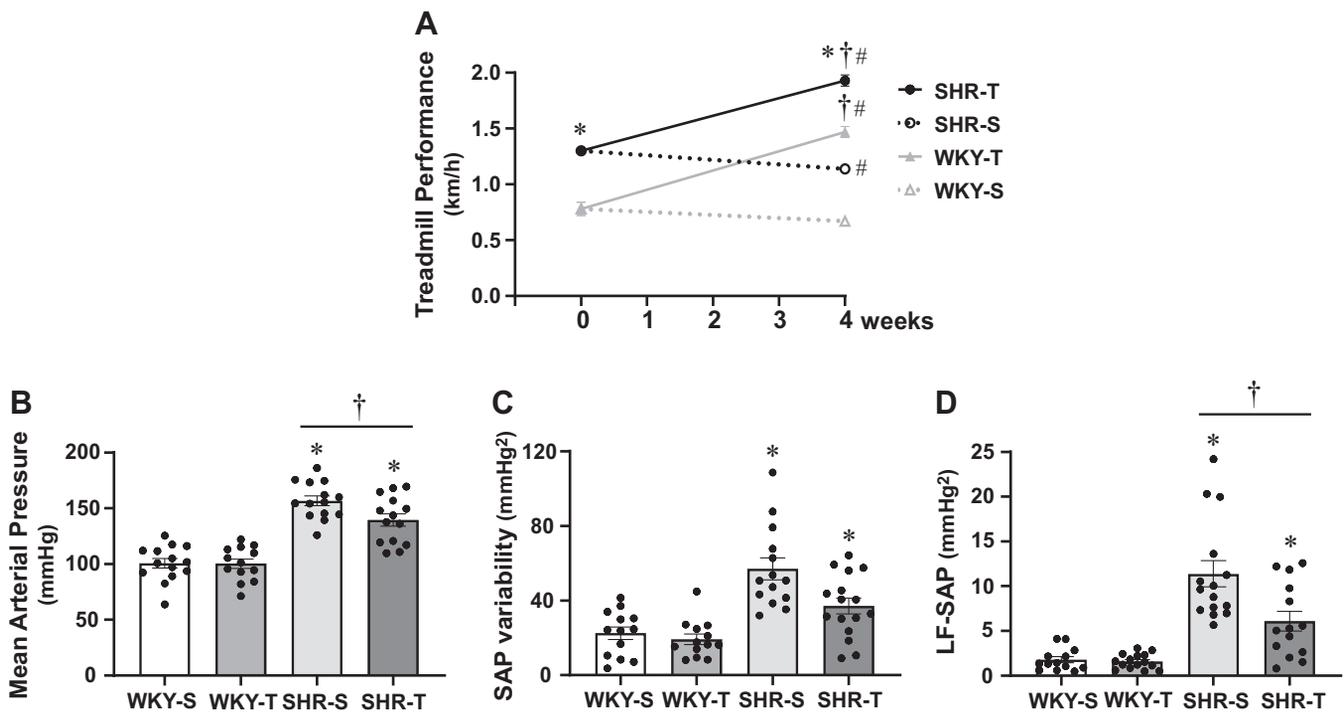


Figure 1. Training-induced changes on treadmill performance (A), resting mean arterial pressure (B), SAP variability (C), and sympathetic vasomotor activity (LF-SAP, D) in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive controls (WKY) submitted to training (T) or sedentary (S) protocols. Comparisons made by ANOVA with repeated measurements [A: $F(5,52) = 36.7, P < 0.001$] and two-way factorial ANOVA (bar graphs): B: group $F(1,52) = 110.0, P < 0.001$, condition $F(1,52) = 5.54, P = 0.022$, interaction $F(1,52) = 5.93, P = 0.018$; C: group $F(1,52) = 32.34, P < 0.001$, condition $F(1,52) = 3.71, P = 0.059$, interaction $F(1,52) = 2.13, P = 0.150$; D: group $F(1,52) = 78.43, P < 0.001$, condition $F(1,52) = 5.18, P = 0.027$, interaction $F(1,52) = 4.34, P = 0.042$. Significances ($P < 0.05$) are #vs. week 0; *vs. respective WKY group; †vs. respective S control. LF, low frequency; SAP, systolic arterial pressure.

EQ: 1

AQ: 15

ImmunoResearch, 1:500 dilution for each). Tissues were submitted to three 5-min 0.1 M PBS washes and mounted in gelatinized slides.

PVN sections were carefully examined in a fluorescence microscopy (Axioimager A1 Zeiss, Munchen, Germany). Images were acquired with identical acquisition settings. The immunofluorescence signal was measured into the ventromedial subnucleus of the medial PVN (same specific AOI). The calculation of background intensity, the threshold setting, and the quantification of the immunoreactivity were made as previously described (23). Imaging analysis was performed with ImageJ software (NIH) and expressed as percent area occupied by the thresholded signal/total AOI area. Values of several slices were averaged to yield a mean PVN value/rat. Selected PVN slices were reexamined with a Zeiss LSM780-NLO confocal microscope (Wetzlar, Germany) of the Core Facilities of Biomedical Sciences Institute, as previously described (25).

Statistical Analysis

Data were expressed as means ± SE. All results were submitted to homogeneity variance test (Shapiro–Wilk). The treadmill performance during T and S protocols was analyzed by two-way ANOVA with repeated measurements (time). Differences in functional measurements, BBB permeability, and gene and protein expression between groups and conditions were analyzed by two-way factorial ANOVA. Tukey was the post hoc test. Correlation analyzes used the Pearson’s statistics. All analyzes were performed using the

GraphPad Prism 8 software. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Treadmill Performance and Functional Data

Since the beginning and during the experimental protocols, SHR exhibited better treadmill performance than respective age-matched controls (Fig. 1A). There was in both trained groups, a significant and similar increase in velocity attained after 4 wk of daily exercise. Sedentary groups showed no change (WKY-S) or small decrease (SHR-S) in the treadmill performance. At the end of protocols, mean arterial pressure (MAP; +1.6-fold), SAP variability (+2.6-fold), and vasomotor sympathetic activity (LF-SAP, +7.2-fold) were markedly increased in SHR-S versus WKY-S; in contrast, they were significantly reduced in SHR-T versus SHR-S (Fig. 1, B–D). No changes were observed in WKY-T versus WKY-S. SHR-S showed higher resting HR (+8.4% versus WKY-S, Fig. 2A) that was accompanied by elevated sympathetic and reduced parasympathetic activities (+132% and –55%, for LF-PI and HF-PI, respectively, Fig. 2, C and D) and by a 58% decrease in PI variability (Fig. 2B). When compared with SHR-S, SHR-T exhibited a trend to reduce sympathetic and increase parasympathetic modulation, thus showing a near normal sympathovagal balance to the heart (LF/HF ratio, Fig. 2E). These adaptive responses contributed to both the great increase in PI variability and the significant

AQ: 9

F1

F2

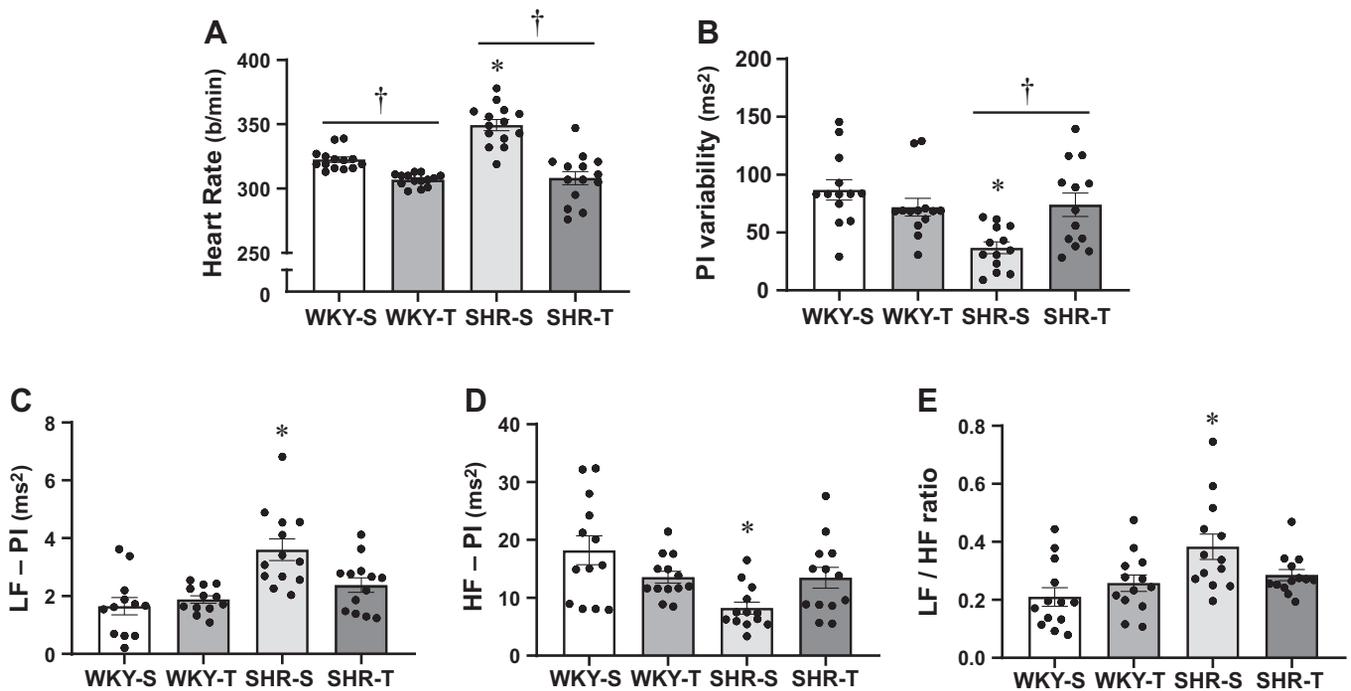


Figure 2. Training-induced changes on resting heart rate (A), PI variability (B), sympathetic (C, LF-PI), and parasympathetic (D, HF-PI) activities and sympathovagal balance (E, LF/HF ratio) to the heart in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive controls (WKY) submitted to training (T) or sedentary (S) protocols. Comparisons made by two-way factorial ANOVA. A: group $F(1,52) = 15.73$, $P < 0.001$, condition $F(1,52) = 63.35$, $P < 0.001$, interaction $F(1,52) = 13.06$, $P < 0.001$; B: group $F(1,48) = 8.83$, $P = 0.005$, condition $F(1,48) = 1.91$, $P = 0.174$, interaction $F(1,48) = 10.44$, $P = 0.002$; C: group $F(1,48) = 7.74$, $P = 0.008$, condition $F(1,48) = 0.95$, $P = 0.335$, interaction $F(1,48) = 3.26$, $P = 0.078$; D: group $F(1,48) = 10.43$, $P = 0.002$, condition $F(1,48) = 0.23$, $P = 0.632$, interaction $F(1,48) = 2.89$, $P = 0.094$; E: group $F(1,48) = 7.73$, $P = 0.008$, condition $F(1,48) = 1.02$, $P = 0.318$, interaction $F(1,48) = 5.55$, $P = 0.023$. Significances ($P < 0.05$) are *vs. respective WKY group; †vs. respective S control. HF, high frequency; LF, low frequency; PI, pulse interval.

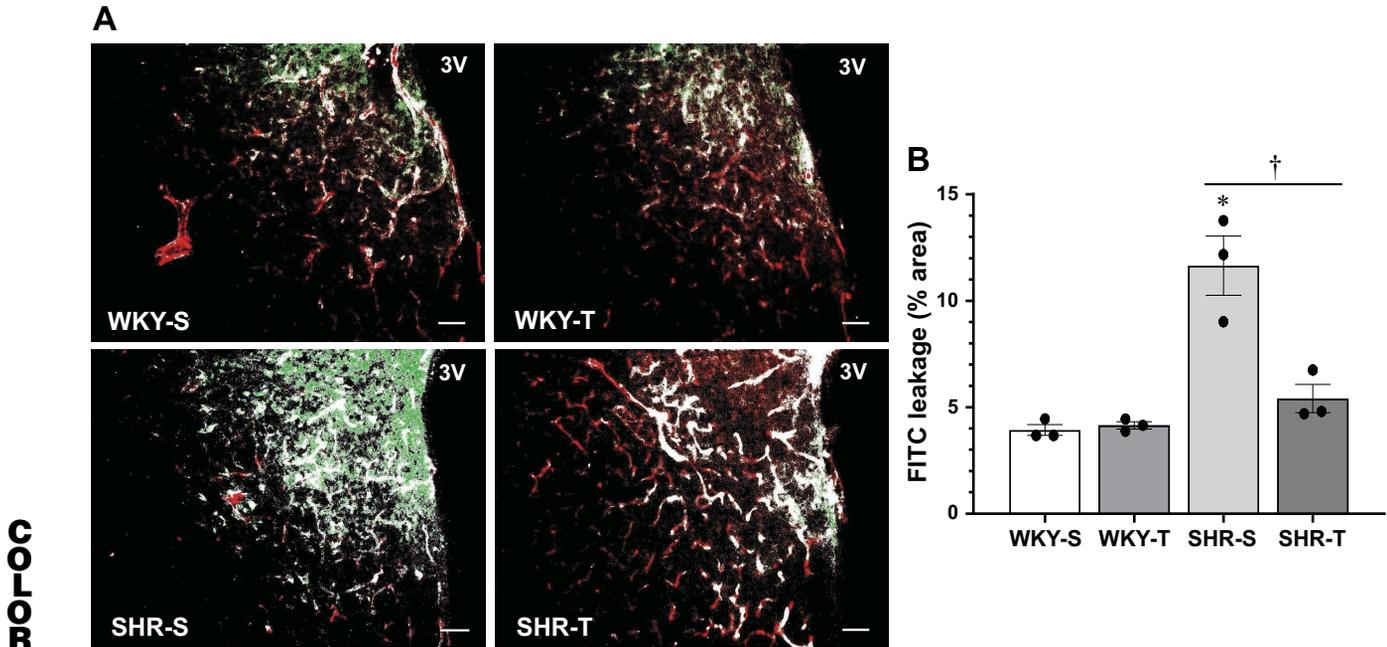


Figure 3. A: PVN images showing the capillary profile (Rhodamine-70kDa, red), the FITC-10kDa leakage (green) into the brain parenchyma, and the colocalization of both inside capillaries (white) in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive control (WKY) submitted to training (T) or sedentary (S) protocols. Scale bars = 50 μ m. B: bar graph comparing FITC leakage into brain parenchyma in the 4 experimental groups. Values are the means of 4–6 PVN slices/rat, 3 rats/group. Comparisons made by two-way factorial ANOVA. B: group $F(1,8) = 32.43$, $P < 0.001$, condition $F(1,8) = 14.56$, $P = 0.005$, interaction $F(1,8) = 16.77$, $P = 0.003$. Significances ($P < 0.05$) are *vs. respective WKY group; †vs. respective S control. PVN, paraventricular nucleus of hypothalamus.

HR decrease observed in SHR-T (+102% and -12%, respectively, Fig. 2, A and B). Only small not significant changes on PI variability and respective spectral components were observed in WKY-T versus WKY-S but training

still caused a significant resting HR reduction (-5% in WKY-T, Fig. 2A).

Hypertension- and Training-Induced Changes on BBB Permeability

After the functional recordings, rats were anesthetized to evaluate BBB permeability. Hypertension was characterized by a huge leakage of FITC-dextran 10 kD within the PVN ($11.7 \pm 2.4\%$, a 3-fold increase over WKY-S values, Fig. 3, A and B). In contrast, aerobic training markedly reduced and normalized FITC leakage into the brain parenchyma of the SHR-T, thus correcting BBB dysfunction. No significant changes were observed in the WKY-T versus WKY-S.

To uncover the mechanisms conditioning hypertension- and exercise-induced changes, next we analyzed gene expression of different constituents of the BBB. Except for the caveolin-1 mRNA expression, in which the significant condition factor interacts with the group factor with a significant reduction in SHR-T versus SHR-S, hypertension did not change gene expression (Table 2). Exercise training caused, in both groups, only mild reductions in laminin- α 2 and collagen-IV α 1 (major components of the basement membrane) and PDGFR β (a marker of pericytes) mRNA expression in which the condition factor attained significance (Table 2). Occludin mRNA expression showed a significant group-condition interaction but no significant differences between the four subgroups. Neither hypertension nor aerobic training affected gene expression of claudin-5 and zonula occludens-1, constituents of the tight junctions' structure (Table 2). Also, aquaporin-4 mRNA expression, a marker of

Table 2. Gene expression of the various constituents of BBB within the PVN of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) submitted to aerobic training (T) or kept sedentary (S) for 4 wk

mRNA (Fold Change)	WKY-S	WKY-T	SHR-S	SHR-T
Caveolin-1	1.73 \pm 0.25	1.15 \pm 0.24	2.46 \pm 0.37	1.05 \pm 0.20 [†]
Claudin-5	0.98 \pm 0.19	0.73 \pm 0.06	1.08 \pm 0.07	0.76 \pm 0.06
Occludin	1.04 \pm 0.22	0.82 \pm 0.11	1.22 \pm 0.19	1.00 \pm 0.06
Zonula Occludens-1	1.09 \pm 0.28	0.88 \pm 0.05	1.10 \pm 0.12	0.90 \pm 0.09
Laminin- α 2	1.04 \pm 0.11	0.89 \pm 0.12	0.98 \pm 0.09	0.58 \pm 0.10
Collagen-IV α 1	1.05 \pm 0.08	0.69 \pm 0.24	1.43 \pm 0.21	0.92 \pm 0.13
PDGFR β	1.13 \pm 0.22	0.89 \pm 0.12	1.23 \pm 0.21	0.91 \pm 0.06
Aquaporin-4	1.26 \pm 0.34	1.00 \pm 0.13	1.09 \pm 0.11	1.22 \pm 0.12

Values are means \pm SE of 7 or 8 rats/group. Comparisons made by two-way factorial ANOVA. Caveolin-1: group $F(1,26) = 2.20$, $P = 0.151$, condition $F(1,26) = 9.48$, $P = 0.005$, interaction $F(1,26) = 4.27$, $P = 0.048$; Claudin-5: group $F(1,26) = 0.56$, $P = 0.461$, condition $F(1,26) = 0.59$, $P = 0.445$, interaction $F(1,26) = 0.94$, $P = 0.341$; Occludin: group $F(1,26) = 0.01$, $P = 0.961$, condition $F(1,26) = 0.25$, $P = 0.622$, interaction $F(1,26) = 5.56$, $P = 0.025$; Zonula Occludens-1: group $F(1,26) = 0.26$, $P = 0.617$, condition $F(1,26) = 3.16$, $P = 0.086$, interaction $F(1,26) = 0.11$, $P = 0.746$; Laminin- α 2: group $F(1,26) = 1.95$, $P = 0.174$, condition $F(1,26) = 8.85$, $P = 0.006$, interaction $F(1,26) = 0.84$, $P = 0.369$; Collagen-IV α 1: group $F(1,26) = 2.80$, $P = 0.108$, condition $F(1,26) = 5.72$, $P = 0.025$, interaction $F(1,26) = 0.14$, $P = 0.710$; PDGFR β : group $F(1,26) = 0.27$, $P = 0.596$, condition $F(1,26) = 5.73$, $P = 0.024$, interaction $F(1,26) = 0.11$, $P = 0.738$; Aquaporin-4: group $F(1,26) = 0.31$, $P = 0.580$, condition $F(1,26) = 1.30$, $P = 0.264$, interaction $F(1,26) = 0.07$, $P = 0.796$. BBB, blood-brain barrier.

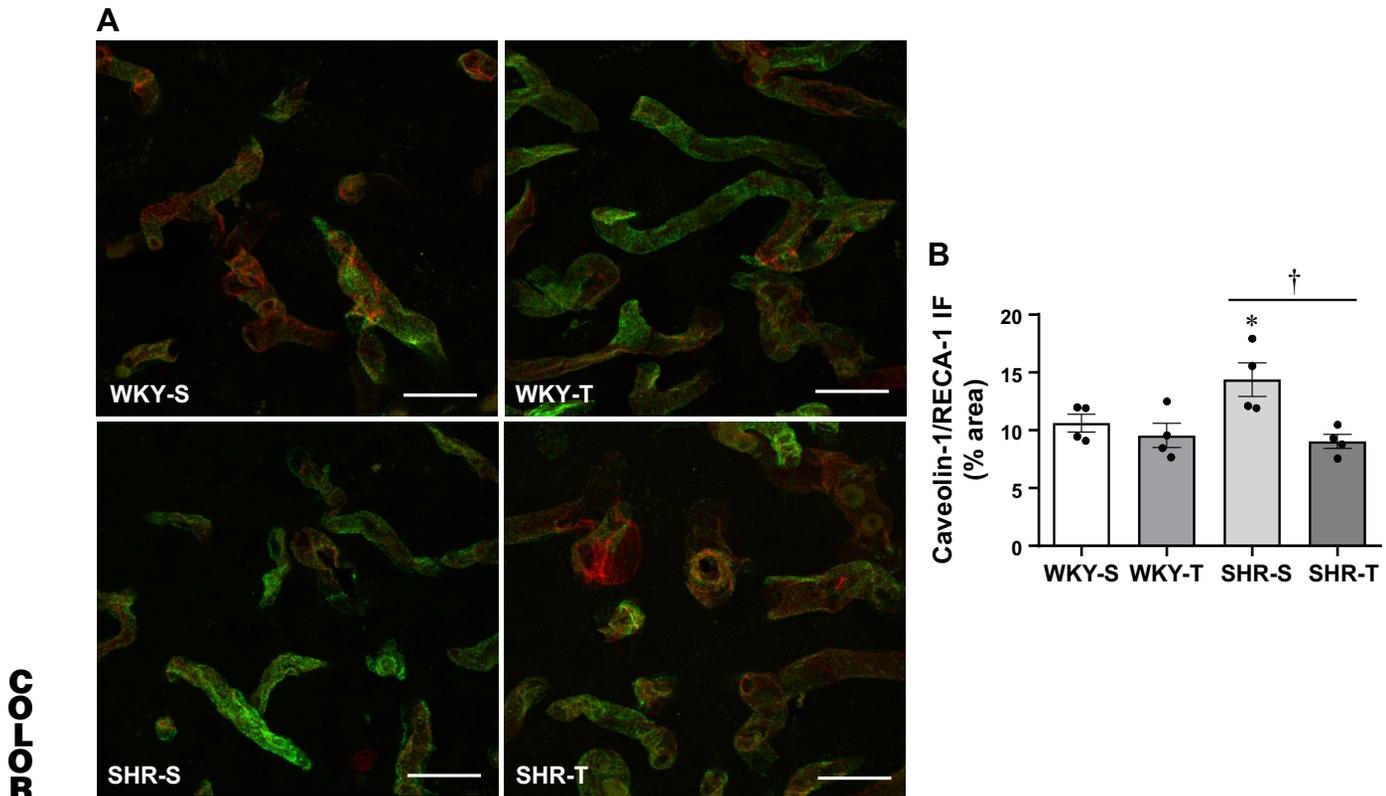


Figure 4. *A:* confocal images showing the expression of caveolin-1 (green) within PVN capillaries (RECA-1, red) and the colocalization of both (yellow) in sedentary (S) and trained (T) normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. Scale bars = 20 μ m. *B:* bar graph comparing the immunofluorescence of caveolin-1 in the 4 experimental groups. Values are the means of 4–6 PVN slices/rat, 4 rats/group. Comparisons made by two-way factorial ANOVA. *B:* group $F(1,12) = 3.42$, $P = 0.089$, condition $F(1,12) = 9.01$, $P = 0.011$, interaction $F(1,12) = 5.62$, $P = 0.035$. Significances ($P < 0.05$) are *vs. respective WKY group; †vs. respective S control. PVN, paraventricular nucleus of hypothalamus.

astrocytes' endfeet, was not changed by hypertension and exercise (Table 2).

Knowing that transcellular vesicles and paracellular space are the main pathways for substances' transport across the BBB and to confirm our leakage and gene expression data, we analyzed the effects of hypertension and exercise training on protein expression of vesicles and tight junctions' constituents. Caveolin-1 was used as a marker of transcytosis. It is the main component of transcellular vesicles' membrane, whose oligomerization is necessary for the expansion of caveolar invaginations and the formation of caveolar endocytic vesicles (26, 27). Since claudin-5, an integral membrane protein that composes tight junctions' strands, is the major physical barrier for preventing small solutes and water permeation through the space between adjacent endothelial cells (4, 28), it was used as a surrogate of the paracellular transport.

Within PVN capillaries (marked by RECA-1 antibody), caveolin-1 immunofluorescence staining was significantly higher in SHR-S ($14.40 \pm 1.45\%$ area, an increase of 41% when compared with WKY-S, Fig. 4, A and B). Importantly, aerobic training was highly effective to reduce and normalize caveolin-1 immunoreactivity in the SHR-T group. We observed that exercise training only caused a small not significant reduction on caveolin-1 immunoreactivity in normotensive rats (Fig. 4B). Claudin-5

immunofluorescence was exceedingly small in SHR-S ($0.032 \pm 0.006\%$ area) and similar to that observed in WKY-S controls (Fig. 5, A and B). Unexpectedly, SHR-T rats exhibited a significant increase in claudin-5 content within PVN capillaries ($0.160 \pm 0.031\%$ area, Fig. 5, A and B). There was only a small not significant increase in claudin-5 expression in WKY-T versus WKY-S group.

Within the PVN, BBB Caveolin-1 Correlates with Sympathetic Activity to Heart and Vessels

In a previous paper, we reported in SHR a strong relationship between training-induced reduction in BBB permeability and improved autonomic function after exercise (18). To further evaluate this relationship and to investigate whether transcytosis changes across the BBB do contribute to the amelioration of autonomic function, we correlated changes in caveolin-1 immunoreactivity with SAP and PI variabilities and their spectral components. Training-induced reduction in caveolin-1 content within the BBB was positively correlated with both reduced SAP variability and reduced LF-SAP only in the SHR groups (Fig. 6, B and C). In contrast, reduced caveolin-1 immunoreactivity in SHR was correlated with increased PI variability and reduced LF/HF ratio (Fig. 6, E and F). Caveolin-1 content changes were also positively correlated with resting HR values (Fig. 6D) but not with baseline MAP levels (Fig. 6A).

FOFOC

F4

F5

F6

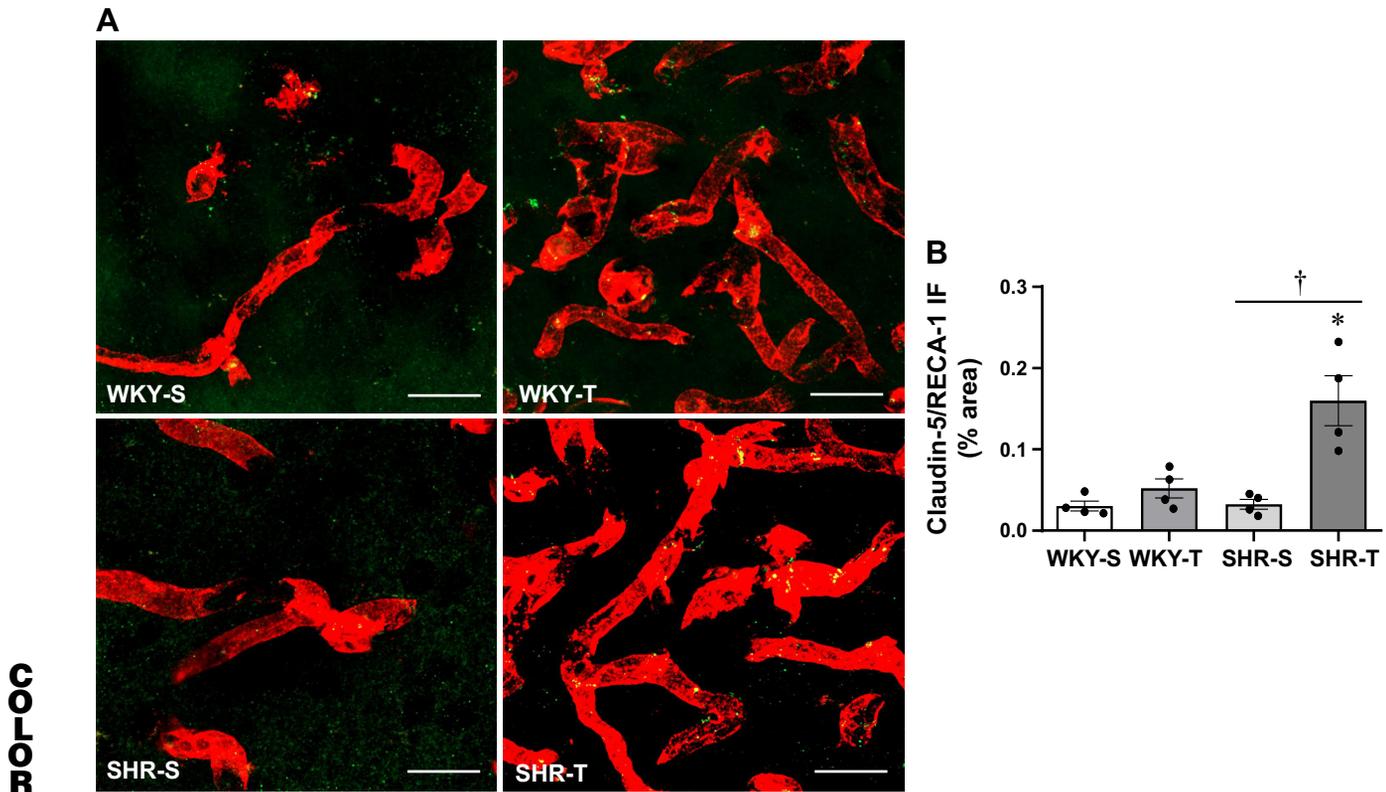


Figure 5. A: confocal images showing the expression of claudin-5 (green) within PVN capillaries (RECA-1, red) and the colocalization of both (yellow) in sedentary (S) and trained (T) spontaneously hypertensive rats (SHR). Scale bars = 20 μ m. B: bar graph comparing the immunofluorescence of claudin-5 in the 4 experimental groups. Values are the means of 4–6 PVN slices/rat, 4 rats/group. Comparisons made by two-way factorial ANOVA. B: group $F(1,12) = 10.28$, $P = 0.007$, condition $F(1,12) = 19.12$, $P < 0.001$, interaction $F(1,12) = 9.55$, $P = 0.009$. Significances ($P < 0.05$) are *vs. respective WKY group; †vs. respective S control. PVN, paraventricular nucleus of hypothalamus.

DISCUSSION

The present set of data confirmed previous observations that hypertension was accompanied by BBB dysfunction within the PVN (16–18) and that exercise training was highly effective to correct it (18). In addition, several new observations were made. The original findings are as follows: 1) the increased BBB leakage in hypertension is accompanied by augmented caveolin-1 gene and protein expression without changing gene and protein expression of claudin-5, a protein that composes tight junctions' strands; 2) exercise training decreases BBB leakage in SHR and normalizes its function by markedly reducing caveolin-1 content; 3) reduced BBB expression of caveolin-1 (an important marker of transcytosis) within the PVN is strongly correlated with the amelioration of autonomic function in trained SHR; 4) SHR-T also exhibits increased claudin-5 expression indicative of strengthened tight junctions; 5) increased and decreased transcytosis across the BBB (with unchanged paracellular transport) are the main determinants of autonomic deficits in hypertension and training-induced benefits, respectively.

It is well known that the BBB acts as a selective barrier between the systemic circulation and the central nervous system restricting the entrance of circulating substances into the brain parenchyma (1, 2). Not only the presence of high-resistance tight junctions in between the borders of endothelial cells blocks the paracellular transport of hydrosoluble

substances, but also the transcytosis across the endothelial cell is kept in exceptionally low levels (3, 5, 29). Therefore, the presence of an intact BBB maintains a normal extracellular milieu with no leakage of plasma substances within the brain parenchyma. It is also known that stroke, trauma, and other neurodegenerative diseases (7–11), as well as chronic hypertension (16–18), exhibit a marked leakage of plasma substances within several brain areas. There are scarce and conflicting information regarding the mechanism(s) conditioning the transport across the BBB: although no evidence of structural tight junctions' disruption was reported in stroke (9), disrupted membrane distribution of tight junction proteins was observed in the hippocampus and cortex, as well as human endothelial cell culture (14, 30, 31). In transient middle cerebral artery occlusion, a bimodal increase in BBB permeability was determined by early transcytosis followed by a late loss of tight junctions' proteins (32, 33). In experimental models of hypertension, except for observations on damaged glycocalyx within the hypothalamus of the SHR (15), claudins' mRNA reduction into the cortex of coarcted hypertensive rats (34), and loss of tight junctions within the hippocampus in Dahl-salt hypertension (14, 31), there was no data indicating the mechanisms conditioning increased BBB permeability into the autonomic areas.

The present set of data indicated that the intense PVN BBB leakage in the chronic phase of hypertension was due to augmented transcellular transport across the endothelial

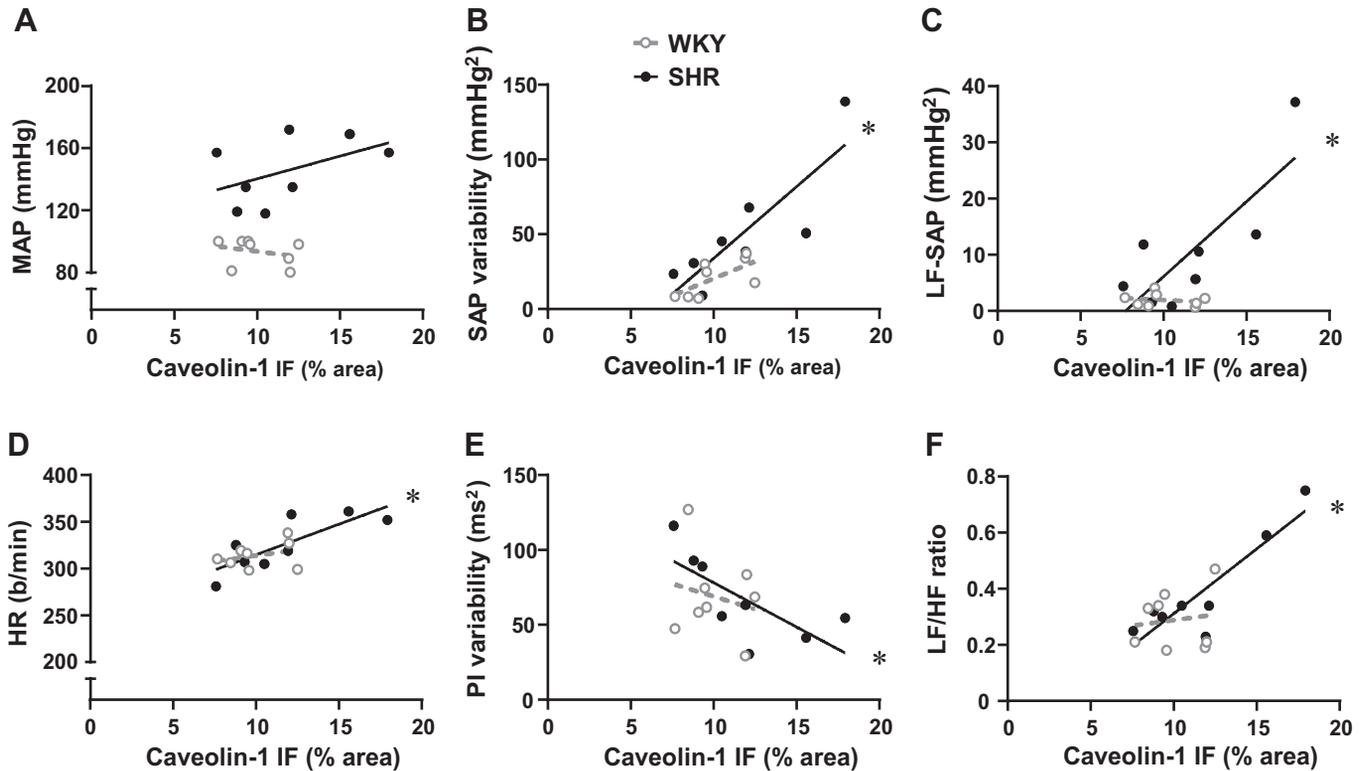


Figure 6. Correlations between PVN caveolin-1 immunoreactivity and autonomic parameters in sedentary and trained spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive controls (WKY). Correlations with resting values of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) are also shown. Regression equations, correlation coefficients, and *P* values are as follows. **A:** Cav-1 \times MAP: $Y_{WKY} = -1.37x + 107$, $r = -0.285$, $P = 0.494$; $Y_{SHR} = 2.91x + 111$, $r = 0.479$, $P = 0.230$; **B:** Cav-1 \times SAP variability: $Y_{WKY} = 4.55x - 25$, $r = 0.668$, $P = 0.070$; $Y_{SHR} = 9.55x - 61$, $r = 0.846$, $P = 0.008$; **C:** Cav-1 \times LF-PAS: $Y_{WKY} = -0.15x + 3$, $r = -0.223$, $P = 0.595$; $Y_{SHR} = 2.67x - 21$, $r = 0.804$, $P = 0.016$; **D:** Cav-1 \times HR: $Y_{WKY} = 2.50x + 289$, $r = 0.327$, $P = 0.429$; $Y_{SHR} = 6.56x + 249$, $r = 0.664$, $P = 0.017$; **E:** Cav-1 \times PI variability: $Y_{WKY} = -3.40x + 103$, $r = -0.213$, $P = 0.613$; $Y_{SHR} = -5.89x + 137$, $r = -0.718$, $P = 0.045$; **F:** Cav-1 \times LF/HF ratio: $Y_{WKY} = 0.01x + 0.21$, $r = 0.132$, $P = 0.755$; $Y_{SHR} = 0.05x - 0.15$, $r = 0.894$, $P = 0.003$. Cav-1, caveolin-1; HF, high frequency; LF, low frequency; PI, pulse interval PVN, paraventricular nucleus of hypothalamus; SAP, systolic arterial pressure.

AQ: 16
AQ: 17

cell, as indicated by the increased caveolin-1 gene and protein expression within brain capillaries of the SHR-S. This finding suggests that hypertension deregulates an intrinsic functional property of autonomic brain capillaries for maintaining a low transcellular vesicles traffic. Indeed, Andreone et al. (3) identified in intact mice that the low rate of transcytosis, due to suppression of both caveolin-1 and caveolae formation, is a unique property of brain endothelial cells relative to peripheral endothelial cells to maintain BBB integrity under normal conditions. Increased transcytosis following stroke in mice was also observed within the cortex (33, 35) and in cell culture treated with angiotensin II (30). Our data also showed that claudin-5, occludin, and zonula occludens-1 (ZO-1) mRNA expression, as well as claudin-5 protein immunoreactivity, were not altered in SHR-S versus age-matched controls, suggesting that tight junctions, and therefore the paracellular transport, remained intact within the PVN of chronic hypertensive rats. Unaffected capillary tight junctions' proteins were also observed in the cortex of both SHR (36) and mice (35) submitted to stroke, in the striatum of obese mice after the transient middle cerebral artery occlusion (37) and in cell culture (38).

An important original observation of this study was the training-induced reduction in PVN leakage, which was due to a marked reduction in caveolin-1 gene and protein expression in SHR-T to a level like that of WKY groups. This finding

indicates that correction of hypertension-induced BBB dysfunction was also mediated by changes in transcytosis. It should be noted that the normal transcellular transport in SHR-T was achieved even in the presence of elevated blood pressure levels. We also observed that exercise training not only maintained tight junctions' integrity, but also increased claudin-5 protein expression, a structural BBB component that plays an essential regulatory role in paracellular permeability to small molecules. Indeed, in claudin-5-deficient mice, Nitta et al. (28) observed that blood vessels morphology was not altered but BBB selectivity to molecules smaller than 800 Da was largely compromised. The increased claudin-5 expression within the BBB could be an additional factor to augment its selectivity to hydrosoluble substances of low molecular weight while maintaining the structural integrity of tight junctions in the SHR-T.

Importantly, exercise-induced normalization of transcytosis (with the consequent correction of BBB function) in hypertensive rats was accompanied by improved autonomic control of the circulation, as indicated by the reduced sympathetic vasomotor activity and sympathovagal balance to the heart. Indeed, both LF-SAP and LF/HF ratio, as well as SAP variability, were largely reduced in the presence of decreased caveolin-1 content within PVN capillaries, with strong positive correlations between them. Reduced caveolin-1 expression was also accompanied by increased PI

variability. These results indicate that restoration of BBB function in exercised SHR improves PVN perfusion, a crucial event for normal neuronal activity and autonomic information processing.

Conclusions

The increased BBB permeability in SHR-S simultaneously with increased caveolin-1 expression, the reduced BBB leakage in SHR-T simultaneously with reduced caveolin-1 content, and the strong correlations between SHR's caveolin-1 immunostaining with several autonomic parameters suggested that transcytotic vesicles' change (as indicated by caveolin-1 expression) is one important mechanism conditioning BBB dysfunction in hypertension as well as its correction by exercise training. Indeed, augmented caveolin-1 content in hypertension favors the formation of transcellular vesicles and increases transcellular transport, whereas exercise training normalizes both. Exercise-induced increase in claudin-5 expression also pointed out to strengthened tight junctions in SHR-T.

Perspectives and Significance

The present set of data revealed that hypertension-induced BBB leakage within the PVN and the consequent unbalance of sympathetic/parasympathetic control of the circulation could be promptly corrected by exercise training. Although our data on caveolin expression should be confirmed by vesicles' counting, the positive correlations obtained and previous observations that, in the presence of BBB leakage, plasma angiotensin II permeates the brain parenchyma and augment sympathetic outflow (16, 18) strongly suggest the involvement of absorptive transcytosis. Importantly, these deleterious hypertension-induced effects are promptly corrected by exercise training, even it did not normalize blood pressure level. Indeed, training-induced improvement of the autonomic control increases heart rate variability and reduces pressure variability, therefore minimizing the main stimuli for end-organ damage, a decisive risk factor in hypertension. These findings are of great importance and uncover an easy way—the aerobic exercise—to normalize BBB function and improve the perfusion within the PVN whose neuronal activity is crucial for autonomic information processing. The results of this study do support the prescription of moderate aerobic training to hypertensive individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mario Costa Cruz and the Core Facility for Scientific Research – University of Sao Paulo (CEFAP-USP/CONFOCAL) for helping with the Confocal microscope. We also thank Professor Dr. Martin Andreas Metzger and Dr. Ana Maria P. Campos for helping us with immunofluorescence assays.

GRANTS

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Research Grant 2018/14544-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES-Finance Code 001, Fellowship to M.G.F.), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant 304070/2019-0, Research Fellow to L.C.M.).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AQ: 12

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.C.M. conceived and designed research; M.G.F., V.B.C., G.G.D., C.R.-S., and A.C. performed experiments; M.G.F., V.B.C., G.G.D., C.R.-S., A.C., and L.C.M. analyzed data; M.G.F. and L.C.M. interpreted results of experiments; M.G.F. and L.C.M. prepared figures; L.C.M. drafted manuscript; L.C.M. edited and revised manuscript; M.G.F., V.B.C., G.G.D., C.R.-S., A.C., and L.C.M. approved final version of manuscript.

AQ: 13

REFERENCES

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53, 2006. doi:10.1038/nrn1824.
- Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020412, 2015. doi:10.1101/cshperspect.a020412.
- Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, Deik AA, Ginty DD, Clish CB, Gu C. Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis. *Neuron* 94: 581–594.e5, 2017. doi:10.1016/j.neuron.2017.03.043.
- Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol* 38: 16–25, 2015. doi:10.1016/j.semcdb.2014.11.004.
- Keane J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J* 282: 4067–4079, 2015. doi:10.1111/febs.13412.
- Hagan N, Ben-Zvi A. The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 38: 7–15, 2015. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.006.
- De Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol Rev* 49: 143–155, 1997.
- Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension* 62: 810–817, 2013. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01063.
- Krueger M, Härtig W, Reichenbach A, Bechmann I, Michalski D. Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. *PLoS One* 8: e56419, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0056419.
- Rosenberg GA. Blood-brain barrier permeability in aging and Alzheimer's disease. *J Prev Alzheimers Dis* 1: 138–139, 2014. doi:10.14283/jpad.2014.25.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178–201, 2008. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003.
- Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D. Arterial hypertension and brain damage—evidence from animal models. *Clin Exp Hypertens* 25: 359–380, 2003. doi:10.1081/CEH-120023545.
- Mueller SM, Heistad DD. Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier. *Hypertension* 2: 809–812, 1980. doi:10.1161/01.hyp.2.6.809.
- Pelisch N, Hosomi N, Mori H, Masaki T, Nishiyama A. RAS inhibition attenuates cognitive impairment by reducing blood-brain barrier permeability in hypertensive subjects. *Curr Hypertens Rev* 9: 93–98, 2013. doi:10.2174/15734021113099990003.
- Ueno M, Sakamoto H, Liao YJ, Onodera M, Huang CL, Miyataka H, Nakagawa T. Blood-brain barrier disruption in the hypothalamus of young adult spontaneously hypertensive rats. *Histochem Cell Biol* 122: 131–137, 2004. doi:10.1007/s00418-004-0684-y.
- Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension* 63: 572–579, 2014. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01743.

AQ: 11

17. **Biancardi VC, Stern JE.** Compromised blood-brain barrier permeability: novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centres during hypertension. *J Physiol* 594: 1591–1600, 2016. doi:10.1113/JP271584.
18. **Buttler L, Jordão MT, Fragas MG, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC.** Maintenance of blood-brain barrier integrity in hypertension: a novel benefit of exercise training for autonomic control. *Front Physiol* 8: 1048, 2017. doi:10.3389/fphys.2017.01048.
19. **Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordão MT, Ceroni A, Michelini LC.** Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R958–R966, 2011. doi:10.1152/ajpregu.00104.2011.
20. **Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC.** Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 52: 514–521, 2008. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114744.
21. **Felix JV, Michelini LC.** Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius. *Hypertension* 50: 780–785, 2007. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.094474.
22. **Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PPS, Laurindo FR, Scavone C, Michelini LC.** Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One* 9: e94927, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0094927.
23. **Rocha-Santos C, Braga DC, Ceroni A, Michelini LC.** Activity-dependent neuroplastic changes in autonomic circuitry modulating cardiovascular control: the essential role of baroreceptors and chemoreceptors signaling. *Front Physiol* 11: 309, 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00309.
24. **Paxinos G, Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 2009.
25. **Santos CR, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC.** Exercise training abrogates age-dependent loss of hypothalamic oxytocinergic circuitry and maintains high parasympathetic activity. *J Neuroendocrinol*: e12601, 2018. doi:10.1111/jne.12601.
26. **Choi KH, Kim HS, Park MS, Kim JT, Kim JH, Cho KA, Lee MC, Lee HJ, Cho KH.** Regulation of caveolin-1 expression determines early brain edema after experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* 47: 1336–1343, 2016. doi:10.1161/STROKEAHA.116.013205.
27. **Zhao YL, Song JN, Zhang M.** Role of caveolin-1 in the biology of the blood-brain barrier. *Rev Neurosci* 25: 247–254, 2014. doi:10.1515/revneuro-2013-0039.
28. **Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S.** Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161: 653–660, 2003. doi:10.1083/jcb.200302070.
29. **Tietz S, Engelhardt B.** Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* 209: 493–506, 2015. doi:10.1083/jcb.201412147.
30. **Guo S, Som AT, Arai K, Lo EH.** Effects of angiotensin-II on brain endothelial cell permeability via PPARalpha regulation of para- and trans-cellular pathways. *Brain Res* 1722: 146353, 2019. doi:10.1016/j.brainres.2019.146353.
31. **Zhang M, Qin DN, Suo YP, Su Q, Li HB, Miao YW, Guo J, Feng ZP, Qi J, Gao HL, Mu JJ, Zhu GQ, Kang YM.** Endogenous hydrogen peroxide in the hypothalamic paraventricular nucleus regulates neurohormonal excitation in high salt-induced hypertension. *Toxicol Lett* 235: 206–215, 2015. doi:10.1016/j.toxlet.2015.04.008.
32. **Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y.** Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci* 44: 130–139, 2011. doi:10.1007/s12031-011-9496-4.
33. **Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, Hsu M, Lutz SE, Perrino J, Steinberg GK, Barres BA, Nimmerjahn A, Agalliu D.** Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron* 82: 603–617, 2014. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.003.
34. **Mohammadi MT, Dehghani GA.** Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. *Pathol Res Pract* 210: 985–990, 2014. doi:10.1016/j.prp.2014.05.007.
35. **Nahirney PC, Reeson P, Brown CE.** Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 413–425, 2016. doi:10.1177/0271678X15608396.
36. **Hom S, Fleegal MA, Egleton RD, Campos CR, Hawkins BT, Davis TP.** Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1881–R1892, 2007. doi:10.1152/ajpregu.00761.2005.
37. **Haley MJ, Lawrence CB.** The blood-brain barrier after stroke: structural studies and the role of transcytotic vesicles. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 456–470, 2017. doi:10.1177/0271678X16629976.
38. **Fleegal-DeMotta MA, Doghu S, Banks WA.** Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 640–647, 2009. doi:10.1038/jcbfm.2008.158.

AQ: 14