MATHEUS GARCIA DE FRAGAS

Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão/atividade de diferentes componentes da barreira hematoencefálica

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

Universidade de São Paulo

2018

MATHEUS GARCIA DE FRAGAS

Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão/atividade de diferentes componentes da barreira hematoencefálica

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

Área de Concentração: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana

Orientadora: Profª Drª Lisete Compagno Michelini

Universidade de São Paulo

2018

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)

Fragas, Matheus Garcia de
Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão/atividade de diferentes componentes da barreira hematoencefálica / Matheus Garcia de Fragas; orientadora Lisete Compagno Michelini. -- São Paulo, 2018.
54 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ratos espontaneamente hipertensos. 2. barreira hematoencefálica. 3. transcitose. I. Michelini, Lisete Compagno, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Matheus Garcia de Fragas

Titulo da Dissertação/Tese: Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de diferentes componentes da barreira hematoencefálica.

Orientador: 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: .....

ICBUSP

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508.000
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 expressão de diferentes componentes da barreira hematoencefálica***", registrado sob o protocolo nº ***1/2016***, 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 ***20/04/2016*** 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: *Matheus Garcia de Fragas (Pós-graduando), Gustavo Gastão Davanzo (Pós-graduando), Carla Rocha dos Santos (Pós-graduando), Leila Buttler (Pós-graduando), Nilson Carlos Ferreira júnior (Pós-doutorando), Alexandre Ceroni (Especialista em 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 *http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702*. 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 expression of different components of the blood brain barrier***", protocol nº ***1/2016***, 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 ***4/20/2016*** 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: *Matheus Garcia de Fragas (Graduate Student), Gustavo Gastão Davanzo (Graduate Student), Carla Rocha dos Santos (Graduate Student), Leila Buttler (Graduate Student), Nilson Carlos Ferreira júnior (Postdoctoral 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
Ratus Novergicus	*SHR*	*Macho/Male*	*90 dias/days*	*100*
	Wystar Kyoto	*Macho/Male*	*90 dias/days*	*100*

São Paulo, 26 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Aos meus pais.

“-I will take the Ring, – he said, – though I do not know the way. ”(1)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profª Drª Lisete por todas a oportunidades e conhecimentos aprendidos durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Drº Alexandre Ceroni, pelos ensinamentos de técnicas cirúrgicas, bem estar animal, por ter me ajudado ativamente com as cirurgias, e pelos cafés.

À Carla e Gastão, pelo companheirismo e amizade, por dividir risadas e angústias na sala de cirurgia.

Aos meus pais Acácio e Rosana, por acreditarem em mim, e me apoiar todos esses anos.

Aos inúmeros antigos alunos do laboratório com quem aprendí muitas coisas.

Ao Professor Drº Martin Andreas Metzger, por todo o auxílio prestado e ainda por ceder o microscópio de fluorescência.

À Aninha, por toda ajuda com a Imunofluorescência, que me ensinou do zero uma técnica que vou levar para a vida

A Zé Maria e Paloma, por todos os auxílios prestados, tirando dúvidas e questionamentos sobre o funcionamento da pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de Mestrado, sem a qual não seria possível me manter em São Paulo

RESUMO

Fragas MG. Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de diferentes componentes da barreira hematoencefálica. [Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia humana)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2018.

A hipertensão arterial cursa com disfunção autonômica e lesão da barreira hematoencefálica (BHE) em áreas de controle autonômico. Demonstramos recentemente que o treinamento aeróbio corrige a lesão da BHE, e a disfunção autonômica, a qual se encontra correlacionada com a integridade da BHE observada nos hipertensos treinados. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão gênica e proteica de componentes da BHE envolvidos na mediação das respostas cardiovasculares à hipertensão e ao treinamento aeróbio (T). Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (WKY) (250-300g) foram submetidos ao protocolo de T em esteira ou mantido sedentários (S) por 4 semanas. Ao final do T os animais dos grupos experimentais foram canulados para aquisição das variáveis hemodinâmicas. A seguir procedeu-se à infusão intra-arterial de 2 corantes (Rodamina-d, 70 KD, e FITC-d,10 KD) e 20 min após os encéfalos foram coletados para realização de ensaios de fluorescência no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN). Outros ratos dos grupos experimentais foram perfundidos com salina via transcardíaca e realizada a microdissecção do PVN. O mRNA foi extraído e sua concentração de foi analisada pela técnica de RT-PCR. Para investigar os efeitos da hipertensão e do T nos componentes da BHE, foram utilizados os seguintes primers: Occludina, Claudina-5, Zônula Ocludens 1 (proteínas da junção oclusiva), Caveolina-1 (indicador de transporte transcelular), Laminina alfa 1 e Colágeno 4 (componentes da membrana basal), PDGFRβ (marcador de pericitos)e Aquaporina-4 (indicador de podócitos de astrócitos), todos eles normalizados para o HPRT endógeno. Os dados de PCR em tempo real foram quantificados pelo método 2ΔΔCT. Além disso, outros ratos dos mesmos grupos experimentais foram perfundidos com paraformaldeído 4% para a fixação do encéfalo. O tecido foi crioprotegido e seccionado em criostato, 30 um, os cortes foram incubados em anticorpos primários (Reca-1(marcador endotelial), Claudina-5, Caveolina-1, PDGFRβ e Aquaporina-4) e secundários (Alexa Flúor 488 e 594), e sua quantificação no PVN foi realizada através da densidade integrada. Não foi observada diferença na pressão arterial entre os grupos T e S, porém, houve bradicardia de repouso nos animais T (SHR-T:317±3 e WKY-T:308±2) comparados com os animais S (SHR-S: 344±4 e WKY-S: 323±3). A permeabilidade da

BHE foi reduzida e normalizada pelo T nos animais hipertensos (SHR-S: 13,6±1,2% e SHR-T: 3,8±0,4%; WKY-S: 3,9±0,2% e WKY-T: 4,1±0,16%). Não houve diferenças na expressão gênica de proteínas das junções oclusivas e da membrana basal, PDGFRβ e Aquaporina-4 entre os T e S, mas a expressão proteica de claudina-5 e de PDGFRβ encontravam-se aumentadas nos SHR-T vs. SHR-S. A expressão gênica e proteica de Caveolina-1 aumentada nos SHR-S vs. WKY-S, foi normalizada pelo T. **Conclusã**o: Nossos dados sugerem que o aumento da permeabilidade da BHE no PVN de hipertensos é devido ao aumento de transcitose, identificada pela elevada expressão de Caveolina-1, sem alterações no transporte paracelular. Por sua vez e que o treinamento aeróbio reverte esta permeabilidade ao reduzir o transporte transcelular além de intensificar a função de barreira pela elevada expressão de claudina-5 e dos podócitos dos astrócitos.

Palavras chave: ratos espontaneamente hipertensos, barreira hematoencefálica, transcitose, treinamento aeróbio, hipotálamo.

ABSTRACT

Fragas MG. Effects of hypertension and aerobic training on the expression / activity of different components of the blood-brain barrier. [Masters Thesis (Master of Science - Human Physiology)]. Sao Paulo. Institute of Biomedical Sciences. University of Sao Paulo; 2018.

The arterial hypertension courses with autonomic dysfunction and Blood Brain Barrier (BBB) damage in areas of autonomic control. We recently demonstrated that aerobic training corrects the damage to the BBB, and autonomic dysfunction, which is correlated with the integrity of the BBB observed in hypertensive trained. The objective of this work is to evaluate the gene and protein expression of BBB components involved in mediating cardiovascular responses to hypertension and aerobic training (T). Spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive controls (WKY) (250-300g) were submitted to treadmill protocol or maintained sedentary (S) for 4 weeks. At the end of the T, the animals of the experimental groups were cannulated to acquire the hemodynamic variables. Intra-arterial infusion of 2 dyes (Rhodamine-d, 70 KD, and FITC-d, 10 KD) and 20 min after the brain were collected for fluorescence assays in the Paraventricular Nucleus of hypothalamus (PVN). Other rats from the experimental groups were perfused with transcardiac saline and the microdissection of PVN was performed. The mRNA was extracted and its concentration was analyzed by the RT-PCR technique. To investigate the effects of hypertension and T in the BBB components, the following primers were used: Occludin, Claudine-5, Zonula Ocludens 1 (tight junction proteins), Caveolina-1 (indicator of transcellular transport), Laminin alfa 1 and Collagen 4 (basement membrane components), PDGFRβ (pericyte marker) and Aquaporin-4 (astrocyte podocyte indicator), all standardized for endogenous HPRT. Real-time PCR data were quantified by the method 2ΔΔCT. In addition, other rats from the same experimental groups were perfused with 4% paraformaldehyde for fixation of the brain. The tissue was cryoprotected and cross-sectioned, 30 μm, sections were incubated on primary (Reca-1 (endothelial marker), Claudin-5, Caveolin-1, PDGFRβ and Aquaporin-4) and secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and 594), and its quantification in PVN was performed through the integrated density. There was no difference in blood pressure between the T and S groups, but there was resting bradycardia in the T animals (SHR-T: 317 ± 3 and WKY-T: 308 ± 2) compared to S animals (SHR-S: 344 ± 4 and WKY-S: 323 ± 3). The permeability of BBB was reduced and

normalized by T in hypertensive animals (SHR-S: 13.6 ± 1.2% and SHR-T: 3.8 ± 0.4%; WKY-S: 3.9 ± 0, 2% and WKY-T: 4.1 ± 0.16%). No differences were observed in gene expression of tight junctions and basement membrane proteins, PDGFRβ and Aquaporin-4 between T and S, but protein expression of claudin-5 and PDGFRβ were augmented in SHR-T vs. SHR-S. Gene and protein expression of Caveolin-1, increased in the SHR-S vs. WKY-S, were normalized by T. **Conclusion:** Our data suggest that increased BBB permeability within the PVN of hypertensive individuals is due to increased transcytosis identified by increased expression of Caveolin-1, without changes in paracellular transport. In contrast, aerobic training reverses and normalizes BBB permeability by reducing transcellular transport, in addition to intensify barrier function by the increased expression of claudin-5 and astrocytes' endfeet.

Key-words: spontaneously hypertensive rats, blood-brain barrier aerobic training, transcytosis, hypothalamus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. Evolução temporal do desempenho em esteira em SHR e WKY. 27

Figura 4. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a frequência cardíaca de repouso nos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). Significância (P<0,05) * vs. WKY; β vs. Respectivo controle sedentário. 29

Figura 5. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a pressão arterial média (A) e sobre a razão peso dos ventrículos/comprimento da tíbia (PV/CT) em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) durante as 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S. 30

Figura 6. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a variabilidade do Intervalo de Pulso (IP, painel A), e seus componentes espectrais de alta (HF-IP, painel B) e baixa frequência (LF-IP, painel C), e sobre o balanço simpato-vagal ao coração (razão LF/HF, painel D) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. Sedentário 31

Figura 7. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a variabilidade da Pressão Arterial Sistólica (PAS) sobre seu componente spectral de baixa frequência (LF-PAS) e sobre o barorreflexo espontâneo (Alfa LF) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S. 32

Figura 8. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a permeabilidade da BHE no PVN de SHR e WKY .A- imagens da colocalização de Rodamina-70kD (vermelho) e FITC-10kD (verde). B- quantificação do FITC extravasado para o parênquima encefálico. Valores foram obtidos em 4-6 cortes/rato, 3 ratos/grupo. 3V, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S 33

Figura 9. Comparação da densidade de capilares no PVN, evidenciada pela Imunofluorescência para RECA-1 em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T). Fotomicrografias em menor aumento (A, barra=... µm) ilustrando o PVN bilateralmente e em maior aumento comparando a densidade capilar nos 4 grupos experimentais (B, barra= .....µm). C, dados quantitativos da Imunofluorescência para RECA-1 no PVN ventromedial. 12-16 cortes/rato, 4 ratos/grupo. 34

Figura 10. Expressão gênica das proteínas constituintes da junção oclusiva no PVN de SHR e WKY sedentários (S) ou treinados (T). Os gráficos indicam a expressão gênica de CLDN-5 (A), OCLN (B) e ZO-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). 6-8 animais por grupo. 36

Figura 11. Expressão proteica de Claudina-5 em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S). 36

Figura 12. Expressão gênica de Caveolina-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) após 4 semanas experimentais. n= 6-8 animais por grupo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. S. 37

Figura 13. Expressão proteica de Caveolina-1 no PVN_{Vm} de SHR e WKY treinados (T) e sendentários (S). A- Imunoreatividade de CAV-1 (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato. 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivos controles S..... 38

Figura 14. Expressão gênica de Lama2 (A) e Col4a1(B) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) após 4 semanas experimentais. n= 6-8 animais por grupo. 38

Figura 15. Expressão gênica de PDGFRβ no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). 6-8 animais por grupo. 39

Figura 16. Expressão proteica de PDGFRb no PVN de SHR e WKY treinados (T) e sendentários (S). 40

Figura 17. Expressão gênica de AQP-4 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY sendentários (S) ou treinados (T) após 4 semanas experimentais n=6-8 animais por grupo. 41

Figura 18. Expressão proteica de Aquaporina-4 no PVN de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S). A- Imunoreatividade de AQP-4 (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato. 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados na análise gênica dos diferentes componentes da BHE 23
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de Imunofluorescência..... 25

SUMÁRIO

1. Introdução **17**

1.2. Objetivos específicos: *20*

2. Materiais e Métodos: **20**

2.1. Animais e desenho experimental *20*

2.2. Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais *20*

2.3. Protocolo de Treinamento Físico ou Sedentarismo *21*

2.4. Mensuração da PA e FC basais *21*

2.5. Análise espectral de parâmetros cardiovasculares *21*

2.6. Obtenção dos tecidos encefálicos à fresco *22*

2.7. RT-PCR *22*

2.8. Injeção intravascular de corantes fluorescentes e análise da integridade da BHE *23*

2.9. Peso do Coração e Comprimento da Tíbia *24*

2.10.Obtenção de tecidos e ensaio de Imunofluorescência *24*

2.11.Análise estatística *27*

3. Resultados **27**

3.1. Eficácia do Treinamento *27*

3.1.1 Capacidade Aeróbia 27

3.1.2 Frequência Cardíaca basal 28

3.2. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre os valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Peso Ventricular em SHR e WKY. *29*

3.3. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a sobre a variabilidade do Intervalo de Pulso (IP) e seus componentes espectrais em SHR e WKY. *30*

3.4. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a variabilidade da PAS e seus componentes spectrais em SHR e WKY. *31*

3.5. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a permeabilidade da BHE no PVN de SHR e WKY. *33*

3.6. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a microcirculação no PVN ventromedial de SHR e WKY. *34*

3.7. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão dos diferentes componentes da BHE no PVN_{Vm} *de SHR e WKY* *34*

3.7.1. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de proteínas da Junção Oclusiva no PVN de SHR e WKY. *35*

3.7.2. .Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de vesículas de transporte transendotelial no PVN de SHR e WKY. *37*

3.7.3.Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre componentes da Membrana Basal *38*

3.7.4.Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de Pericitos no PVN de SHR e WKY. *39*

3.7.5.Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre os podócitos dos Astrócitos no PVN de SHR e WKY. *40*

5. Referências bibliográficas **48**

1. Introdução

A BHE é uma interface regulatória que separa a circulação periférica do SNC, é de fundamental importância para a homeostase do SNC. É formada por um sistema celular complexo composto por células endoteliais, membrana basal, pericitos e pelos podócitos dos astrócitos que recobrem a vasculatura (2–5). Diferente dos capilares periféricos, os capilares encefálicos com BHE functional se caracterizam por não possuir fenestras, baixa atividade pinocítica e células endoteliais com a presença de junções oclusivas de alta resistência entre as células. As células endoteliais e as junções oclusivas entre as células endoteliais formam uma barreira física que bloqueia o transporte paracelular, permitindo apenas o transporte transcelular entre o capilar e o interstício através de transportadores específicos (3). As junções oclusivas são formadas por três proteínas integrais transmembrana – a Claudina-5, a Ocludina e as moléculas de adesão juncional (JAMs), bem como proteínas citoplasmáticas acessórias (Zonula ocludens), estas ligam as proteínas de membrana à actina (proteína primária do citoesqueleto) mantendo a estrutura e integridade funcional do endotélio (6,7).

Pequenas moléculas lipossolúveis como o óxido nítrico e os gases sanguíneos como oxigênio e dióxido de carbono idealmente difundem-se facilmente pela BHE. Por outro lado, nutrientes essenciais ao metabolismo celular como a glicose, aminoácidos e íons são captados por transportadores específicos inseridos na membrana celular, as quais são responsáveis pelo transporte de nutrientes (GLUT1, NaK-ATPase, NaKCl-cotransportador, receptor de insulina entre outros), como também pela remoção de produtos do metabolismo celular (Glicoproteína-P) (3,8–11)

As funções da BHE encontram-se bastante prejudicadas na hipertensão arterial (12). Sabe-se que a desregulação do fluxo sanguíneo cerebral e trocas anormais através da barreira, decorrentes da hipertensão, podem resultar na sua lesão e/ou rompimento (9,13). A abertura da BHE, por sua vez, é crítica no desenvolvimento e progressão de várias doenças que afetam o SNC como o acidente vascular cerebral, a doença de Alzheimer e de Parkinson, Diabetes Mellitus do tipo 2, Esclerose Múltipla entre outras (6,8,14–16)

Os mecanismos através dos quais a hipertensão afeta o funcionamento da BHE ainda não são completamente conhecidos e muitas questões permanecem em aberto (13,17,18). Sabe-se, porém, que a disfunção endotelial induzida por modelos de hipertensão crônica pode destruir

as junções oclusivas, sendo responsável pelo aumento da permeabilidade na BHE e seu consequente rompimento (6). Foi também demonstrado que a angiotensina II (ANG II, o principal efetor do SRA), via receptores AT1, tem papel importante nesta patologia, modulando diretamente a função das células endoteliais da BHE e alterando a sua permeabilidade (9,19,20)

Trabalhos recentes mostraram que a infusão subcutânea prolongada de ANG II, mesmo em doses subpressoras, causa inflamação dos vasos cerebrais, levando à adesão leucocitária e estresse oxidativo, os quais encontravam-se associados a aumento na permeabilidade da BHE (13,21). Foi também demonstrado que a inibição dos receptores AT1 bloqueia o aumento da permeabilidade celular e reduz o edema cerebral relacionados com a hipertensão arterial, mesmo na ausência da redução dos níveis pressóricos, sugerindo um papel crucial do sistema renina-angiotensina (SRA), e em especial da ANG II, em modular o funcionamento da BHE (19,22,23). Sabe-se que o SRA desempenha importante papel na manutenção da pressão arterial (PA) e na homeostase de fluidos corporais através de ações tanto a nível periférico quanto central (9). Por outro lado, muitos trabalhos da literatura têm demonstrado que a hiperatividade do SRA encefálico, característica da hipertensão arterial, é um importante fator casual de disfunção autonômica e hipertonia simpática, acompanhadas por importantes déficits no controle cardiovascular (24–26). Em conjunto essas observações nos levam a supor que um dos mecanismos pelos quais a ANG II medeia o desequilíbrio autonômico seria através da lesão da BHE.

Uma série de trabalhos de nosso e outros laboratórios têm demonstrado que o treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade é uma importante conduta terapêutica para reduzir significativamente a atividade do SRA encefálico, reverter a disfunção autonômica e corrigir déficits funcionais da circulação na hipertensão e mesmo em indivíduos portadores de insuficiência cardíaca (27–31). Estas evidências experimentais nos levaram a propor que um dos mecanismos através do qual o treinamento aeróbio facilitaria o controle autonômico da circulação seria a melhora substancial da circulação encefálica, mediada pela correção da lesão da BHE frente à redução do SRA nos hipertensos treinados.

Trabalho recente de nosso laboratório investigando a microcirculação em áreas autonômicas do SNC têm indicado que o treinamento aeróbio (T) de SHR na fase mantida da hipertensão reduz o extravasamento da BHE nos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN, Figura 1, (32)), do trato solitário (NTS) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM).

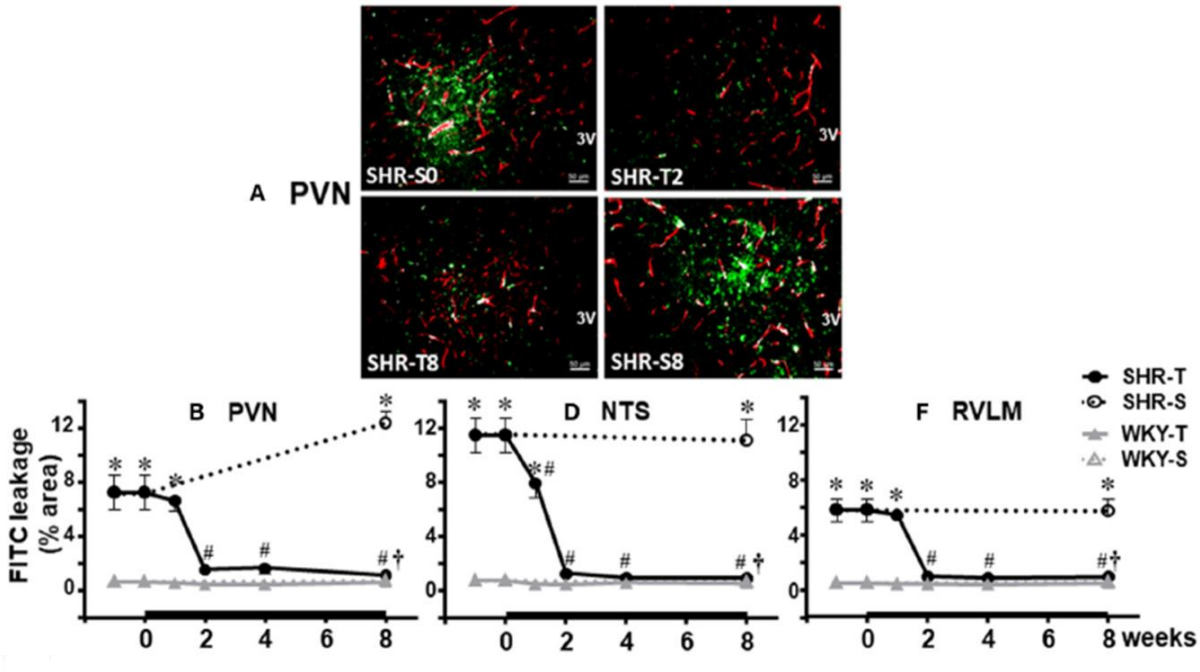

Figura 1. Evolução temporal da porcentagem de extravasamento do FITC-dextran (10kD) no PVN, NTS e RVLM dos grupos SHR e WKY submetidos a 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias (P<0,05): * vs. WKY † vs. sedentário # vs. semana 0 (reproduzido de (32).

Nos SHR treinados a pronta redução do extravasamento do FITC-dextran de baixo peso molecular injetado intra-arterial (2ª. semana experimental) coincide temporalmente com a redução da expressão de angiotensinogênio no PVN, NTS e RVLM (CHAAR et al, 2015), com a normalização do controle reflexo da circulação e com a redução da razão LF/HF para o coração, também observadas na 2ª. semana experimental (MASSON et al, 2014). Estes achados experimentais reforçam nossa proposição anterior de que a correção da integridade da BHE possa ser um dos mecanismos determinantes dos efeitos benéficos do treinamento aeróbio sobre o controle autonômico da circulação em hipertensos treinados. Experimentos em andamento no laboratório têm ainda indicado que a infusão intracerebroventricular de ANG II nos SHR simultaneamente ao treinamento aeróbio reduz significantemente a melhora observada na função da BHE após treinamento.

Os dados acima apresentados comprovam a lesão da BHE em SHR na fase crônica da hipertensão, sua correção pelo treinamento aeróbio e o envolvimento do SRA (e em especial da ANG II) em ambas as situações. Não indicam, no entanto, quais dos constituintes de BHE estariam comprometidos na lesão observada nos SHR sedentários, assim como em que estruturas o treinamento age para reduzir/corrigir o extravasamento da BHE. Pretendemos, em continuidade à nossa linha de pesquisa, investigar em SHR sedentários e treinados e seus controles normotensos pareados por idade (WKY), a expressão dos diferentes constituintes da

BHE. São, portanto, ***objetivos*** deste trabalho investigar no PVN, importante área encefálica de controle autonômico, de SHR e WKY, treinados ou mantidos sedentários, a expressão gênica/proteica dos diferentes componentes da BHE (e os mecanismos de transporte por eles condicionados) envolvidos na mediação das respostas cardiovasculares à hipertensão e ao treinamento aeróbio.

1.2. Objetivos específicos:

1) Analisar em ratos SHR e WKY os efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre parâmetros funcionais, sobre as variabilidades da PA e FC (análise espectral) e sobre a permeabilidade da BHE no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN),

2) Comparar no PVN de SHR e WKY sedentários a expressão gênica e proteica dos constituintes da BHE: Claudina-5, Ocludina e Zônula Ocludens 1 (ZO-1), de pericitos (PDGFRβ), podócitos dos astrócitos (Aquaporina-4), componentes da membrana basal (laminina alfa 2, colágeno 4 alfa 1), e caveolina-1 (indicador de transporte transcelular),

3) Quantificar no PVN de SHR e WKY treinados por 4 semanas a expressão gênica e proteica dos marcadores acima identificados;

2. Materiais e Métodos:

2.1. Animais e desenho experimental

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos, Wistar Kyoto (WKY), machos com 3 meses de idade no início dos experimentos foram alocados aos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S), as coletas foram realizadas após a semana 0 e 4ª. semana dos protocolos S ou T.

Os ratos foram alocados em caixas com 3-4 animais, temperatura de ±22ºC e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Os procedimentos descritos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB (projeto 2016/01).

2.2. Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada indiretamente através do teste de

esforço máximo durante exercício escalonado em esteira ergométrica (Millenium, Inbramed, adaptada para ratos). O teste foi iniciado com uma velocidade inicial de 0,3 km/h seguida de incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal (33,34). Estes testes foram realizados no início dos protocolos, possibilitando a determinação da intensidade do treinamento e no fim destes para avaliação da evolução da capacidade aeróbia dos animais

2.3. Protocolo de Treinamento Físico ou Sedentarismo

Após o período de adaptação à esteira (10-15 minutos/dia, por 5 dias), os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico, que consiste de corrida em esteira, 1 hora/dia, 5 dias/semana com intensidade de 50-60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço máximo realizados antes do início do treinamento e sedentarismo, e ao fim das 4 semanas de treinamento e sedentarismo, como já descrito anteriormente (27,29,35). Os períodos analisados foram: 0, 4 semanas experimentais. Os ratos alocados aos grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo. Os grupos S também realizaram os testes de esforço máximo.

2.4. Mensuração da PA e FC basais

Ao final dos protocolos experimentais os ratos foram cronicamente canulados para registro dos parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca basais no dia subsequente. Os registros foram feitos 24 horas após a canulação e cerca de 30 horas após a última sessão de treinamento, com os animais acordados e em repouso.

Os animais foram anestesiados (quetamina 80 mg/kg e xilazina 12 mg/kg), via ip. para implantação de cânula arterial (artéria femoral) que foi fixada e exteriorizada no dorso do animal (28). Os animais foram tratados com penicilina (30000 U, i.m.) e Cetroprofeno (3mg/kg, sc), imediatamente após a cirurgia. A PA e FC foram continuamente monitoradas no dia subsequente por um período de 30-40 min nos animais acordados e com livre movimentação, após o cessar da atividade exploratória do animal.

2.5. Análise espectral de parâmetros cardiovasculares

Resumidamente, as análises, abrangendo tanto o domínio do tempo quanto o da frequência, foram avaliadas em condição de repouso para cada animal, utilizando-se um período de 5 min de registro contínuo, selecionado após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. A densidade da análise espectral foi obtida através da transformação rápida de Fourier pelo método de Welch e janelas de Hanning com sobreposição de 50%. Os componentes da análise espectral para as bandas *very low*- (VLF, <0,20 Hz), *low*- (LF, 0,20-0,75 Hz) e *high-frequency* (HF, >0.75 Hz) foram obtidos pelas médias da integração das

densidades dos espectros dentro da largura das bandas de frequência, utilizando-se uma rotina customizada (MATLAB R2012a, Mathworks, Natick, MA, USA)

2.6. Obtenção dos tecidos encefálicos à fresco

Após os estudos funcionais, os ratos foram anestesiados profundamente (3X a dose da cirurgia da canulação arterial) e imediatamente perfundidos, via transcardíaca, com solução salina (0,9%) para a remoção total do sangue. O encéfalo foi rapidamente removido e mantido em gelo para obtenção de fatias coronais espessas (800 a 1.000 μm) do hipotálamo utilizando matriz para cérebro de rato adulto, e do tronco cerebral utilizando vibrátomo (Linear Slicer, PRO7, Dosaka em. Co. Ltda., Japão), permitindo, respectivamente o isolamento do PVN e da região dorsal (NTS) e ventral (RVLM), através de microdissecção, os quais foram colocados em microtubos plásticos (tubo de Eppendorf) estéreis e armazenados em freezer –80ºC para processamento posterior.

Temos já coletados, além das amostras do PVN já analisados, o NTS, RVLM, Córtex e núcleo Hipoglosso (6-8 animais por grupo). Estes se encontram armazenados em freezer -80ºC.

2.7. RT-PCR

O RNA total foi extraído (TRIzol®) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi analisada através do Espectofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando o comprimento de onda para a leitura de 260nm. Subsequentemente as amostras foram tratadas com DNAse Amp I (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 μg de RNA total/reação, empregando o protocolo indicado para a enzima Improm II (Promega). O cDNA obtido foi armazenado a –20ºC.

A quantificação relativa do número de cópias do mRNA foi realizada pelo PCR em tempo real (7500 Real-Time PCR System; Applied Biosystem), utilizando ensaios GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), os primers foram customizados pela empresa Invitrogen como descritos na Tabela 1. O gene endógeno, ou constitutivo utilizado foi a Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) que é expresso continuamente em todas as células do organismo e que, em experimento-piloto do laboratório, não foi alterado pela hipertensão, nem pelo treinamento físico. A quantificação dos resultados do PCR em tempo real foi efetuada através da determinação do$2^{\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1. Primers utilizados na análise gênica dos diferentes componentes da BHE

Primers		Sequência de bases
Claudina-5	sense	5'-TTAAGGCACGGGTGGCACTCACG-3'
	antisense	5'-TTAGACGTAGTTCTTCTTGTCG-3'
Occludina	sense	5′-TTACGGCTATGGAGGGTACAC-3′
	antisense	5′-GACGCTGGTAACAAAGATCAC-3′
Zonula ocludens-1	sense	5′-GCTCACCAGGGTCAAAATGT-3′
	antisense	5′-GGCTTAAAGCTGGCAGTGTC-3′
Caveolina-1	sense	5′-AAATCACAGCCCAGGGAAACC-3′
	antisense	5′-TAGAGATGTCCCTCGGAGTCTAC-3′
Col4a1	sense	5′-CCTTTGTGATGCACACCAGC-3′
	antisense	5′-CACTCGATGAATGGGGCACT-3′
Lama2	sense	5′-GCCACACGAGACCTGAAAGA-3′
	antisense	5′-GGAAGCCATTCCTGAACCCA-3′
PDGFR-β	sense	5'-TCTTTGTGCCAGATCCCACC-3'
	antisense	5'-GTCTGTCACTCGGCATGGAA-3'
Aquaporina-4	sense	5'-TGGGAGTCACCACGGTTCATGG-3'
	antisense	5'-GTCCGTTTGGAATCACAGCTGGC-3'
HPRT	sense	5'-TTTGCTGACCTGCTGGATTAC-3'
	antisense	5'-ACTTTTATGTCCCCCGTTGA-3'

Col4a1, Colágeno alfa 1; Lama2, Laminina alfa 2; PDGFR-β, Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas-β (marcador de pericitos); HPRT, Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (gene normalizador).

2.8. Injeção intravascular de corantes fluorescentes e análise da integridade da BHE

A análise da permeabilidade da BHE foi realizada após os registros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com cloridato de Quetamina e cloridato de Xilasina (mesma dose utilizada para a canulação da artéria femoral), a região ventral do pescoço do animal é preparada para a cirurgia de canulação da carótida, onde foi realizada incisão na e a dissecção da artéria carótida direita (lado padronizado). Foi então realizado bloqueio do fluxo sanguíneo proveniente do coração através de ligadura da carótida comum, e um bloqueio temporário logo após a região da inserção da cânula. A cânula para a infusão dos corantes foi inserida na carótida no sentido cranial, de forma que os corantes passem primeiro pelo cérebro.

Os corantes utilizados para a análise da permeabilidade da BHE em outros trabalhos (23,32) foram aqui empregados, a Rodamina dextran de 70KDa e o Isoticianato de Fluoresceína dextran (FITC) de 10KDa (Sigma Aldrich), ambos foram utilizadas na mesma concentração de 10 mg/mL, 2.86 µl/g e infundidos juntos a uma velocidade de ≈ 1 ml/min.

Após 20 minutos da infusão da solução de corantes, os animais foram então decapitados, aqueles que passaram a responder ao teste de sensibilidade da pinçagem da pata traseira, receberam uma nova dose de anestésicos descritos anteriormente e então decapitados. Os encéfalos foram então coletados e pós fixados em paraformaldeído 4%, seguido por crioproteção em tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 30% de sacarose por 3 dias a 4 ºC. Após a crioproteção, os encéfalos foram seccionados em criostato (cortes coronais de 30 um, Leica, CM 3050, Germany) abrangendo toda a extensão do PVN.

As imagens do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), foram examinadas e fotografados com o microscópio fluorescente LEICA DMLB (Leica Microsystems, Germany) acoplado a uma câmera ExiBlue (Imaging, Canada). As fotomicrografias obtidas através do software Image-Pro Plus v. 7.01 (Media Cybernetics, USA) foram processadas pelo software ImageJ (NIH, USA), para análise de extravasamento da BHE.

O estado da permeabilidade da barreira hematoencefálica foi mensurado pela habilidade das pequenas moléculas de FITC (10KDa) em extravasar parcialmente do leito intravascular para o parênquima encefálico, caso haja algum tipo de lesão/rompimento da BHE. Para isso, as fotomicrografias foram colocalizadas, e o FITC que não se encontrava colocalizado com a Rodamina (a qual deve permanecer no leito vascular devido ao seu tamanho molecular, 70KDa) entende-se que é extravasado no parênquima cerebral (23,32).

2.9. Peso do Coração e Comprimento da Tíbia

Após a perfusão, via transcardíaca, com solução salina para a remoção total do sangue dos animais, após a coleta dos núcleos encefálicos, o coração foi coletado, os átrios foram descartados e somente ventrículos foram pesados em balança semi-analítica (Micronal B400) Concomitantemente a perna direita dos animais foi retirada e o comprimento da tíbia foi obtido com paquímetro analógico (Mitutoyo, Japão), o restante do animal foi descartado.

2.10. Obtenção de tecidos e ensaio de Imunofluorescência

Após os registros funcionais, aproximadamente 3-5 animais/grupo foram profundamente e anestesiados. Imediatamente após a parada respiratória foi realizada a perfusão (fluxo constante de 40 ml/min) do cérebro, via ventrículo esquerdo, com 300ml de solução Dubecco’s Modified Eagle’s Medium (Sigma) previamente resfriada, seguida de perfusão com fixador (Paraformaldeído 4% - PFA, Sigma). Após a perfusão o animal foi

decapitado para a remoção do encéfalo. O encéfalo foi pós-fixado em PFA em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (PB) por 48 horas e depois crioprotegido em solução de sacarose 20% e 30% em PBS em temperatura ambiente por 24 horas cada. Os encéfalos foram armazenados em geladeira (~4 ºC) até a realização dos experimentos de imunoistoquímica. Os encéfalos foram seccionados em criostato (cortes coronais de 30 µm, Leica, CM 3050, Germany) abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse: PVN, NTS, CVLM e RVLM (PAXINOS & WATSON, 1986).

Os cortes do PVN foram então submetidos a um pré-tratamento em solução de Borohidreto de sódio (Sigma) a 1% em PB 0,1M por 15 minutos. Em seguida foram realizadas 5 lavagens de 5 minutos em PB 0,1M. Os tecidos foram então submetidos a um segundo pré-tratamento, em solução contendo 1% de Peróxido de hidrogênio (Synth) e 10% de álcool metílico (Synth) em PB 0,1M por 30 minutos. Logo após, foram feitas 5 lavagens de 5 minutos em PB 0,1M.

Após os tratamentos iniciais, os tecidos foram submetidos ao bloqueio em solução de Triton X-100 0,3% (Synth), soro de burro 3% (Jackson ImmunoResearch Inc), em PB 0,1M por uma hora. Em seguida, em solução com as mesmas concentrações de Triton X-100 e soro de burro, os cortes foram incubados nos anticorpos primários (Tabela 2) por 48 horas sob refrigeração e movimento, as duplas marcações foram realizadas entre RECA-1 e os outros respectivos anticorpos produzidos em coelho.

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de Imunofluorescência.

Anticorpo	Hospedeiro	Empresa	Código	Concentração
RECA-1	Camundongo	Abcam	ab9774	1:800
Claudin-5	Coelho	ThermoFisher	34-1600	1:100
Caveolin-1	Coelho	CellSignaling	3238S	1:100
PDGFRβ	Coelho	CellSignaling	28E1	1:50
Aquaporin-4	Coelho	Millipore	AB3594	1:50

Após o período de incubação, os tecidos foram então lavados 3 vezes por 5 minutos em PB 0,1M, em seguida incubados nos anticorpos secundários, Alexa Fluor® 594 Anti-camundongo e Alexa Fluor® 488 Anti-coelho (Jackson ImmunoResearch Inc.) na concentração de 1:500 por 1 hora em temperatura ambiente.

Após 3 lavagens de 5 minutos com PB 0,1M os cortes foram então montados em lâminas previamente gelatinizadas, as quais foram examinadas em microscópio de fluorescência (Axioimager A1, Zeiss, Muenchen, Germany) e a quantificação da expressão foi realizada pelo software ImageJ (NIH).

Após a montagem das lâminas, prior à aquisição das imagens, o tempo de exposição foi padronizado para que os mesmos paramêtros fossem utilizados para todas as lâminas sem que nenhum grupo ou rato tivesse o tempo de exposição extrapolado, sendo assim todas as imagens do mesmo filtro e de um mesmo protocolo tiveram os mesmos tempos de exposição, ganho e intensidade.

Seguida da aquisição das imagens, essas foram analisadas no software ImageJ. Inicialmente, desenhou-se a área de interesse (sigla do inglês *area of interest*, AOI) para quantificação dos subnúcleos e para background, todas as imagens 8-bits tiveram o background e a média da intensidade quantificado, os valores de intensidade das imagens foram adquiridos com a subtração dos valores de média do background dos valores das áreas de interesse. A AOI utilizada (Figura 2), foi utilizada a fim de quantificar o subnúcleo do PVN, o Ventromedial (Vm).

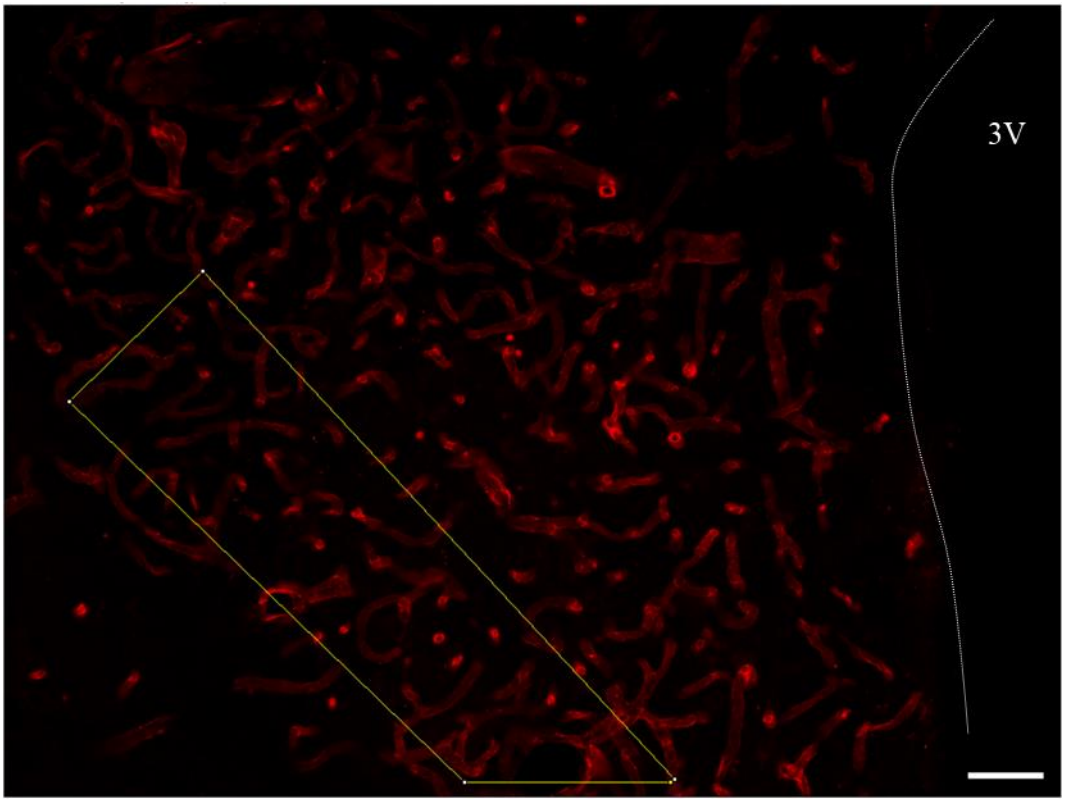

Figura 2. Fotomicrografia do PVN, ilustrando da região correspondente ao núcleo ventromedial (área

envolvida no controle autonômico da circulação onde as mensurações de imunofluorescência foram feitas. A área de interesse (AOI) está demarcada em amarelo. Barra=50µm. 3V, 3º ventrículo.

2.11. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ±EPM. O desempenho em esteira, comparação dos valores de PA, FC, razão PV/CT, análise espectral, e RT-PCR e Imunofluorescência entre WKY e SHR sedentários e treinados foram avaliados pela ANOVA de 2 fatores e post-hoc de Tuckey. O nível de significância adotado foi de P<0,05.

3. Resultados

3.1. Eficácia do Treinamento

3.1.1 Capacidade Aeróbia

Ratos adultos das linhagens SHR e WKY foram submetidos ao teste de capacidade aeróbia máxima nas semanas experimentais 0 (início) e 4 (final) dos protocolos de treinamento. Os dados obtidos estão apresentados abaixo na Figura 3.

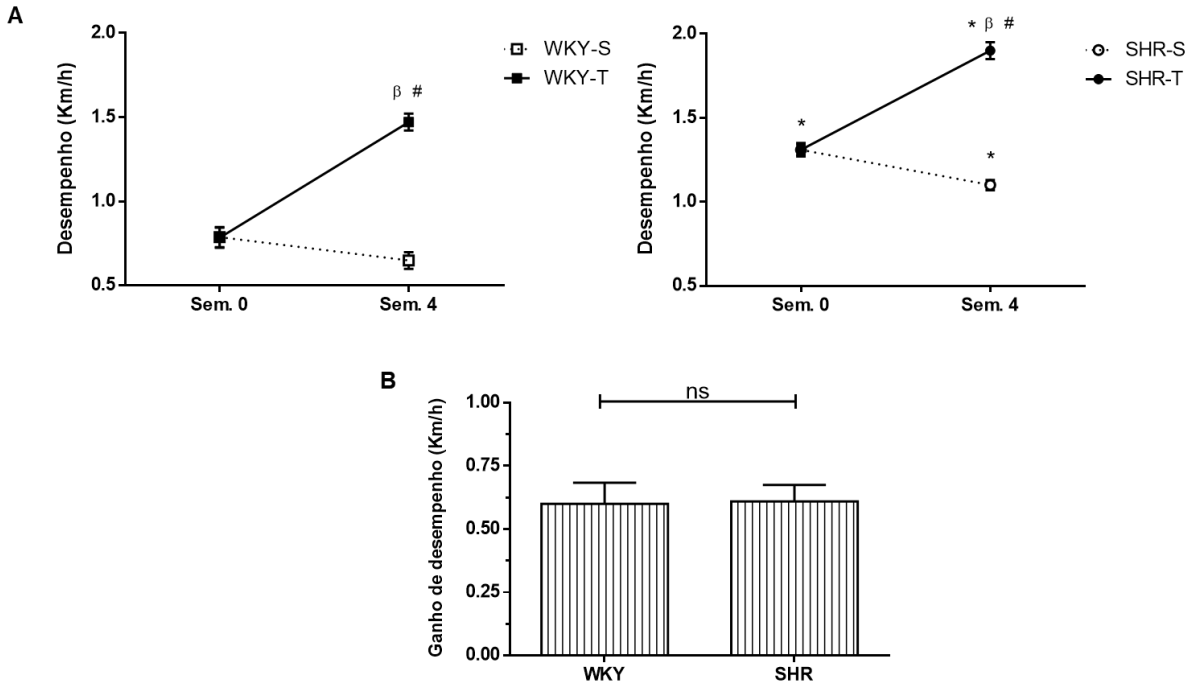

Figura 3. Evolução temporal do desempenho em esteira em SHR e WKY.
A- desempenho dos grupos treinados (SHR-T e WKY-T) e sedentários (SHR-S e WKY-S) ao longo das

4 semanas experimentais. B- Ganho de desempenho após 4 semanas de Treinamento. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs.respectivo controle sedentário # vs. Semana 0.

Desde o teste inicial os SHR apresentaram maior capacidade aeróbia do que os WKY pareados por idade (1.3±0.03 Km/h e 0.78±0.06 Km/h respectivamente). Ambos os grupos treinados (SHR-T e WKY-T) mostraram ganho significativo no desempenho após 4 semanas de treinamento (1.93±0.05 Km/h e 1.47±0.05 Km/h respectivamente), enquanto que os grupos sedentários mostraram ligeiro decréscimo, mas sem alterações significativas durante as 4 semanas experimentais. Observamos que embora os animais partissem de capacidades aeróbicas diferentes, o ganho no desempenho foi o mesmo para ambos os grupos (Figura 3B), com ganho de +0,6±0,08 e de +0,6±0,06 km/h em ambos os grupos treinados (WKY-T e SHR-T, respectivamente).

3.1.2 Frequência Cardíaca basal

A Frequência Cardíaca (FC) basal ou de repouso dos animais submetidos aos protocolos de T e S foi obtida pela quantificação dos intervalos entre picos sucessivos da pressão sistólica (30 minutos), com os ratos acordados e mantidos em suas gaiolas. Os resultados encontrados estão graficamente representados na Figura 4. Os ratos SHR-S, como esperado, possuem maior FC de repouso do que os animais WKY-S (349±4 e 322±2 b/min respectivamente).

Em ambos os grupos experimentais o treinamento induziu reduções da FC basal, de maior intensidade nos SHR-T (-11% vs -4% nos WKY-T, quando comparados com os respectivos controles S). A bradicardia de repouso, um importante marcador de treinabilidade, foi observada em ambos os grupos: 308±5 b/min nos SHR-T e 307±1 b/min nos WKY-T. Interessante observar-se que a FC basal dos SHR-T não mais difere daquela apresentada pelos WKY, indicando um importante benefício do treinamento aeróbio em reverter a elevada taquicardia basal apresentada pelos hipertensos espontâneos (Figura 4).

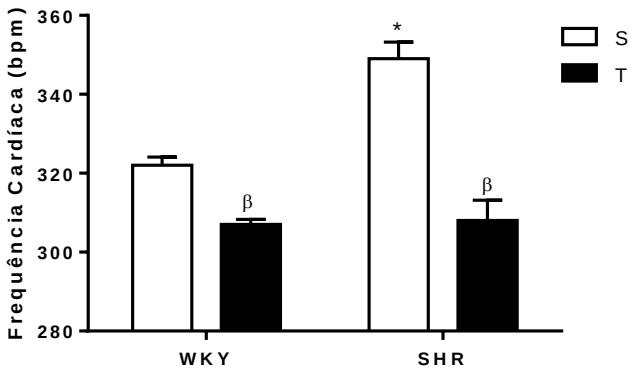

Figura 4. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a frequência cardíaca de repouso nos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). Significância (P<0,05) * vs. WKY; β vs. Respectivo controle sedentário.

3.2. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre os valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Peso Ventricular em SHR e WKY.

A Figura 3-A mostra que os SHR-S se encontravam na fase crônica da hipertensão arterial, apresentando valores mais elevados de PAM que os WKY-S (156±3 mmHg vs. 100±3 mmHg, respectivamente), e que, o treinamento foi capaz de reduzir significativamente esta variável cardiovascular apenas nos SHR-T quando comparado ao seu controle sedentário (redução de 12%), porém ainda apresentando valores maiores que os dos WKY-T (137±5 e 106±4 mmHg, respectivamente).

Outra característica indicativa de que os SHR se encontravam na fase crônica da HA é a hipertrofia cardíaca (razão Peso Ventricular/Comprimento da Tíbia), Figura 5B. Por sua vez o treinamento por 4 semanas foi capaz de reduzir o peso ventricular nos ratos espontaneamente hipertensos (0,26±0,00 g/mm em SHR-T), uma redução 13%. O T foi, portanto, capaz de corrigir a hipertrofia dos ventrículos dos SHR, sem nenhuma alteração nos WKY-T vs. WKY-S.

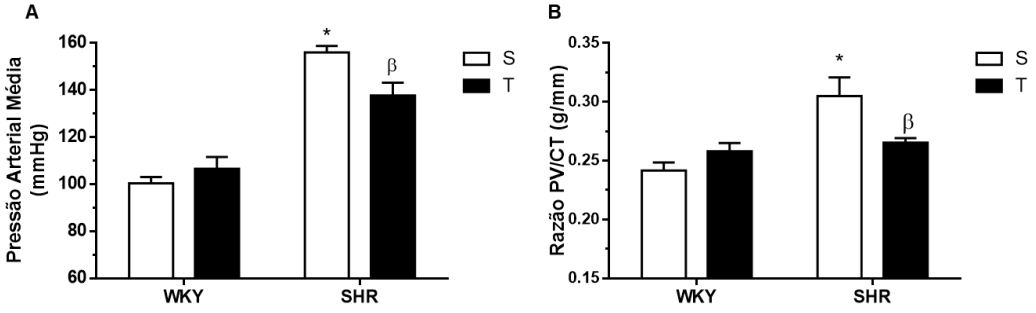

Figura 5. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a pressão arterial média (A) e sobre a razão peso dos ventrículos/comprimento da tíbia (PV/CT) em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) durante as 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S.

3.3. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a sobre a variabilidade do Intervalo de Pulso (IP) e seus componentes espectrais em SHR e WKY.

Os efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a variabilidade da FC e seus componentes espectrais foram quantificados pela análise espectral sobre séries temporais de intervalo de pulso (IP) na 4ª. semana experimental e são apresentados na Figura 6 (A-D).

A variabilidade do IP (Fig. 6A) encontrava-se reduzida nos SHR-S quando comparado com seus controles normotensos (36±5 ms² e 86±8 ms², respectivamente). A redução da Variabilidade do IP nos SHR-S foi acompanhada de uma redução de 54% da atividade vagal (HF-IP de 17,61±2,79 ms² nos WKY-S para 7,93±0,98 ms^2 nos SHR-S, P<0,05, Figura 4B), e elevação de 57% do componente simpático ao coração (LF-IP de 1,56±0,41 ms^2 nos WKY-S para 6,36±0,48 ms² nos SHR-S, P<0,05, Figura 6C).

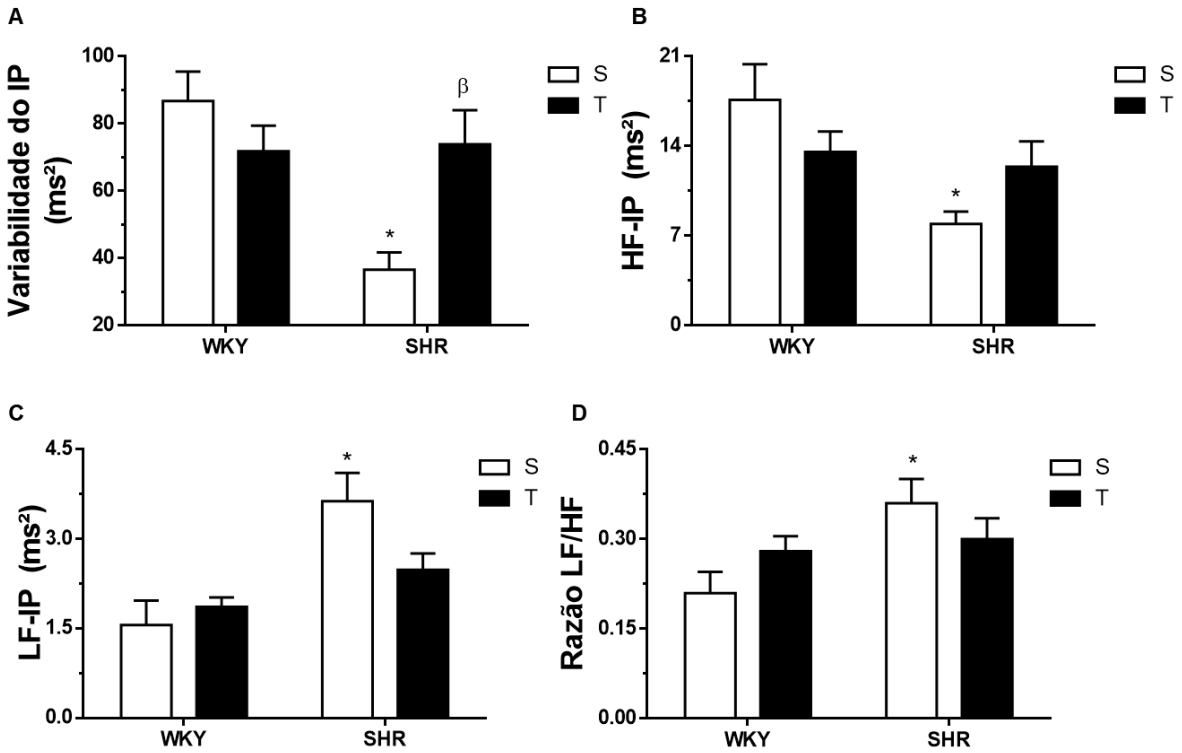

Figura 6. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a variabilidade do Intervalo de Pulso (IP, painel A), e seus componentes espectrais de alta (HF-IP, painel B) e baixa frequência (LF-IP, painel C), e sobre o balanço simpato-vagal ao coração (razão LF/HF, painel D) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. Sedentário

Essas alterações indicam serem os hipertensos sedentários acompanhados de aumento de 41% no balanço simpato-vagal ao coração, como indicado pela razão LF/HF (de 0,21±0,04 nos WKY-S para 0,36±0,04 nos SHR-S, Figura 4-D). Com o treinamento de 4 semanas, não houve alteração significativa da variabilidade do IP entre os WKY-S e WKY-T, mas nos SHR-T, o treinamento foi capaz de aumentar esta variável (73±10 ms², Figura 4A) em cerca de 50%, praticamente a igualando à apresentada pelos grupos WKY. O treinamento nos SHR foi capaz de normalizar a variabilidade da frequência cardíaca por aumentar parcialmente a atividade vagal (HF-IP, 12,39±1,99 ms²) e reduzir parcialmente a atividade simpática ao coração (LF-IP: 2,48±0,28 ms²), normalizando, portanto, o balanço simpato-vagal nos SHR-T (LF/HF: 0,30±0,03 ms²).

3.4. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a variabilidade da PAS e seus componentes spectrais em SHR e WKY.

Os efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a variabilidade da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e seus componentes espectrais foram quantificados pela análise espectral em séries temporais da PAS na 4ª. semana experimental e são apresentados na Figuras 7 (A-C). SHR-S apresentaram aumento de 2,6 vezes na variabilidade da PAS (de 22,4±3,4 nos WKY-S para 59,2±7,5 mmHg² nos SHR-S) (Figura 7A), a qual foi acompanhada de 7,2 vezes da atividade simpática vasomotora (LF-PAS de 1,77±0,35 mmHg² para 12,78±2,65 mmHg² nos SHR-S (P<0,05, Figura 7B). O treinamento não alterou a variabilidade da PAS e a atividade vasomotora dos WKY-T, mas reduziu marcadamente e praticamente normalizou ambos parâmetros nos SHR-T: houve redução de 37% da variabilidade da PAS e de 51% na LF-PAS (Figuras 7A e 7B).

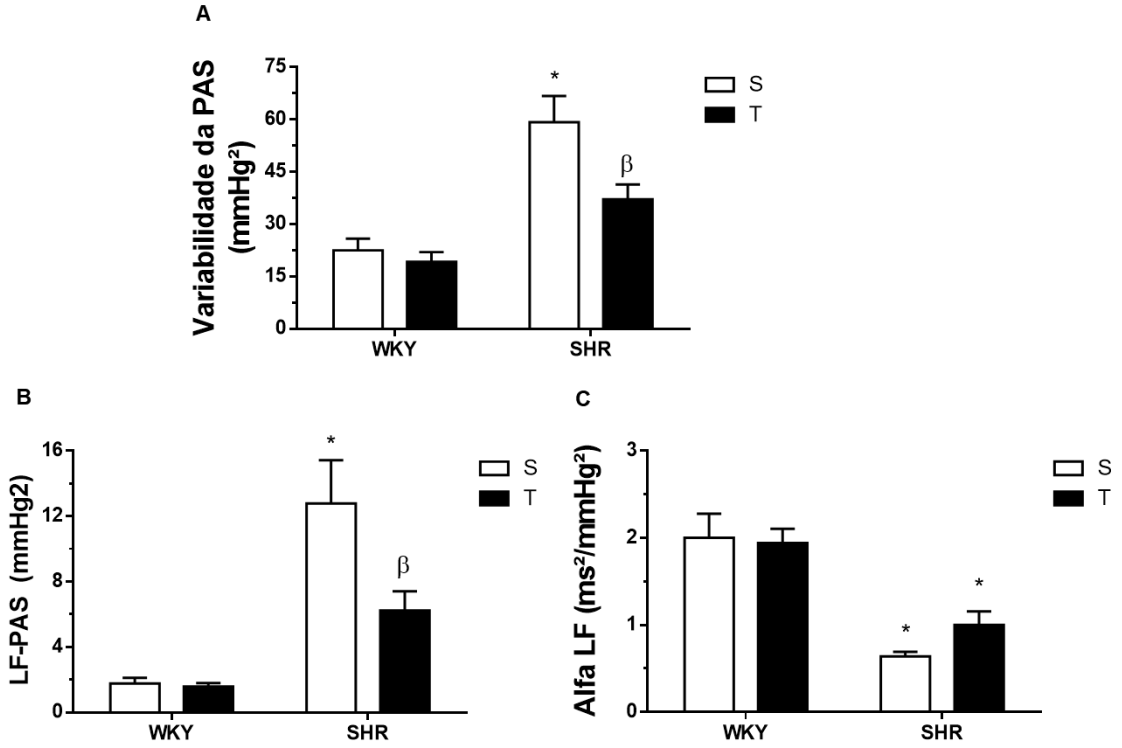

Figura 7. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a variabilidade da Pressão Arterial Sistólica (PAS) sobre seu componente espectral de baixa frequência (LF-PAS) e sobre o barorreflexo espontâneo (Alfa LF) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S.

Observamos também que a hipertensão espontânea foi acompanhada de importante diminuição da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (de 2,00±0,28 para 0,64±0,05 ms²/mmHg², P<0,05) como indicado pelo Alfa LF, Figura 7C, e que o treinamento determinou tendência à recuperação (SHR-T: 1,0±0,16 ms²/mmHg²) sem no entanto atingir níveis de

significância. Assim como observado para a variabilidade do IP da PAS e seus componentes spectrais, o treinamento não modificou o barorreflexo espontâneo dos WKY-T (Figura 7C).

3.5. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a permeabilidade da BHE no PVN de SHR e WKY.

Após os registros funcionais parte dos animais de cada grupo foram anestesiados para administração intra-arterial dos corantes FITC-10kD e Rodamina-70kD. Vinte minutos após os ratos foram sacrificados com dose supra-máxima do anestésico. Os encéfalos foram imediatamente removidos para análise posterior da integridade da BHE (descrito nos Métodos).

A análise da fluorescência em cortes sequenciais do PVN mostrou intenso extravasamento do FITC-10 kD nos SHR-S quando comparados aos WKY-S, mas ausência de extravasamento nos SHR-T (Figura 8A). Nenhuma alteração foi observada nos WKY-T quando comparados aos WKY-S. Análise quantitativa, centrada no subnúcleo ventromedial do PVN (PVN_{Vm}), uma importante área de controle autonômico da circulação, confirmou estas observações mostrando intenso extravasamento do FITC-10kD nos SHR-S (11,6±1,3%, um aumento de 2,9 vezes quando comparado a 3,9±0,2% nos WKY-S, $P<0,05$, Figura 8B). Houve nos SHR-T intensa redução do extravasamento do FITC10kD (5,4±0,6%), valor este similar ao observados nos WKY-S. Como observado na Figura 8B, o treinamento não modificou o extravasamento observado no grupo WKY.

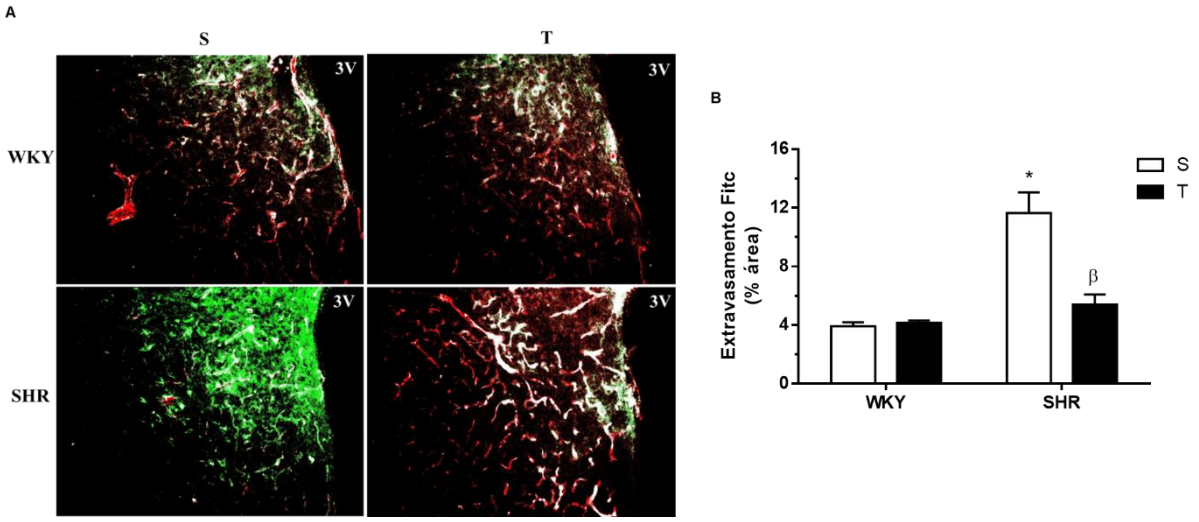

Figura 8. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a permeabilidade da BHE no PVN de SHR e WKY .A- imagens da colocalização de Rodamina-70kD (vermelho) e FITC-10kD (verde). B- quantificação do FITC extravasado para o parênquima encefálico. Valores foram obtidos em 4-6

cortes/rato, 3 ratos/grupo. 3V, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S

3.6. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a microcirculação no PVN ventromedial de SHR e WKY.

A Figura 9 ilustra, para 4 ratos representativos dos grupos experimentais, a densidade de capilares no PVN evidenciada pela Imunofluorescência para a RECA-1. Observa-se a grande densidade de capilares em relação a áreas circunvizinhas, demarcando inclusive o próprio PVN (Figura 7A). a comparação entre WKY-S e WKY-T, SHR-S e SHR-T não mostrou diferenças visíveis de densidade capilar no PVN (Figura 7B). Analise quantitativa da densidade capilar no PVNVm mostrou que nem a hipertensão, nem o treinamento físico alteraram significativamente a Imunofluorescência para a RECA-1 (WKY-S:3675±251, WKY-T:3333±440, SHR-S:3879±146, SHR-T: 3981±274. Figura 9C).

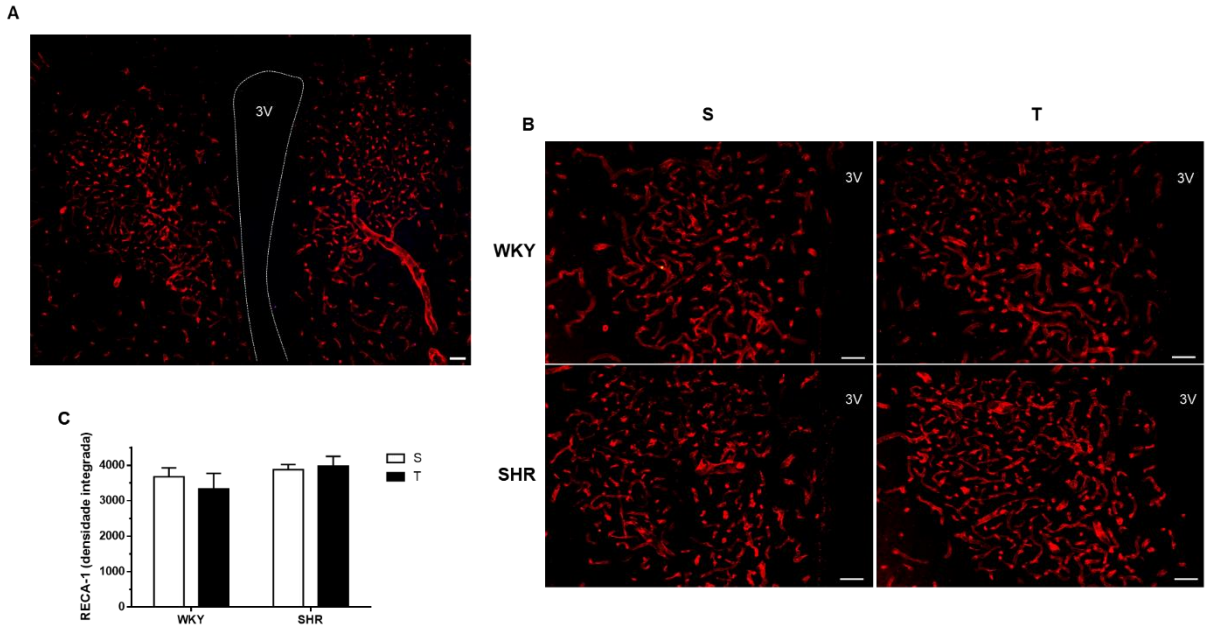

Figura 9. Comparação da densidade de capilares no PVN, evidenciada pela Imunofluorescência para RECA-1 em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T). Fotomicrografias em menor aumento (A, barra= 100 µm) ilustrando o PVN bilateralmente e em maior aumento comparando a densidade capilar nos 4 grupos experimentais (B, barra= 50 µm). C, dados quantitativos da Imunofluorescência para RECA-1 no PVN ventromedial. 12-16 cortes/rato, 4 ratos/grupo.

3.7. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão dos diferentes componentes da BHE no PVN_{Vm} de SHR e WKY

Nossos resultados ilustrados na Figura 8 confirmaram dados anteriores de nosso e outros laboratórios (23,32) mas não identificam os mecanismos pelos quais a hipertensão e o treinamento aeróbio alteram a permeabilidade da BHE. Para tanto, outra parte dos ratos de cada grupo foram perfundidos com salina 0,9%, para a remoção do encéfalo à fresco, imediatamente após a parada cardiorrespiratória induzida por dose supra-máxima de anestésicos.

O PVN foi identificado e procedeu-se à sua microdissecção. Buscamos identificar no PVN quais componentes da BHE se encontram alterados e possam ser candidatos responsáveis por alterações da permeabilidade da BHE. Para isso, realizamos inicialmente a análise da expressão gênica seguida da expressão proteica dos diversos componentes da BHE.

3.7.1. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de proteínas da Junção Oclusiva no PVN de SHR e WKY.

Na Figura 10 estão ilustrados os resultados encontrados a expressão gênica (RT-PCR) das proteínas constituintes da junção oclusiva. A expressão gênica de Cld-5 mostrou não haver diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Figura 10A), tanto em relação ao grupo quanto à condição, observação que se repetiu em relação aos outros genes constituintes da junção oclusiva, a saber a OCDN (Figura 10B) e ZO-1 (Figura 10C). Frente a resultados controversos na literatura indicando lesão ou nenhuma alteração nas junções oclusivas em diferentes patologias (36), buscamos comprovar estes dados através da expressão proteica. Para isso, 4 ratos de cada grupo foram perfundidos com DMEM seguido de PFA a 4% e analisamos nos mesmos tempos e condições experimentais. Diferentemente do RT-PCR, no qual utilizamos todo o PVN, a IF nos permitiu uma análise espacial interessando apenas subnúcleos autonômicos do PVN, no caso o Ventromedial ($_{Vm}$). Além disso, como quantificamos nas mesmas áreas de interesse (AOIs) a capilarização pela IF para RECA-1, representamos para cada AOI a densidade da proteína em relação à densidade dos capilares.

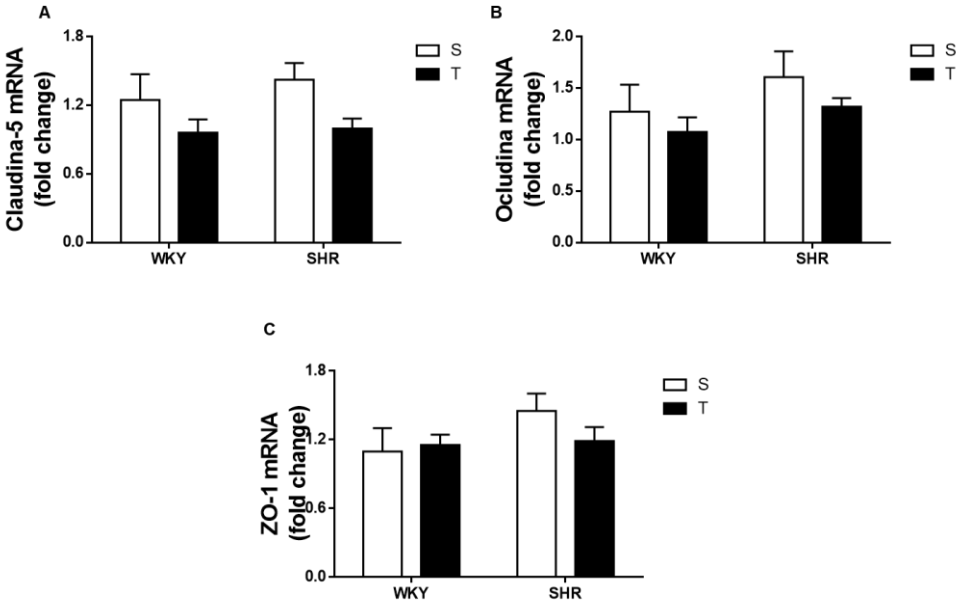

Figura 10. Expressão gênica das proteínas constituintes da junção oclusiva no PVN de SHR e WKY sedentários (S) ou treinados (T). Os gráficos indicam a expressão gênica de CLDN-5 (A), OCLN (B) e ZO-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). 6-8 animais por grupo.

Observamos que a hipertensão não determinou alteração significativa da expressão proteica de CLDN5 no PVN_{Vm}, mas o treinamento nos SHR foi acompanhado de aumento significativo (de 0,15±0,03 para 0,43±0,12 CLDN5/RECA-1, Figura 11B). Nenhuma alteração significativa foi observada nos WKY-S e WKY-T (Figura 11B).

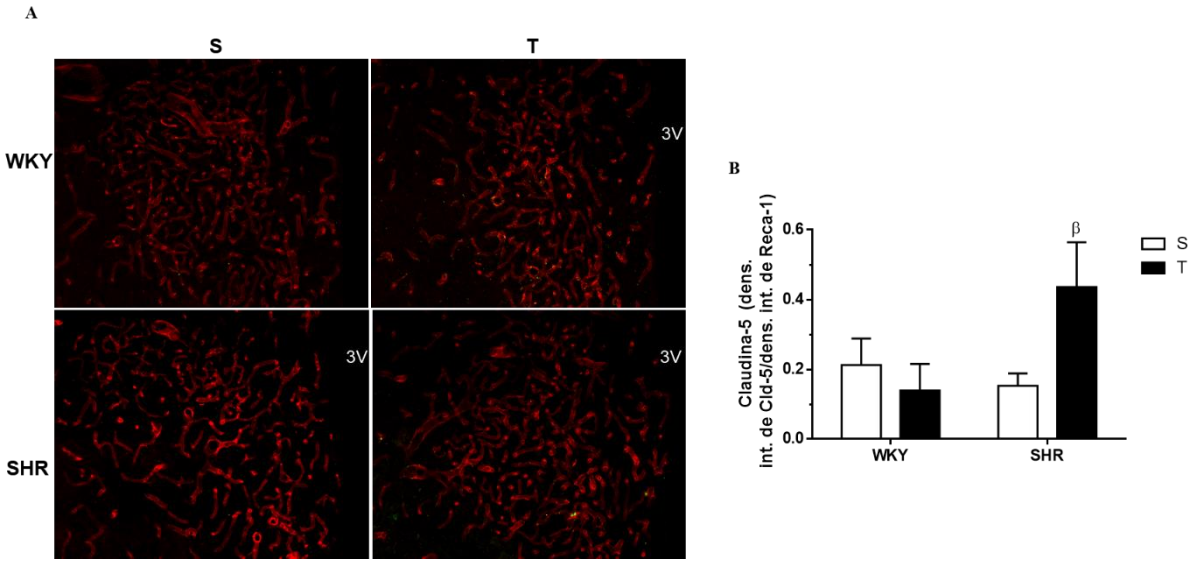

Figura 11. Expressão proteica de Claudina-5 em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S).A- Imunoreatividade de CLDN-5 (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T), B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato, 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significâncias ($P<0,05$) β vs. respectivo controle S.

3.7.2. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de vesículas de transporte transendotelial no PVN de SHR e WKY.

Trabalhos anteriores da literatura têm indicado que as vesículas de transporte transendotelial são positivas para caveolina-1 (CAV-1) (37–39), sua expressão gênica foi por nós analisada por RT-PCR (Figura 12). Observamos perfis diferentes de expressão com valores expressivamente aumentados de CAV-1 no PVN dos SHR-S quando comparado aos WKY-S (2,45±0,39, e 1,3±0,25; respectivamente, P<0,05). Observamos também que o treinamento não modificou a expressão gênica de CAV-1 no grupo WKY, mas determinou importante redução nos SHR-T quando comparados aos SHR-S (de 2,45±0,39 para 1,05±0,19, respectivamente, P<0,05). Observamos ainda que após o treinamento a expressão gênica de CAV-1 nos SHR-T não mais diferia da apresentada pelos grupos WKY (Figura 12).

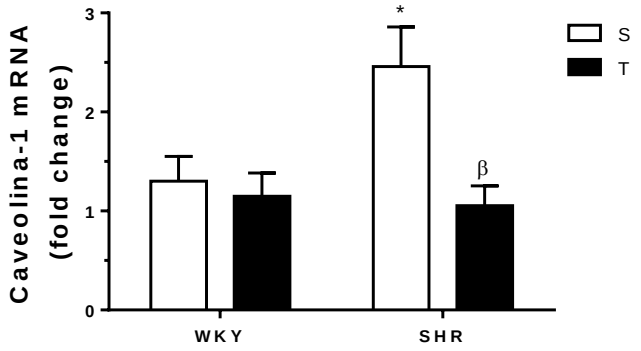

Figura 12. Expressão gênica de Caveolina-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) após 4 semanas experimentais. n= 6-8 animais por grupo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. S.

Os efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a expressão de CAV-1, foram confirmados pelo ensaio de Imunofluorescência para a quantificação da expressão proteica no PVN_{Vm}. A Figura 13A compara a expressão proteica de CAV-1 em animais representativos dos quatro grupos experimentais, cujos dados quantitativos são apresentados na Figura 13B. À semelhança da expressão gênica, a expressão proteica, a CAV-1 encontra-se aumentada nos SHR-S em relação ao controle normotenso e o exercício aeróbio determinou redução da CAV-1 nos SHR-T quando comparado ao SHR-S (redução de 63%, P<0,05) levando-a a níveis similares aos observados nos WKY-S.

Houve também tendência à redução da Imunofluorescência para a CAV-1 nos WKY-T (redução média de 96% em relação ao WKY-S), porém os valores não atingiram níveis de significância (Figura 13B).

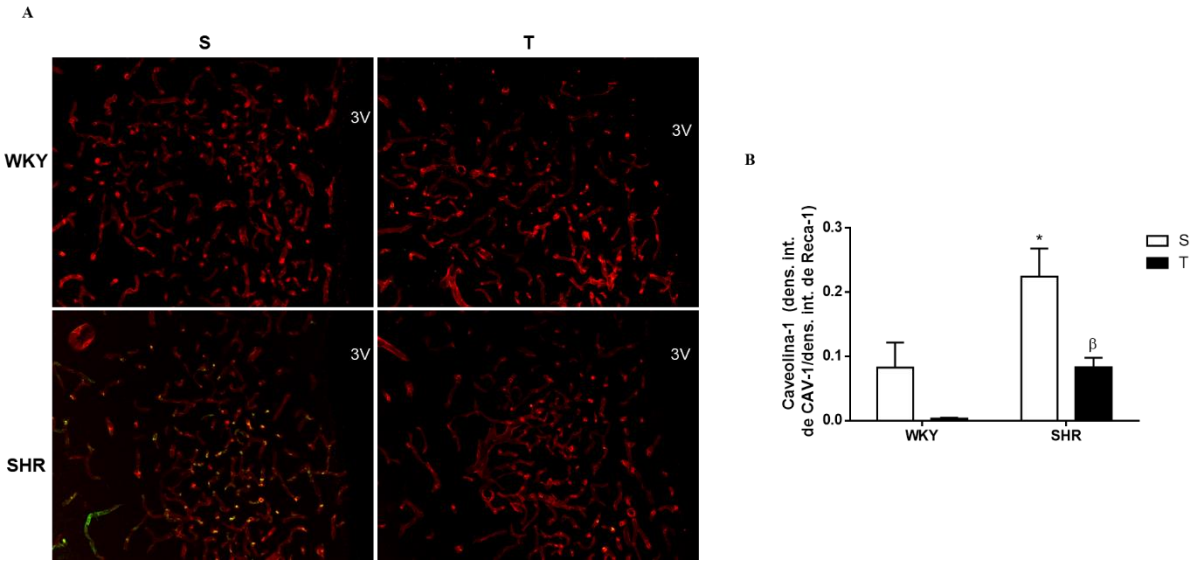

Figura 13. Expressão proteica de Caveolina-1 no PVN_{Vm} de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S). A- Imunoreatividade de CAV-1 (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato. 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivos controles S

3.7.3. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre componentes da Membrana Basal

Entre os componentes da BHE que podem contribuir para a disfunção da BHE e para seu aumento de permeabilidade, citam-se os constituintes da membrana basal (MB) (40–43).

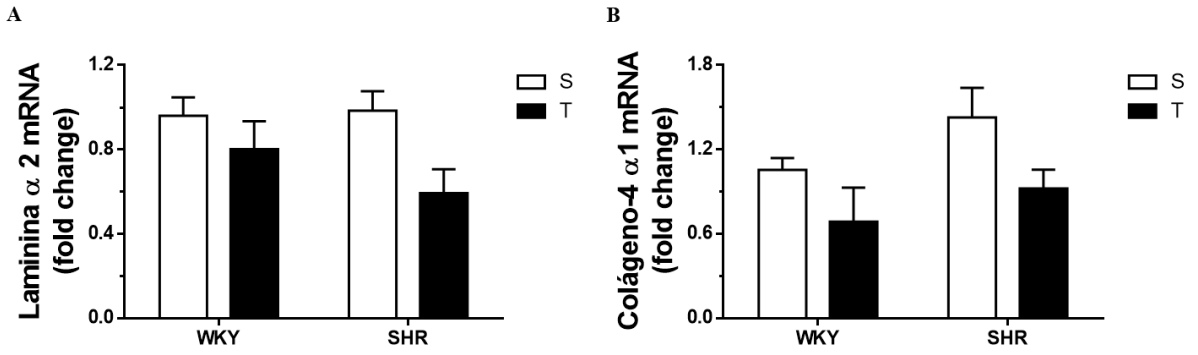

Figura 14. Expressão gênica de Lama2 (A) e Col4a1(B) no núcleo paraventricular do hipotálamo

(PVN) de SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T) após 4 semanas experimentais. n= 6-8 animais por grupo.

Analisamos também os efeitos da hipertensão e do treinamento sobre a expressão gênica de Laminina α2 (Lama2) e Colágeno-4 α1 (Col4a1), principais constituintes da MB da BHE (Figura 14, A e B). Observamos pequenas variações na expressão gênica de Lama2 e de Col4a1, mas sem diferenças estatísticas entre os 4 grupos experimentais, sugerindo que tanto a hipertensão e treinamento não afetam a constituição da MB.

3.7.4. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de Pericitos no PVN de SHR e WKY.

A expressão gênica de PDGFRβ (um marcador específico de pericitos no SNC) no PVN de WKY e SHR, T ou S, está representado na Figura 15. Observamos não haver diferenças estatísticas entre os grupos WKY-S e SHR-S, ou ainda entre os grupos Treinados em relação aos controles sedentários (Figura 15).

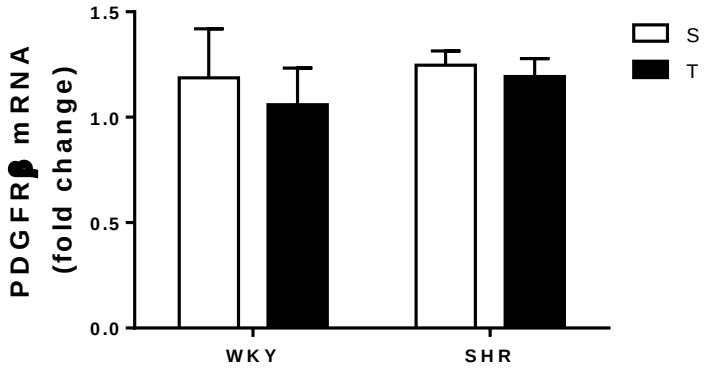

Figura 15. Expressão gênica de PDGFRβ no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). 6-8 animais por grupo**.**

Também a expressão proteica de PDGFRβ, apresentada na Figura 16, nos mostra que a expressão deste marcador não diferiu entre as linhagens WKY e SHR submetidos ao protocolo de S (0,068±0,019 e 0,062±0,009 respectivamente), assim como não houve nenhuma alteração significativa após o treinamento (WKY-T: 0,045±0,015; SHR-T: 0,041±0,014).

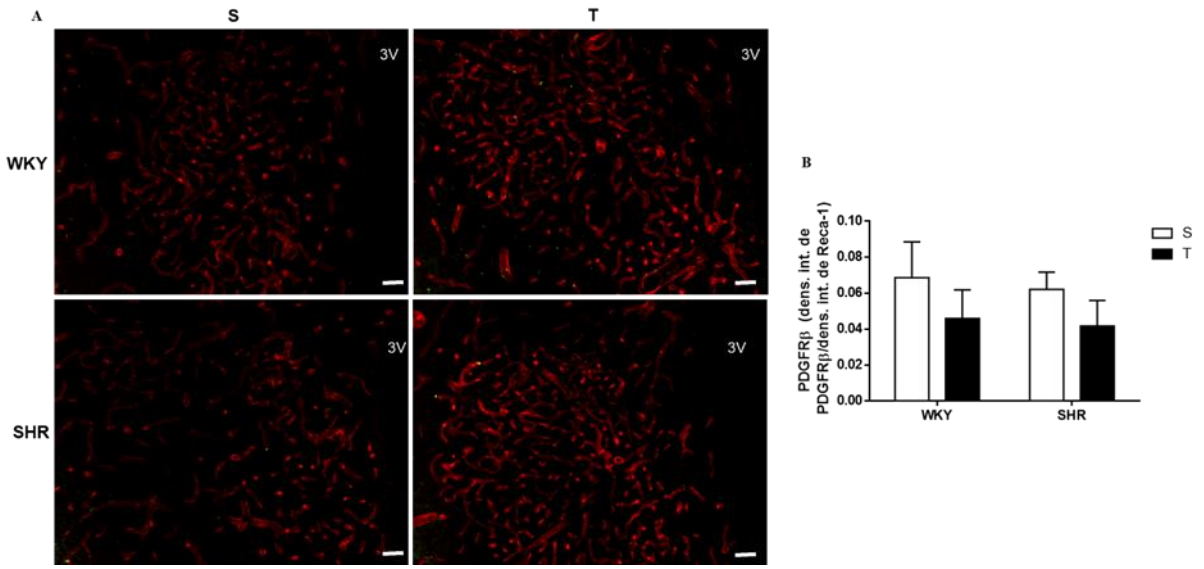

Figura 16. Expressão proteica de PDGFRb no PVN de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S). A- Imunorreatividade de PDGFRβ (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T), B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato. 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significância (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S.

3.7.5. Efeitos do treinamento e sedentarismo sobre os podócitos dos Astrócitos no PVN de SHR e WKY.

No SNC Aquaporina-4 (AQP-4), um transportador de água e gases, é expresso em podócitos de astrócitos (3,44,45), sendo portanto utilizada como um marcador específico da expressão destas estruturas que recobrem os capilares encefálicos

Apesar da ligeira alteração na expressão gênica de AQP-4 nos SHR-S versus WKY-S (1,43±0,14 versus 0,95±0,24 respectivamente, Figura 17) não houve diferença significativa. Já o treinamento foi acompanhado de tendência ao aumento da expressão de AQP-4 em ambos os grupos, com uma elevação mais intensa no WKY-T vs WKY-S (aumento de 56%, P>0,05, Figura 17).

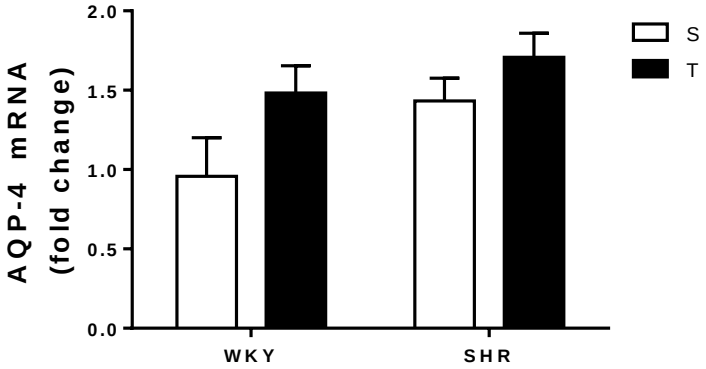

Figura 17. Expressão gênica de AQP-4 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em SHR e WKY sedentários (S) ou treinados (T) após 4 semanas experimentais n=6-8 animais por grupo**.**

Observamos também que a hipertensão espontânea não alterou a expressão proteica de AQP-4 no PVN_{Vm} de hipertensos em relação ao grupo normotenso (SHR-S: 0,028±0,009; WKY-S: 0,023±0,004), dado este compatível com a expressão gênica. No entanto, o T foi capaz de aumentar nos SHR a expressão de AQP-4 em 2,9 vezes quando comparado aos SHR-S (SHR-T: 0,083±0,019; SHR-S: 0,028±0,009; P<0,05, Figura 18B), nenhuma alteração foi observada nos WKY-T quando comparados com os WKY-S.

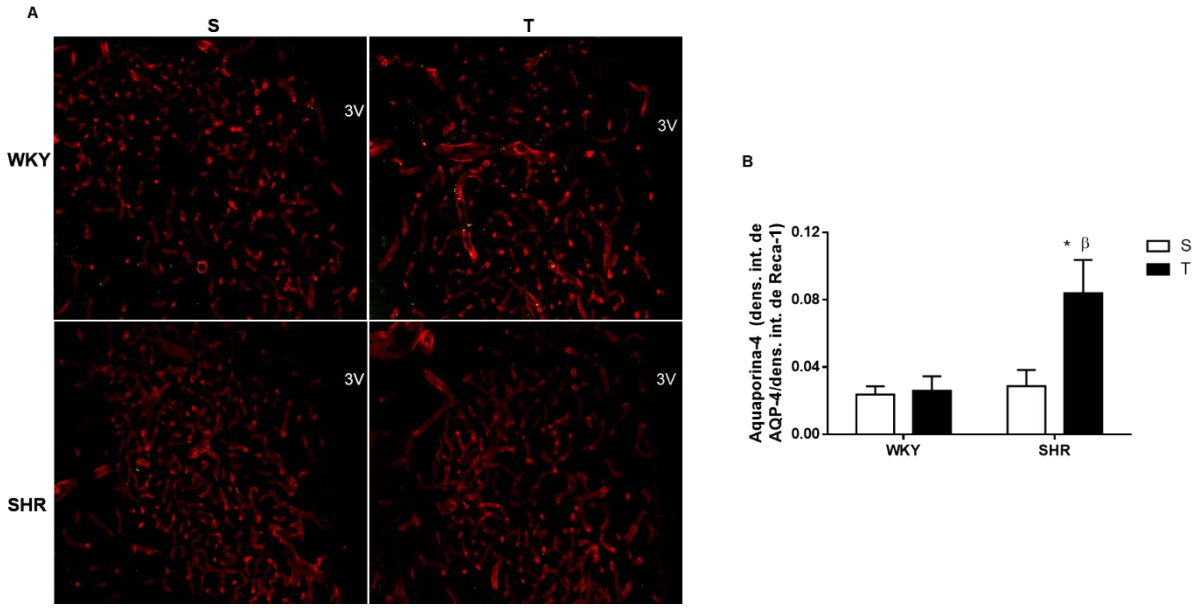

Figura 18. Expressão proteica de Aquaporina-4 no PVN de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S). A- Imunoreatividade de AQP-4 (em verde) e RECA-1 (Vermelho) no PVN de SHR e WKY após 4 semanas experimentais (S ou T). B, comparação dos dados quantitativos no PVN_{Vm}. 4 cortes/rato. 4 ratos/grupo. 3v, 3º. Ventrículo. Significâncias (P<0,05) * vs. WKY; β vs. respectivo controle S.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam observações anteriores sobre a disfunção da BHE em áreas de controle autonômico de hipertensos (23,32) assim como dados anteriores de nosso laboratório sobre a eficácia do treinamento aeróbio em normalizar o funcionamento da BHE mesmo na persistência da hipertensão (32). Adicionalmente várias observações originais sobre os mecanismos condicionantes da disfunção e da correção da lesão da BHE foram obtidos:

- Demonstramos que o aumento da permeabilidade da BHE na fase crônica da hipertensão espontânea é determinado por aumento do transporte transcelular sem alterações do transporte paracelular
- A hipertensão crônica não se acompanha lesão/perda das proteínas constituintes das junções oclusivas, cuja expressão gênica e proteica encontra-se inalterada nos hipertensos sedentários quando comparados a seus controles normotensos
- Durante a fase crônica da hipertensão também não observamos alterações estruturais da membrana basal, dos pericitos e dos podócitos dos astrócitos, outros constituintes da BHE
- Por sua vez, a reversão da permeabilidade aumentada da BHE nos hipertensos após treinamento aeróbio deve-se à redução substancial do transcitose em áreas de controle autonômico, como indicado pela completa normalização da expressão proteica de Caveolina-1, sem alteração do transporte paracelular, uma vez que há inclusive aumento da expressão proteica de claudina-5, uma das proteínas constituintes das junções oclusivas
- A normalização da permeabilidade da BHE em hipertenso subsequente ao treinamento aeróbio é ainda acompanhada de aumento da densidade de podócitos dos astrócitos, como indicado pela elevada expressão proteica de aquaporina-4, um marcador específico dessa estrutura, sem alterações detectáveis na expressão de pericitos e de proteínas da membrana basal
- A correção da permeabilidade da BHE simultânea à redução da variabilidade da PAS e ao aumento da variabilidade do IP nos hipertensos treinados sugere a importância dessas alterações estruturais/funcionais da BHE em melhorar a perfusão de áreas autonômicas do PVN, facilitando a redução da atividade simpática e o aumento da atividade vagal, e, corrigindo a disfunção autonômica ao coração e vasos.

Sabe-se que a BHE, uma estrutura multicelular complexa que age como uma barreira seletiva entre a circulação sistêmica e o sistema nervoso central, restringe o extravasamento de substâncias circulantes ao parênquima cerebral por limitar o transporte transcelular, realizado por transportadores específicos através da célula endotelial, e, praticamente bloquear o transporte paracelular de substâncias hidrossolúveis mediado pelas junções oclusivas de alta resistência elétrica (4,46,47). Sabe-se também que a BHE se encontra completamente formada e funcionalmente ativa ao nascer, assim permanecendo em indivíduos saudáveis (48), mas disfuncional com perda das junções oclusivas e/ou transcitose exagerada em portadores de acidente vascular cerebral, traumas, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e em presença de estímulo hiperosmolar (12,13,21,49–51)

Na hipertensão crônica, lesões da BHE têm sido observadas no córtex e hipocampo (13,52–54) e mais recentemente em áreas de controle autonômico como o PVN, o NTS e o RVLM (23,32). Esses estudos têm mostrado o extravasamento de constituintes plasmáticos ao parênquima cerebral, mas pouco se sabe sobre os mecanismos condicionantes destas alterações. Evidências conflitantes têm relatado comprometimento das proteínas das junções oclusivas no córtex e hipocampo (13,53,54) ou nenhuma evidência ultra-estrutural de perda das junções oclusivas. Ausência de comprometimento das junções oclusivas foi também observada em ratos submetidos à isquemia focal(50). Nossos dados confirmando o extravasamento de FITC-10 kD para o parênquima cerebral na fase crônica da hipertensão espontânea, mostram adicionalmente que este processo é mediado por aumento da transcitose, uma vez que os SHR sedentários, quando comparados a seus controles normotensos pareados por idade, apresentavam no PVN aumento da expressão gênica e proteica da caveolina-1 (principal constituinte das vesículas transendoteliais não-mediadas por clathrin), indicando a maior densidade destas vesículas nos capilares cerebrais dos SHR-S. Estas observações sugerem que a hipertensão *desregula uma propriedade funcional intrínseca* do endotélio de capilares cerebrais, qual seja a de manter uma baixa taxa de transcitose de cavéolas através do endotélio vascular (39).

Nossos dados não alteraram a expressão gênica e proteica da claudina-5 indicam ainda que o aumento da permeabilidade da BHE no PVN de hipertensos sedentários ocorre sem alterações estruturais das junções oclusivas, ou seja, mantendo bloqueado o transporte paracelular. Observações similares foram feitas para a permeabilidade da BHE no hipocampo de SHR adultos (52). Nossos resultados mostrando também a inalteração da expressão de constituintes da membrana basal (laminina $\alpha 2$ e colágeno $\alpha 1$), dos pericitos (PDGFRβ) e dos podócitos dos

astrócitos (aquaporina-4) nos hipertensos quando comparados a seus controles normotensos confirmam ainda a *integridade estrutural da BHE* nos SHR-S.

Outro dado original de nosso trabalho foi a constatação de que a normalização da permeabilidade no PVN de SHR induzida pelo treinamento é devida à intensa redução do transporte transendotelial, como indicado pela queda de cerca de 60% na expressão gênica e proteica de caveolina-1, igualando-a à dos WKY. O treinamento foi, portanto, eficaz em *corrigir a funcionalidade* da BHE do PVN, mantendo reduzida (e similar à de indivíduos normotensos, (39)) a taxa de transcitose através do endotélio vascular, mesmo no rato ainda hipertenso. Além disto, o treinamento foi eficaz não só em manter a integridade das junções oclusivas, como ainda aumentou e expressão proteica de claudina-5, uma proteína estrutural de barreira que regula a seletividade da BHE a substâncias de baixo peso molecular. Em camundongos knock out para claudina-5, Nitta e cols (55) identificaram manutenção da função de barreira, mas extravasamento de moléculas de peso molecular menor que 800 Dalton, indicando sua importância em controlar a seletividade e a impermeabilidade da BHE a moléculas diminutas. Portanto, a maior expressão de claudina-5 na BHE dos SHR-T seria uma garantia adicional a *manter a integridade estrutural das junções oclusivas* e a impermeabilidade a substâncias hidrossolúveis de baixo peso molecular.

Observamos também que o treinamento aeróbio foi acompanhado apenas nos hipertensos de aumento marcante na expressão de aquaporina-4, uma proteína de membrana especificamente expressa nos podócitos dos astrócitos, que envolvem externamente o capilar encefálico (endotélio + membrana basal + pericitos) funcionando como 'bordas' a separar o tecido não-neural dos neurônios e parênquima cerebral (3,56). Considerando-se que, em indivíduos hígidos, os podócitos dos astrócitos restringem a entrada de células inflamatórias no parênquima cerebral (56), é de fundamental importância o efeito do treinamento em corrigir a disfunção de barreira aumentando a densidade dos podócitos (e, portanto, evitando o extravasamento de macrófagos no parênquima cerebral) na hipertensão espontânea uma doença neurogênica caracterizada por baixo grau de inflamação(57). De fato, os astrócitos respondem a insultos no SNC não apenas restringindo a inflamação, mas também facilitando reparos na BHE e consequentemente a proteção dos neurônios(56,58). Vários trabalhos têm demonstrado que além da função de barreira, da regulação iônica e da função anti-inflamatória, os astrócitos são capazes de secretar uma série de fatores como o fator neurotrófico derivado da glia (GNDF) fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF), fator β de transformação do crescimento (TGFβ) e angiopoetina 1, que podem induzir, facilitar e manter a função de barreira(3,4,59),

assim como a laminina um componente específico da membrana basal de vasos cerebrais, a qual ao se ligar a receptores de integrina previne a diferenciação de pericitos do estágio quiescente e estabilizador para o estágio contrátil e lesivo da BHE (41).

Em coerência a esses achados, nossos resultados relativos ao aumento da densidade dos podócitos de astrócitos, mas inalteração da expressão gênica e proteica do PDGFRβ nos SHR treinados quando comparados a seus controles sedentários sugerem que o treinamento também contribuiu para a estabilização dos pericitos, mantendo-os no estado inativo e estabilizador da BHE. Embora não contássemos com anticorpo contra laminina (e/ou outro componente da membrana basal), a inalteração de sua expressão gênica após treinamento nos SHR é um índice a sugerir que a manutenção dos pericitos em seu estado quiescente não alterou a síntese de laminina, contribuindo para a estabilidade observada na membrana basal.

Deve-se ter presente que estas alterações estruturais e funcionais induzidas pelo treinamento na BHE dos SHR, que condicionaram sua integridade funcional e corrigiram a perfusão cerebral numa importante área de controle autonômico, ocorreram simultaneamente à melhora do controle autonômico da circulação, como evidenciados pelo aumento da atividade vagal ao coração e redução da atividade simpática ao coração e vasos. Estas observações sugerem uma possível causa-efeito. De fato, a ausência de quaisquer alterações seja nos diferentes componentes da BHE, seja no controle autonômico da circulação de ratos normotensos submetidos à mesma intensidade de treinamento, reforça a proposição acima, ou seja, o aumento da variabilidade da frequência cardíaca e a redução da variabilidade da pressão arterial induzidas pelo treinamento nos ratos hipertensos espontâneos (as quais contribuem para evitar lesões de órgãos-alvo, reduzindo os fatores de risco na hipertensão(60,61) dependem da redução da transcitose, do fortalecimento das junções oclusivas pela síntese aumentada de claudina-5 e do maior revestimento do endotélio pelos podócitos astrocíticos, os quais conjuntamente contribuem para a normalização da permeabilidade da BHE no PVN ventromedial. Embora não tenhamos investigado os efeitos sobre a BHE em outras áreas de integração do controle autonômico como os subnúcleos posterior e dorsal cap do PVN, o NTS e o RVLM, é bastante provável que mecanismos similares aos observados no presente trabalho condicionem seus ajustes funcionais à hipertensão e ao treinamento aeróbio.

4. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a disfunção autonômica que caracteriza a fase crônica da hipertensão ocorre simultaneamente ao aumento da permeabilidade da BHE determinada pelo aumento da expressão de vesículas transendoteliais positivas para a caveolina-1 que condicionam a transcitose, sem alterações dos constituintes da barreira e do transporte paracelular.

O treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade diminui e normaliza a permeabilidade da BHE de hipertensos por reduzir a transcitose e a expressão de vesículas transendoteliais, aumentando adicionalmente a função de barreira por reforçar as junções oclusivas pela maior expressão de claudina-5 e por aumentar a densidade dos podócitos dos astrócitos que revestem os capilares do PVN ventromedial. Estas adaptações induzidas pelo treinamento nesta importante área de integração cardiovascular melhoram a perfusão tecidual e contribuem substancialmente para normalizar a disfunção autonômica mesmo na persistência da hipertensão.

5. Referências bibliográficas

1. Tolkien JR. The Council of Elrond. In: The Lord of the Rings: The Fellowship of the Ring. 1954.
2. Bradbury MW. The Blood-brain barrier. Exp Physiol. 1993;78:453–72.
3. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006;7(1):41–53.
4. Daneman R, Prat A. The Blood – Brain Barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7:1–5.
5. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature. 2010;468(7323):557–61.
6. Lawther BK, Kumar S, Krovvidi H. Blood–brain barrier. Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain. 2011;11(4):128–32.
7. Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. J Cell Biol. 2015;208(6):821–38.
8. DE Vries HE, Kuiper J, Boer AGDE, Berkel TJCVAN, Breimer DD. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. Pharmacol Rev. 1997;49(2).
9. 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. 2009;29(3):640–7.
10. Wilhelm I, Krizbai IA. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain. Mol Pharm. 2014 Jul 7;11(7):1949–63.
11. Miller DS. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. Trends Pharmacol Sci. 2010;31(6):246–54.
12. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. Hypertension. 2013;62(5):810–7.
13. Zhang M, Mao Y, Ramirez SH, Tuma RF, Chabrashvili T. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. Neuroscience. 2010;171(3):852–8.
14. Ueno M, Chiba Y, Matsumoto K, Murakami R, Fujihara R, Kawauchi M, et al. Blood-brain barrier damage in vascular dementia. Neuropathology. 2015;(August):n/a-n/a.
15. Hill J, Rom S, Ramirez SH, Persidsky Y. Emerging Roles of Pericytes in the Regulation of the Neurovascular Unit in Health and Disease. J Neuroimmune

Pharmacol. 2014;9(5):591–605.
16. Zlokovic B V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. Neuron. 2008;57(2):178–201.
17. 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. 2007;292(5):R1881-92.
18. Mueller SM, Heistad DD. Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier. Hypertension. 1980;2(6):809–12.
19. Biancardi V, Stern J. Compromised blood-brain barrier permeability: Novel mechanism by which circulating angiotensin II signals sympathoexcitatory centers during hypertension. J Physiol. 2015;53:n/a-n/a.
20. 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. 2013;9(2):93–8.
21. Capone C, Faraco G, Park L, Cao X, Davisson RL, Iadecola C. The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;300(1):H397–407.
22. Ito H, Takemori K, Kawai J, Suzuki T. AT1 Receptor Antagonist Prevents Brain Edema Without Lowering Blood Pressure. In: Mendelow AD, Baethmann A, Czernicki Z, Hoff J, Ito U, James H, et al., editors. Brain Edema XI SE - 29. Springer Vienna; 2000. p. 141–5. (Acta Neurochirurgica Supplements; vol. 76).
23. Biancardi V, Son SJ, Ahmadi S, Filosa J a, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. Hypertension. 2014;63(3):572–9.
24. de Kloet AD, Liu M, Rodríguez V, Krause EG, Sumners C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2015 Sep 1;309(5):R444–58.
25. Veerasingham SJ, Raizada MK. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. Br J Pharmacol. 2003;139(2):191–202.
26. Diz DI, Arnold AC, Nautiyal M, Isa K, Shaltout H a, Tallant EA. Angiotensin peptides and central autonomic regulation. Curr Opin Pharmacol. 2011;11(2):131–7.
27. Chaar LJ, Alves TP, Batista Junior AM, Michelini LC. Early Training-Induced Reduction of Angiotensinogen in Autonomic Areas-The Main Effect of Exercise on

Brain Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. PLoSONE. 2015;10(1932–6203 (Electronic)):e0137395.

28. Felix JVC, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. Hypertension. 2007;50(4):780–5.
29. Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PPS, Laurindo FR, et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. PLoS One. 2014 Jan;9(5):e94927.
30. 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 Res Cardiol. 2011;106(6):1069–85.
31. Zheng H, Sharma NM, Liu X, Patel KP. Exercise training normalizes enhanced sympathetic activation from the paraventricular nucleus in chronic heart failure: role of angiotensin II. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2012;303(4):R387-94.
32. 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. 2017;8:1–14.
33. Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordao MT, Ceroni a., Michelini LC. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. AJP Regul Integr Comp Physiol. 2011;301(4):R958–66.
34. Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni L V., Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? Hypertension. 2008;52(3):514–21.
35. Silva Jr SD, Zampieri TT, Ruggeri A, Ceroni A, Aragão DS, Fernandes FB, et al. Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training: focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes. Circ J. 2015;79(6):1372–80.
36. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. J Cell Biol. 2015;209(4):493–506.
37. Okamoto T, Schlegel a, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. J Biol Chem. 1998;273(10):5419–22.
38. Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. Membrane domains. Trends Cell

Biol. 1994;4:231–235.

39. Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. Neuron. 2017;94:581–94.
40. Chen ZL, Yao Y, Norris EH, Kruyer A, Jno-Charles O, Akhmerov A, et al. Ablation of astrocytic laminin impairs vascular smooth muscle cell function and leads to hemorrhagic stroke. J Cell Biol. 2013;202(2):381–95.
41. Yao Y, Chen Z-L, Norris EH, Strickland S. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. Nat Commun. 2014;5:3413.
42. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. Blood. 2009;114(24):5091–101.
43. Joutel A, Faraci FM. Cerebral Small Vessel Disease: Insights and Opportunities From Mouse Models of Collagen IV−Related Small Vessel Disease and Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. Stroke. 2014;45:1215–21.
44. Nedergaard M, Ransom B, Goldman S a. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci. 2003;26(10):523–30.
45. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(20):11981–6.
46. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006;7(1):41–53.
47. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. FEBS J. 2015;282(21):4067–79.
48. Hagan N, Ben-Zvi A. The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2015;38:7–15.
49. Al-Sarraf H, Ghaaedi F, Redzic Z. Time course of hyperosmolar opening of the blood-brain and blood-CSF barriers in spontaneously hypertensive rats. J Vasc Res. 2007;44(2):99–109.
50. 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. 2013;8(2):e56419.

51. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. Neuron. 2013;80(4):844–66.

52. Ueno M, Sakamoto H, Tomimoto H, Akiguchi I, Onodera M, Huang CL, et al. Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats. Acta Neuropathol. 2004;107(6):532–8.

53. 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. 2014;210(12):985–90.

54. Pelisch N, Hosomi N, Ueno M, Nakano D, Hitomi H, Mogi M, et al. Blockade of AT1 Receptors Protects the Blood-Brain Barrier and Improves Cognition in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. Am J Hypertens. 2011;24(3):362–8.

55. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. J Cell Biol. 2003;161(3):653–60.

56. Sofroniew M V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. Neuroscientist. 2005;11(5):400–7.

57. Waki H, Gouraud SS, Maeda M, Raizada MK, Paton JFR. Contributions of vascular inflammation in the brainstem for neurogenic hypertension. Respir Physiol Neurobiol. 2011;178(3):422–8.

58. Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. Neuron. 2008;60(3):430–40.

59. Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. Cell Mol Neurobiol. 2005;25(1):25–39.

60. Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Exp Physiol. 2009;94(6):630–40.

61. Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: Role in cardiovascular control. Exp Physiol. 2009;94(9):947–60.