

Sebastião Donato Silva Júnior

Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina plasmático e cardíaco de SHR: Análise do estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco

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
2016

Sebastião Donato Silva Júnior

Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina plasmático e cardíaco de SHR: Análise do estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco

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 Compagno Michelini

São Paulo
2016

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

© reprodução parcial

Silva Júnior, Sebastião Donato.

Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina plasmático e cardíaco de SHR: Análise do estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco / Sebastião Donato Silva Júnior. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Sequential effects of aerobic training on the plasma and cardiac renin angiotensin system in SHR. Analysis of oxidative stress, inflammatory profile and cardiac remodeling.

1. sistema renina angiotensina 2. treinamento aeróbio 3. estresse oxidativo 4. inflamação 5. remodelamento cardíaco 6. I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB069/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sebastião Donato Silva Júnior.

Título da Tese: Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina plasmático e cardíaco de SHR: Análise do estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco .

Orientador(a): Lisete Compagno Michelini.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **188** nas fls. **115** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Lisete Compagno Michelini**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos sequências do treinamento aeróbio na modulação da atividade do sistema renina-angiotensina plasmático e tecidual*" do qual participam o(s) aluno(s) **Sebastião Donato Silva Junior, Adriana Ruggeri, Carla Rocha dos Santos, Bruno César de Oliveira Alcantara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **21.11.2011**, com **validade de 4 anos**.

São Paulo, 23 de novembro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.046.15

São Paulo, 07 de dezembro de 2015.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Efeitos sequências do treinamento aeróbio na modulação da atividade do sistema renina-angiotensina plasmático e tecidual*", registrado sob o protocolo nº **188/2011** e aprovado em 21/11/2011 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 21/11/2019**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Rattus norvegicus	WKY	Macho	02 meses	1º: 30 2º: 30 3º: 30 4º: 30
Rattus norvegicus	SHR	Macho	02 meses	1º: 30 2º: 30 3º: 30 4º: 30

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Prof.(a) Dr.(a) **Lisete Compagno Michelini**
Departamento de **Fisiologia e Biofísica**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico esta conquista a todos que
me apoiaram, incentivaram e deram
todo o suporte necessário para sua
realização.

Em especial aos meus pais
Sebastião Donato Silva e
Jaine Lima Silva
Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço da Deus, força divina que nos fortalece nos momentos de incertezas, angústia e apreensão.

A minha orientadora Prof. Dra Lisete Compagno Michelini, cientista e educadora nata, pela sua brilhante orientação neste trabalho. Por todas as oportunidades proporcionadas, as quais foram essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus pais que apesar de todas as dificuldades sempre me apoiaram em meus objetivos; pessoas especiais que me incentivaram a realizá-los.

A Vanessa Oliveira que sempre esteve ao meu lado durante todo o doutorado. Muito obrigado pelo carinho, apoio e compreensão. Você tem sido um ponto de equilíbrio em minha vida pessoal e profissional.

A Prof. Dra. Dulce Elena Casarini por todo o auxílio científico e suporte técnico na realização dos experimentos para análise do SRA.

A Zaira e a Roseli que estiveram diretamente envolvidos nos experimentos das angiotensinas.

A minha supervisora de doutorado sanduiche Prof. Dra. Rhian Touyz pela oportunidade de participar de seu grupo na University of Glasgow, o que ampliou minha visão científica e a aprendizagem de novas técnicas.

A todo o grupo da Prof Rhian pelo auxílio técnico e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB/USP), que direta ou indiretamente ajudaram e contribuíram na realização deste trabalho. Proporcionaram conversas científicas e não científicas!!! Obrigado pela amizade Carla, Tereza, Mateus, Gastão, Raul, Leila, Adriana, Marcelo, Nilson.

Ao laboratório da prof Dra Eliana e sua equipe que sempre possibilitaram a utilização dos equipamentos, reagentes e auxílio científico.

Aos amigos Eduardo Alves, Jone, Marcel, Natan e Alvim por todo apoio, amizade e incentivo na minha vinda para São Paulo.

A todos os funcionários do ICB que estão sempre dispostos a nos ajudar.
Muito obrigado José Maria, Paloma, Leila, Tarcísio, Patrícia.

A todos os funcionários da biblioteca, sempre solícitos em nos ajudar.

Ao apoio financeiro da FAPESP (2011/15681-8), Capes e Cnpq.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar nos sonhos que se têm ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vais ser alguém...”

Renato Russo

RESUMO

SILVA JÚNIOR SD. Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o sistema renina angiotensina plasmático e cardíaco de SHR: Análise do estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco. [Tese de Doutorado (Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

A hiperatividade do sistema renina angiotensina (SRA) apresenta íntima associação com o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial além de potencializar a ativação de mecanismos pró-oxidativos e pró-inflamatórios contribuindo para a ocorrência de lesões em órgãos alvo. Em nosso estudo analisamos em ratos SHR e WKY os efeitos do treinamento aeróbio sobre o SRA plasmático e cardíaco, parâmetros hemodinâmicos, estresse oxidativo, perfil inflamatório e remodelamento cardíaco. Para tanto ratos SHR e WKY foram adaptados à esteira, submetidos a teste de esforço e alocados aos grupos sedentários (S) ou treinados (T=50%-60% do desempenho máximo em teste de esforço, 1hr/dia, 5x/semana). Os efeitos sequenciais do T e S foram analisados nas semanas 0 ($S_0=T_0$), 1 (T_1), 2 (T_2), 4 (T_4) e 8 (S_8 e T_8), dos protocolos experimentais. Nossos dados confirmaram que a fase crônica da hipertensão nos SHR é acompanhada de hiperatividade do SRA, mostrando adicionalmente que a hiperativação do SRA plasmático antecedia a ativação do SRA cardíaco (3 vs. 5 meses de idade, respectivamente). SHR vs. WKY apresentaram ao início dos protocolos elevado estresse oxidativo, redução ou manutenção da expressão de enzimas antioxidantes, aumento de perfil inflamatório, hipertrofia cardíaca e maior deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (VE). Nos SHR o treinamento aeróbio promoveu pronta redução da razão Ang II/Ang (1-7) no coração (T_1) e plasma (T_2) com diminuição simultânea do estresse oxidativo e correção mais tardia (T_4 - T_8) do perfil inflamatório no VE, bem como aumento de sua defesa antioxidante (T_4 - T_8). Estas respostas ao treinamento aeróbio foram acompanhadas de inalteração da hipertrofia cardíaca, mas importante aumento no "turnover" do colágeno III, com redução significativa do conteúdo de colágeno no VE (T_8). Nos WKY o treinamento também reduziu a razão Ang II/Ang (1-7) no VE, mas mais tardiamente (T_4), sem alterações marcantes no perfil oxidativo e inflamatório, na estrutura cardíaca e marcadores de hipertrofia. Em conjunto nossos resultados indicam que durante o desenvolvimento da hipertensão o desequilíbrio entre os eixos Ang II-ECA-receptor AT1 e Ang (1-7)-ECA2-receptor Mas cardíaco, com predomínio do eixo vasoconstritor, é posterior ao plasmático, conferindo ao coração certa proteção na fase inicial da hipertensão. Mostram ainda que o treinamento aeróbio ao corrigir esse desequilíbrio, reduzindo o estresse oxidativo e o perfil pró-inflamatório é essencial para evitar a progressão do remodelamento cardíaco deletério do VE e o aumento progressivo da PA observada nos SHR sedentários.

Palavras-chave: Sistema renina angiotensina. Treinamento aeróbio. Estresse oxidativo. Inflamação. Remodelamento cardíaco

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR SD. Sequential effects of aerobic training on the plasma and cardiac renin angiotensin system in SHR. Analysis of oxidative stress, inflammatory profile and cardiac remodeling. [Ph.D. thesis (Human Physiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Hyperactivity of the renin angiotensin system (RAS) is closely associated with the development and maintenance of hypertension. In hypertensive individuals RAS enhances pro-oxidative and pro-inflammatory profile leading to the appearance of organ damage. In our study, we evaluated in male SHR and WKY rats the effects of aerobic training on the expression/activity of plasma and cardiac RAS, hemodynamic parameters, oxidative stress, inflammatory profile and cardiac remodeling. To this end, SHR and WKY were adapted to a treadmill, submitted to exercise tests and allocated to sedentary (S) or trained (T=50%-60% of maximal performance, 1hr/day, 5x/week) groups. Sequential effects of T and S protocols were evaluated at weeks 0 ($S_0=T_0$), 1 (T_1), 2 (T_2), 4 (T_4) and 8 (T_8). Our data confirmed that the chronic phase of hypertension in the SHR is accompanied by RAS hyperactivity showing in addition that plasma RAS hyperactivity appeared before activation of cardiac RAS (3 vs. 5 month, respectively). SHR vs. WKY showed at the beginning of protocols high oxidative stress, reduction or maintenance of antioxidant enzymes expression, increased inflammatory profile, cardiac hypertrophy and higher collagen deposition in the left ventricle (LV). Aerobic training in SHR promoted a prompt reduction of Ang II/Ang (1-7) ratio in heart (T_1) and plasma (T_2), with concomitant reduction of oxidative stress and posterior correction of inflammatory profile (T_4 - T_8) and augmentation of antioxidant defense (T_4 - T_8) in the LV. These training-induced responses were accompanied by unchanged cardiac hypertrophy, but increased collagen III turnover, with significant reduction of collagen content within the LV (T_8). In the WKY, training also reduced Ang II/ Ang (1-7) ratio, but later on (T_4) without important changes in the oxidative and inflammatory profile, in cardiac structure and hypertrophy markers. Together our results indicate that during the establishment of hypertension the unbalance between Ang II-ECA-AT1 receptor and Ang (1-7)-ECA2-Mas receptor axes with the predominance of the vasoconstrictor axis in the LV is posterior to changes in plasma RAS, determining some protection to the heart in the initial hypertensive phase. In addition, our data showed that aerobic training, by correcting RAS unbalance, reduces oxidative stress and pro-inflammatory profile, being essential to avoid the deleterious cardiac remodeling and the progression of arterial pressure increase observed in the sedentary SHR.

Keywords: Renin angiotensin system. Aerobic training. Oxidative stress. Inflammation. Cardiac remodeling.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Figura ilustrativa dos componentes do sistema renina angiotensina. Retirada de Etelvino et al, 2014..... 24
- Figura 2 - Evolução temporal do peso corporal de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo dos protocolos experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0. 59
- Figura 3 - Alteração sequencial do desempenho em esteira, avaliada através de testes de esforço máximo realizados no início, na 4ª e 8ª semanas dos protocolos de treinamento ou sedentarismo em ratos SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; ‡ vs sedentário mesmo grupo..... 61
- Figura 4 - Efeito do treinamento (T) ou sedentarismo(S) sobre a capacidade física dos animais, aferida como a diferença de desempenho entre as semanas 8 e 0. Significâncias ($P < 0,05$): † indica ganho significativo, * vs sedentário correspondente..... 61
- Figura 5 - Representação gráfica da evolução temporal da PAM em ratos SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): † vs semana 0; * vs WKY correspondente, # vs S8. 63
- Figura 6 - Valores de PAM em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final dos protocolos experimentais (semana 8). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs S8..... 64
- Figura 7 - Representação gráfica da evolução temporal da FC basal em ratos SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente, † vs semana 0, # vs controle sedentário, ‡ vs SHR T8. 65
- Figura 8 - Valores de FC basal em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final dos protocolos (semana 8). Significâncias ($P < 0,05$): † T8 vs S8, * vs WKY S8..... 65
- Figura 9 - Imagem representativa de um cromatograma de uma amostra plasmática 67
- Figura 10 - A. Evolução temporal do conteúdo plasmático de Ang II ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). B. Comparação do conteúdo de Ang II em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente. 69
- Figura 11 - A. Evolução temporal do conteúdo plasmático de Ang (1-7) ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). B. Comparação do conteúdo de Ang (1-7) em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente. 70
- Figura 12 - A. Evolução temporal do conteúdo de Ang II no ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). B. Comparação do conteúdo de Ang II no VE de SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente. 72
- Figura 13 - A. Evolução temporal do conteúdo de Ang (1-7) no ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). B. Comparação do conteúdo de Ang (1-7) no VE em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente. 73
- Figura 14 - Evolução temporal da razão Ang II/Ang (1-7) no plasma (A) e no VE (B) ao longo de 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S) nos grupos SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY, † vs semana 0, # T8 vs S8 correspondente, ‡ SHR S8 vs WKY S8..... 74
- Figura 15 - A. Evolução temporal na expressão de receptores AT₁ de Ang II no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). B. Comparação da expressão de receptores AT₁ na 8ª. semana experimental. C. Gel representativo da expressão proteica de AT₁ nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY. 75
- Figura 16 - A. Evolução temporal na expressão de receptores AT₂ de Ang II no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). B. Comparação da expressão de

receptores AT_2 na 8ª. semana experimental. C. Gel representativo da expressão proteica de AT_2 nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY. 76

Figura 17 - A. Evolução temporal na expressão de receptores Mas de Ang-(1-7) no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). B. Comparação da expressão de receptores Mas na 8ª. semana experimental. C. Gel representativo da expressão proteica de Mas nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY, † vs semana 0, # T8 vs S8 correspondente 78

Figura 18 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da NOX2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de NOX 2 em WKY e SHR ao término das 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0. 80

Figura 19 - Evolução temporal da expressão do RNAm da NOX4 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de NOX4 em WKY e SHR ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 81

Figura 20 - Imagens representativas da biodisponibilidade de EROs (mensurada pela imunorreatividade para o dihidroxietídeo, DHE) em ratos WKY (painéis superiores e SHR (painéis inferiores) sedentários (S) e treinados (T) nas semanas experimentais 0, 2 e 8. 82

Figura 21 - treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; †, vs semana 0, # SHR-S8 vs SHR T-8. 82

Figura 22 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da SOD em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão da SOD ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 83

Figura 23 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de NqO em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão da NqO ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: † vs S0; # T8 vs S8. 84

Figura 24 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da catalase em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão da catalase ao final das 8 semanas experimentais Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; # T8 vs S8. 85

Figura 25 - A. Evolução temporal da atividade da catalase em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da atividade da catalase ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 86

Figura 26 - A Evolução temporal da expressão do RNAm de Gpx em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de Gpx ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 86

Figura 27 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de TNF- α em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de TNF- α ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 88

Figura 28 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de IL-1 β em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de IL-1 β ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 89

Figura 29 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da IL-10 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). Comparação da expressão de IL-10 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8. 90

Figura 30 - Evolução temporal da razão do peso do VE/comprimento da tíbia (VE/CT) em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0. 91

Figura 31 - Evolução temporal da razão do peso do VE/peso corporal (VE/PC) em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo de 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; # T8 vs S8. 91

Figura 32 - Imagem representativa de cortes histológicos corados com solução de hematoxilina-eosina para análise do diâmetro de cardiomiócitos no VE de ratos WKY e SHR. 92

Figura 33 - Comparação do diâmetro dos cardiomiócitos nos grupos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final da oitava semana de protocolos. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente.....	93
Figura 34 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da α -MHC em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de α -MHC ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0.....	94
Figura 35 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da β -MHC em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de β -MHC ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0.....	95
Figura 36 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de α -actina em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de α -actina ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.....	96
Figura 37 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm do ANP em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão do ANP ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.	97
Figura 38 - Imagens representativas da deposição de colágeno em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao longo das 8 semanas experimentais.....	98
Figura 39 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e do sedentarismo (S) sobre a deposição de colágeno total em ratos WKY e SHR durante as 8 semanas experimentais.	98
Figura 40 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de colágeno I em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de colágeno I ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0.....	99
Figura 41 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de colágeno III em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de colágeno III ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.....	100
Figura 42 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da MMP2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão da MMP2 final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.....	101
Figura 43 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da TIMP1 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de TIMP1 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.....	102
Figura 44 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da TIMP2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). B. Comparação da expressão de TIMP2 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente.	103

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Classificação da hipertensão arterial de acordo com o 7^o JNC.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 2 - Velocidade máxima (em km/h) atingida nos testes de esforço máximo, realizados nas semanas 0, 4 e 8 nos grupos SHR e WKY treinados e sedentários.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 3 - Valores de PAM e FC basais de ratos WKY e SHR treinados e sedentários ao longo de 8 semanas.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 4 - Concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no plasma de WKY e SHR treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 5 - Concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no ventrículo esquerdo de ratos WKY e SHR treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 6 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de NOX2, NOX4, SOD, NqO, Catalase, GpX, HO-1, atividade da catalase e biodisponibilidade de EROs em SHR e WKY.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 7 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de TNF-α, IL-1β, e IL-10 em ratos WKY e SHR sedentários (S).</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 8 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de α-MHC, β-MHC, α-actina e ANP em ratos WKY e SHR sedentários (S).....</i>	<i>93</i>

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ang (1-7) – angiotensina (1-7)
Ang I – angiotensina I
Ang II – angiotensina II
ANOVA – análise de variância
ANP – peptídeo natriurético atrial
Aogen – angiotensinogênio
AT₁ – receptor tipo 1 para Ang II
AT₂ – receptor tipo 2 para Ang II
BSA – albumina sérica bovina
Ca²⁺ - cálcio
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
CEEA - comissão de ética em experimentação animal
cm – centímetro
Col I – colágeno I
Col III – colágeno III
CT – comprimento da tíbia
CTGF – fator de crescimento tecido conectivo
DAG – diacilglicerol
DHE – Dihidroetidina
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT – ditioneitol
ECA – enzima conversora de angiotensina
ECA 2 – enzima conversora de angiotensina 2
ERK ½ – quinase reguladora de sinal extracelular
EROs – espécies reativas de oxigênio
FC – frequência cardíaca
g – gramas
GPCRs - receptores acoplados a proteína G
GPX – glutatona peroxidase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HA – hipertensão arterial

HPLC – cromatografia líquida de alta performance
HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
IL-10 – interleucina-10
IL-1 β – interleucina-1beta
IL6 – interleucina 6
IP3 – fosfatidil inositol trifosfato
JAK – janus quinase
JNC - *Joint National Committee*
JNK – jun n terminal quinase
KCL – cloreto de potássio
Kg – quilograma
Km/h – quilômetros por hora
MAPK - proteína quinase ativadas por mitógenos
Mas – receptor para Ang (1-7)
mg – miligramas
mL – mililitro
mm – milímetros
mmHg – milímetros de mercúrio
MMP2 – metaloproteinase de matriz 2
NaCl – cloreto de sódio
NEP – endopeptidase neutra
NFAT – fator nuclear de células T ativadas
NF κ B – fator nuclear kappa B
NO – óxido nítrico
NQO1 – NAD(P)H quinona desidrogenase 1
NTS – núcleo do trato solitário
O₂⁻ – ânion superóxido
°C – graus Celsius
OH⁻ – radical hidroxila
PA – pressão arterial
PAD – pressão arterial diastólica
PAM – pressão arterial média
PAS – pressão arterial sistólica
PC – peso corporal

PCP – prolilcarboxipeptidase
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEP – prolil-endopeptidase
PGI₂ – prostaglandina 2
PI3K – fosfatidil inositol 3 quinase
PKC – proteína quinase C
PKD – proteína quinase d
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RVP – resistência vascular periférica
S – sedentário
S₀ – animal sedentário na semana 0
S₈ – animal sedentário na semana 8
SDS – sódio dodecil sulfato
SHR – ratos espontaneamente hipertensos
SOD – superóxido dismutase
SRA – sistema renina angiotensina
STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição
T – treinado
T₀ – animal treinado na semana 0
T₁ – animal treinado na semana 1
T₂ – animal treinado na semana 2
T₄ – animal treinado na semana 4
T₈ – animal treinado na semana 8
TGF- β – fator de crescimento transformador tipo beta
TIMP1 - inibidor tecidual de metaloproteinases 1
TIMP2 - inibidor tecidual de metaloproteinases 2
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
VE – ventrículo esquerdo
VO₂ máx – consumo máximo de oxigênio
WKY – wistar kyoto
 α -actina – alfa actina
 α -MHC – alfa miosina de cadeia pesada
 β -MHC – beta miosina de cadeia pesada
 μ L – microlitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia da hipertensão arterial	21
1.2 Fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica	22
1.3 Sistema renina angiotensina e hipertensão arterial	23
1.3.1 Principais componentes do sistema renina angiotensina	24
1.3.2 Receptores do sistema renina angiotensina	27
1.3.3 Ações do SRA circulante.....	28
1.3.4 Sistema renina angiotensina tecidual.....	29
1.3.5 Envolvimento do SRA no desenvolvimento e manutenção da HA	34
1.3.6 Remodelamento cardíaco: Relação entre SRA, estresse oxidativo e inflamação	35
1.3.7 Utilização do treinamento aeróbio no tratamento da hipertensão arterial: envolvimento do SRA.	39
2 OBJETIVOS	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Animais Experimentais	45
3.2 Protocolo de Treinamento Físico.....	45
3.3 Registro direto da PA e FC.....	48
3.4 Coleta dos tecidos e sangue	49
3.5 Quantificação das Angiotensinas plasmáticas e teciduais.....	50
3.6 Western Blot.....	51
3.6.1 SDS PAGE	51
3.6.2 Immunoblotting.....	51
3.7 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	52
3.8 PCR em tempo real.....	53
3.9 Análise do remodelamento cardíaco	56
3.9.1 Análise da hipertrofia cardíaca.....	56
3.9.2 Análise da deposição de colágeno.....	57
3.10 Análise estatística	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Alterações sequenciais do peso corporal em WKY e SHR sedentários e treinados	59
4.2 Avaliação da Capacidade Física de WKY e SHR.....	59
4.3 Efeito do treinamento ou sedentarismo sobre os parâmetros hemodinâmicos	62
4.4. Efeitos sequenciais do treinamento e sedentarismo sobre o conteúdo plasmático e cardíaco de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em WKY e SHR.....	66
4.4.1 Análise do conteúdo plasmático de Ang I, Ang II e Ang (1-7).....	67
4.4.2 Análise do conteúdo cardíaco de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em WKY e SHR	70

4.4.3 Efeito do treinamento e sedentarismo sobre a razão AngII/Ang(1-7) no plasma e coração de WKY e SHR.....	73
4.5 Expressão proteica dos receptores do SRA no VE de WKY e SHR sedentários e treinados.....	74
4.5.1 Receptores AT ₁ no VE.....	74
4.5.2 Receptores AT ₂ no VE.....	76
4.5.3 Receptores Mas	77
4.6 Influência do treinamento e sedentarismo sobre o balanço oxidativo no VE de WKY e SHR.....	78
4.6.1 Análise do balanço oxidativo basal no VE de WKY e SHR.....	78
4.6.2 Influência do treinamento ou sedentarismo no perfil da expressão gênica das NOX2 e NOX4 no VE de WKY e SHR	79
4.6.3 Efeitos do treinamento ou sedentarismo na biodisponibilidade de EROs no VE de WKY e SHR	81
4.6.4 Efeitos do treinamento aeróbio ou sedentarismo nos mecanismos de defesa antioxidante no VE de WKY e SHR	83
4.7 Perfil inflamatório no VE de WKY e SHR	87
4.7.1 Expressão gênica de citocinas na condição basal	87
4.7.2 Efeito do treinamento ou sedentarismo na expressão gênica de citocinas no VE de WKY e SHR	87
4.8 Alterações sequenciais do treinamento sobre o remodelamento cardíaco em WKY e SHR sedentários e treinados	90
4.8.1 Análise da hipertrofia cardíaca.....	90
4.8.2 Expressão de genes indicadores da hipertrofia cardíaca	93
4.8.3 Análise da deposição de colágeno.....	97
4.8.4 Efeitos do treinamento sobre a síntese de colágeno no VE de WKY e SHR.....	98
4.8.5 Efeitos do treinamento sobre a expressão de genes envolvidos na regulação da degradação do colágeno	100
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HA) é uma síndrome crônica e multifatorial caracterizada por níveis de pressão arterial elevados e sustentados. Para o diagnóstico da HA considera-se a pressão arterial sistólica (PAS) superior a 140 mm/Hg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) superior a 90 mm/Hg, os quais devem ser mensurados por medidas repetidas, em condições ideais e em pelo menos três diferentes momentos (1,2). Devido a maior probabilidade de ocorrência de eventos cardiovasculares em valores elevados de pressão arterial, o 7^o JNC em sua nova classificação de hipertensão arterial introduziu também o termo pré-hipertensão, e reestratificou os valores de pressão arterial em outras categorias, conforme a tabela 1 (1). Na publicação mais recente do 8^o JNC, os valores diagnósticos para hipertensão arterial permaneceram inalterados (3).

Tabela 1 - Classificação da hipertensão arterial de acordo com o 7^o JNC

Estágio	PA Sistólica	PA Diastólica
Normal	< 120	< 80
Pré-hipertensão	120-139	80-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	>160	>100

Estima-se que a incidência de hipertensão arterial no Brasil ultrapassa 30% da população brasileira, podendo chegar a 50% entre os indivíduos idosos na faixa etária acima de 60 a 69 anos (2,4). Estima-se ainda que 95% dos casos de hipertensão compreendem a hipertensão primária ou essencial, ou seja, os fatores desencadeantes do desenvolvimento da hipertensão não são conhecidos (2).

Além da alta prevalência, a hipertensão arterial é um significativo fator de risco associado ao desenvolvimento de inúmeras patologias cardiovasculares, cerebrovasculares, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca entre outras (1–3).

1.2 Fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica

Devido a sua característica multifatorial, a hipertensão arterial é uma doença que apresenta alterações em diversos sistemas e mecanismos centrais e periféricos envolvidos no controle da pressão arterial (5,6). Apesar da alta complexidade na compreensão da fisiopatologia da hipertensão arterial diversos conceitos, fundamentados em evidências científicas, estão amplamente consolidados na literatura. Sabe-se que alterações do sistema nervoso central ou disfunção autonômica contribuem para aumento da atividade nervosa simpática, redução da atividade nervosa parassimpática, disfunção dos mecanismos de controle representado pelos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares (5,7,8).

Outra característica da hipertensão arterial é o aumento da resistência periférica, desencadeada pelo próprio aumento da atividade simpática e também por alterações estruturais que levam ao aumento da razão parede luz e rarefação capilar (9,10). Além disso, observa-se também importante desequilíbrio entre fatores contráteis e vasodilatadores dependentes ou não do endotélio. O aumento da resistência periférica observada na hipertensão arterial tem grande repercussão sobre o coração devido à necessidade de maior desenvolvimento de força contrátil para atender à demanda de fluxo sanguíneo aos os diferentes tecidos do organismo (11). A manutenção crônica da sobrecarga cardíaca, associada a fatores humorais e à ativação do sistema nervoso central sobre o coração contribuem para o

desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, que pode a longo prazo evoluir para a insuficiência cardíaca (11,12).

Grande parte das alterações mencionadas acima apresentam íntima associação com o sistema renina angiotensina (SRA). Inúmeros estudos demonstram que a hipertensão arterial encontra-se associada à hiperatividade do SRA, o qual por aumento da disponibilidade da Ang II, via receptores AT₁, promove vasoconstrição, maior atividade nervosa simpática, remodelamento vascular e cardíaco, inflamação além de ser um potente estímulo para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (13–15).

1.3 Sistema renina angiotensina e hipertensão arterial

O SRA é um sistema de grande complexidade envolvido no equilíbrio hidroeletrólítico, reabsorção de sódio e controle da pressão arterial, sendo a hipertensão arterial fortemente relacionada à hiperativação do SRA. Inicialmente o SRA foi descrito como um sistema humoral circulante cuja principal função relacionava-se aos efeitos vasoconstritores na vasculatura em resposta à ativação dos receptores AT₁ pela Ang II. Porém, como pode ser observado na figura 1, ao longo de anos inúmeros outros componentes do SRA foram descritos contribuindo significativamente para o aumento da complexidade no entendimento deste sistema. Sabe-se hoje que o SRA apresenta ações distintas, além de estar presente em diferentes órgãos como o encéfalo, coração, rins, vasos, etc., onde exerce ações independentes do SRA circulante. Nas seções seguintes, nossa introdução irá abordar os aspectos do SRA circulante bem como o SRA local com atenção especial ao coração. Na sequência buscaremos evidências acerca da contribuição do SRA no desenvolvimento do remodelamento cardíaco, desequilíbrio oxidativo e

inflamatório de hipertensos. Por fim abordaremos o papel do exercício físico repetitivo (treinamento aeróbio) na terapêutica da hipertensão arterial.

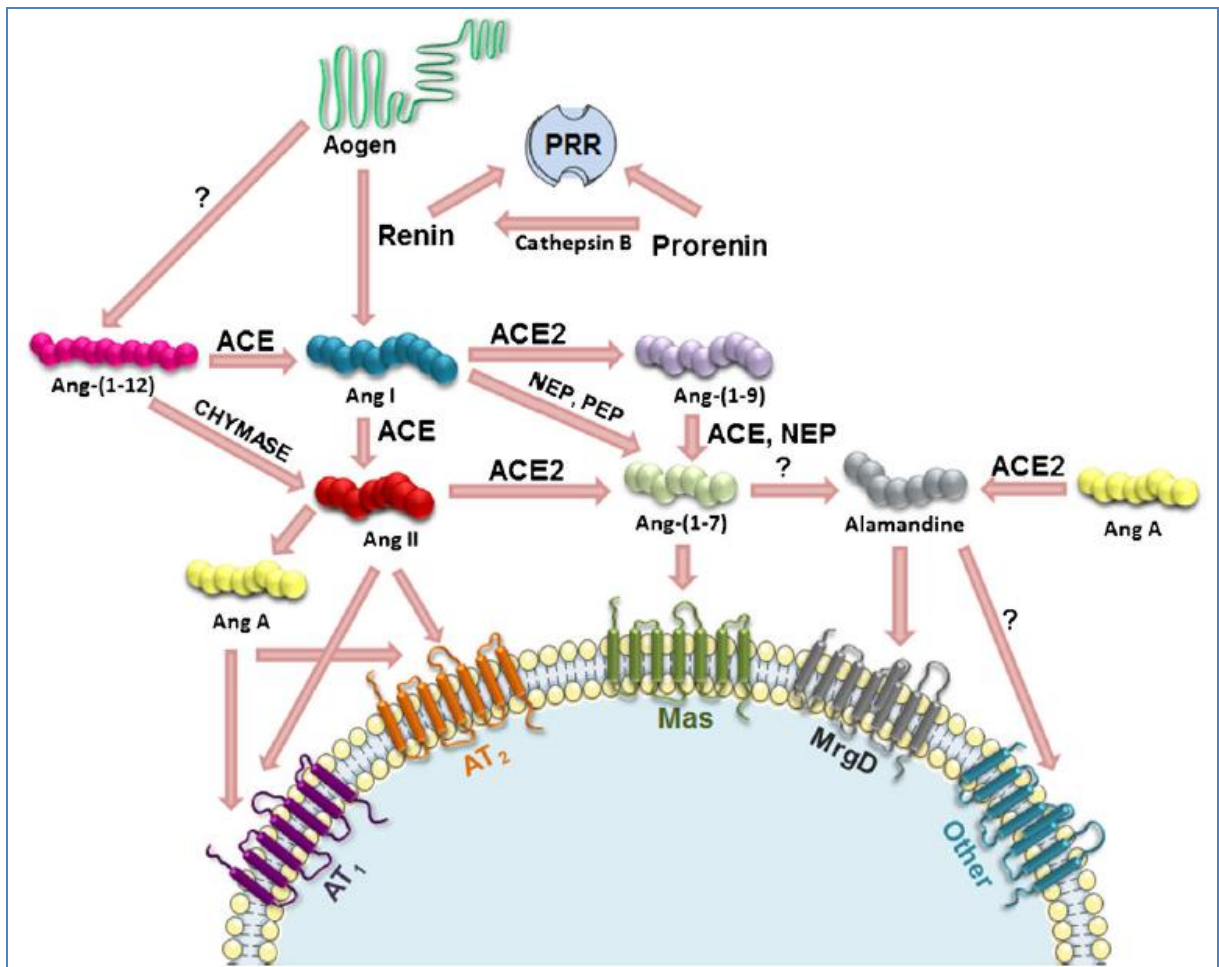


Figura 1 - Figura ilustrativa dos componentes do sistema renina-angiotensina. Retirada de Etelvino et al, 2014.

1.3.1 Principais componentes do sistema renina-angiotensina

No final do século XIX, dois eminentes cientistas deram o passo inicial para a compreensão de um importante sistema envolvido no controle da pressão arterial (PA) (16). Foi através dos experimentos realizados pelo fisiologista finlandês Tigerstedt juntamente com seu aluno Bergman em 1898, que se iniciou a história do SRA. Em uma série de elegantes experimentos observaram que extratos obtidos a partir do córtex de rins de coelhos, quando injetado em coelhos receptores através da veia jugular, desencadeava aumento na PA. Devido a origem renal destes extratos, eles então o denominaram de renina (16,17).

Por volta de 1940, dois grupos trabalhando de maneira independente descreveram que a renina não possuía efeito pressor direto, mas funcionava como uma enzima para um substrato até então desconhecido, mais tarde denominado de angiotensinogênio (Aogen), o componente inicial da cascata do SRA, o qual após uma série de reações enzimáticas tinha como produto uma substância vasoconstritora posteriormente denominada angiotensina II (Ang II) (18,19).

A partir destas descobertas renovou-se o interesse pelo estudo do SRA, o que contribuiu significativamente para ampliar o conhecimento deste sistema. Assim o SRA foi descrito originalmente como um sistema hormonal circulante de grande importância para a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e da PA dentro dos limites da normalidade, sendo a Ang II o principal componente biologicamente ativo, através de suas ações mediadas por receptores AT_1 (18,19). De acordo com a visão clássica, o SRA tem como precursor inicial o Aogen, uma alfa 2 globulina sem atividade biológica conhecida, que no entanto é imprescindível para a geração dos peptídeos biologicamente ativos do SRA. O Aogen é sintetizado principalmente no fígado, sob a ação de diferentes hormônios, como os glicocorticóides, o hormônio tireoidiano e a própria Ang II, sendo liberado para a circulação onde é encontrado em altas concentrações (20).

Na circulação, o Aogen é então clivado pela renina, uma enzima proteolítica, produzida pelas células justaglomerulares através de uma série de reações enzimáticas. O produto translacional formado a partir do RNAm é a pré-pró-renina, um composto com uma sequência de 406 aminoácidos. No interior do retículo endoplasmático rugoso a sequência pré de 23 aminoácidos é clivada, dando origem à pró-renina. Em seguida nos grânulos secretórios do complexo de Golgi a pró-renina resultante é convertida em renina através da clivagem do pró-segmento N-

terminal de 43 aminoácidos (21). A renina é armazenada em grânulos secretórios do aparelho justaglomerular de onde é liberada para a circulação. Três são os estímulos responsáveis pela liberação de renina: hipoperfusão da arteríola aferente renal, estimulação simpática e redução da carga filtrada de sódio que alcança as células da mácula densa. Uma vez liberada na circulação a renina promove a clivagem do segmento N-terminal do Aogen. Essa interação entre renina e Aogen resulta na formação da Angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo formado pela seguinte sequência de aminoácidos: Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7-Phe8-His9-Leu10 (22). A próxima etapa enzimática desta cascata é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA promove a remoção do dipeptídeo (His9-Leu10), dando origem a Ang II, o octapeptídeo Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7-Phe8 (23,24).

Nos últimos anos grande importância também tem sido dada à Angiotensina (1-7) (Ang (1-7)), outro peptídeo do SRA com atividade biológica, e que antagoniza as ações desencadeadas pela Ang II por meio das ações mediadas pelo receptor Mas (25). A Ang (1-7) é um heptapeptídeo (Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7), que pode ser formado por pelo menos três diferentes vias enzimáticas: 1. diretamente a partir da Ang II, por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) um homólogo da ECA recentemente descrito (26), ou, por ação das prolilendopeptidases (PEP) e prolilcarboxipeptidase (PCP) (27); 2. A ECA 2, é também capaz de converter a Ang I em Ang (1-9), a qual é posteriormente convertida em Ang (1-7) por ação da ECA ou da endopeptidase neutra (NEP); 3. uma terceira via envolve a ação das endopeptidases teciduais PEP e NEP as quais transformam a Ang I diretamente em Ang (1-7). A Ang (1-7) tem suas ações biológicas mediadas pelo receptor Mas, recentemente identificados (25).

1.3.2 Receptores do sistema renina angiotensina

As angiotensinas exercem suas ações biológicas através da ativação de seus respectivos receptores. As ações da Ang II são mediadas pelos receptores AT₁ e AT₂ (28) ao passo que os receptores Mas medeiam as ações da Ang (1-7) (25).

Os receptores AT₁ e AT₂ para Ang II foram clonados e farmacologicamente caracterizados no início dos anos 90, sendo ambos pertencentes ao grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (29–32). Os receptores AT₁ apresentam 7 domínios transmembrana acoplados a proteínas G, são os principais responsáveis pelos efeitos cardiovasculares da Ang II e altamente expressos em diversos órgãos durante toda a vida. Por outro lado, os receptores AT₂ são abundantemente expressos em tecidos fetal, sendo sua expressão muito baixa em tecidos dos indivíduos adultos. Ligando-se ao receptor AT₁, a Ang II promove a ativação da proteína G, a qual irá ativar a fosfolipase-C, que por sua vez, cliva o fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol, dando origem ao IP3 e ao DAG. O IP3 atua sobre receptores de IP3 localizados no retículo endoplasmático promovendo a ativação de canais de Ca²⁺ de modo a permitir um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺, essencial para a contração do músculo liso vascular. Por sua vez o DAG ativa a PKC, a qual promove ativação da bomba de Na⁺-H⁺, também contribuindo para o aumento do Ca²⁺ livre intracelular (15,33,34)

Originalmente, o receptor Mas foi descrito como um receptor órfão, acoplado à proteína G, com 7 domínios transmembrana e ação de proto-oncogenes (35). No entanto, estudos subsequentes indicavam o receptor Mas como um possível receptor angiotensinérgico (36). Apesar destes indícios, o ligante para o receptor Mas permaneceu desconhecido por vários anos e somente em 2003 identificou-se a

Ang (1-7) como o ligante específico dos receptores Mas, confirmando seu envolvimento com o SRA (Santos et al, 2003).

1.3.3 Ações do SRA circulante

Seguindo as evidências dos estudos pioneiros de TIGERSTEDT e BERGMAN (1898) (16), propôs-se inicialmente que o SRA era um sistema circulante hormonal fundamental ao controle da PA. De acordo com esta visão e devido ao desconhecimento de outros componentes do SRA a Ang II era considerada o único peptídeo biologicamente ativo do SRA, o qual agindo sobre receptores AT₁ localizados na musculatura lisa vascular promovia aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular desencadeando a contração da musculatura lisa vascular com consequente aumento da resistência vascular periférica e da PA (15,34).

As ações vasoconstritoras da Ang II são notadamente percebidas quando há alteração da volemia, um potente estímulo para ativação do SRA. Em resposta à redução na pressão de perfusão renal, ao reduzido conteúdo de NaCl que alcança as células da mácula densa bem como ao aumento da atividade nervosa simpática renal há a síntese e liberação de renina pelas células do aparelho justaglomerular, passo inicial na cascata de formação da Ang II (37–39).

As ações vasoativas da Ang II têm sido também investigadas através do bloqueio farmacológico de seu receptor. Utilizando-se antagonistas do receptor AT₁ observou-se redução significativa da PA (40). Embora a Ang II seja conhecida principalmente em razão de sua ação vasoconstritora por meio do receptor AT₁, sabe-se também que ao ligar-se aos receptores AT₂ a Ang II apresenta ações contrárias ao receptor AT₁ sendo capaz de promover vasodilatação (15,34,40).

Nos últimos anos vários outros peptídeos angiotensinérgicos com atividade biológica têm sido descritos. Nesta linha, destaca-se a Ang (1-7), peptídeo

biologicamente ativo do SRA que tem sido alvo de grande interesse por inúmeros grupos de pesquisa, em razão principalmente de suas ações antagonizarem as ações da Ang II (41). Demonstrou-se, por exemplo, que a Ang (1-7) promove o relaxamento em vários leitos vasculares, incluindo as artérias coronárias e cerebrais médias de cães, a vasculatura sistêmica de felinos, a arteríola aferente renal de coelhos, os anéis aórticos de ratos e os microvasos mesentéricos de ratos normotensos e hipertensos (42–44). Muitas das ações mediadas pela Ang (1-7) são atribuídas ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), ao ‘crosstalk’ entre Ang (1-7) e receptores B2 de bradicinina e receptores AT₂, e à ativação de prostanóides vasodilatadores. Demonstrou-se, por exemplo, que a Ang (1-7) promove o aumento do NO ao estimular a NO sintase, enzima-chave para o processo de geração de NO. A importância da bradicinina na vasodilatação à Ang (1-7) foi comprovada pelo bloqueio de seu efeito pelo HOE, um antagonista do receptor B2 (45). Outra via de ação da Ang (1-7) é através da estimulação da síntese de PGI₂, um prostanóide vasodilatador, o qual também participa das ações anti-proliferativas da Ang (1-7) nas células musculares lisas (46). Vale também destacar que o processo direto de formação de Ang (1-7) a partir da Ang II pela ação da ECA 2, tem como importante consequência a degradação da Ang II, de forma que além dos efeitos diretos da Ang (1-7) em potencializar a vasodilatação, também promove indiretamente redução da concentração e dos efeitos de Ang II (47)

1.3.4 Sistema renina angiotensina tecidual

Observações acumuladas ao longo das últimas duas décadas e possibilitadas pelo desenvolvimento de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia celular e molecular, evidenciaram a existência de SRA completo e operacional em diferentes tecidos como o coração, os rins, o leito vascular e o

encéfalo, o que veio renovar o interesse pelo estudo do SRA (13,47,48). A proposição da existência do SRA tecidual baseia-se principalmente na presença de RNAm bem como na expressão proteica dos componentes do SRA nos diferentes órgãos. Desta maneira, a visão contemporânea descreve o SRA como um complexo sistema hormonal e tecidual, que desempenha papel fundamental na manutenção de eventos locais relacionados ao controle estrutural e funcional nos diferentes órgãos, além da manutenção da PA e do equilíbrio hidroeletrólítico (39,49).

Uma vez que Aogen é o único precursor conhecido do SRA, a confirmação da presença tecidual do SRA independente do circulante tem como requerimento obrigatório a síntese local de Aogen, condição esta que foi confirmada pela presença de RNAm em 17 diferentes tecidos provenientes de ratos (50). Contemplado essa obrigatoriedade da presença do Aogen, evidências da presença de outros componentes do SRA corroboram a existência do SRA tecidual (13,51).

No coração, a produção local de Aogen foi identificada em todos os seus constituintes, sendo também confirmada em cultura de cardiomiócitos e fibroblastos (52). Embora a presença de renina no coração tenha sido observada em alguns estudos, sua origem tem sido questionada por alguns pesquisadores (53,54). Especula-se que a renina encontrada no coração tenha origem circulatória, a qual seria captada através de receptores pró-renina ou outras proteínas de ligação para a renina (55). Apesar desta controvérsia em relação à origem da renina cardíaca, há condições para a produção local de Ang I, que é clivada pela ECA, presente em fibroblastos cardíacos e em células endoteliais das coronárias, dando origem à Ang II (56). Além desta via clássica de formação da Ang II, o coração também expressa uma segunda enzima, a quimase, que é capaz de clivar Ang I em Ang II em

substituição às ações da ECA (57). Por sua vez os receptores AT_1 e AT_2 que medeiam as ações da Ang II também estão presentes no coração (58,59). A presença do homólogo da ECA, a ECA2 é outro componente do SRA também encontrado no coração, indicando a possibilidade de produção local de Ang (1-7) (26).

Embora o foco de nosso trabalho seja o SRA cardíaco e o circulante, a compreensão da dinâmica e peculiaridades do SRA em outros órgãos é importante para o entendimento integrado das diversas ações do organismo que contribuem para a manutenção da PA bem como da homeostase do organismo. Assim em sequência apresentaremos algumas evidências que confirmam a presença do SRA em outros órgãos bem como algumas particularidades de cada tecido. Componentes do SRA também são encontrados no território vascular. Recentemente demonstramos em hipertensos e normotensos a presença de Ang II e Ang (1-7) em diferentes artérias (aorta torácica, renal, femoral e carótida), sendo concentração de ambas proporcionalmente maior nos hipertensos e cerca de 30 vezes mais elevada na artéria renal em relação às demais artérias (60). Observamos também elevada expressão proteica de Aogen nas artéria renal quando comparada à femoral (60). Tanto a expressão do RNAm do Aogen como sua expressão proteica já haviam sido previamente relatadas no endotélio e músculo liso vascular (61,62). Também a ECA encontra-se presente em altas concentrações na adventícia e em cultura de células musculares lisas e endoteliais (62–64). Em relação à produção local de renina os estudos são ainda controversos; fato conhecido é a presença de receptores pró-renina nas células musculares lisas, as quais intermedeiam a captação de renina a partir da circulação. A presença destes componentes permite a produção local de Ang II, a qual atua preferencialmente em receptores AT_1 (61,65). A presença de Ang

(1-7) bem como do receptor Mas também já foram demonstrados no leito vascular, onde facilita a função endotelial e reduz a PA por aumentar os níveis de NO e diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (66–69).

Embora o rim seja essencial na produção da renina circulante que é secretada a partir das células justaglomerulares para o interstício renal e para a circulação, evidências sugerem a expressão renal de outros componentes do SRA (51). RNAm de renina foi também encontrado em células do túbulo proximal MOE et al., (1993), local em que foi identificada a produção de Aogen (70–72). A ECA está presente não só nas células endoteliais da vasculatura, mas também na membrana basolateral do túbulo proximal (73). Receptores AT_1 e AT_2 encontram-se amplamente distribuídos por todo o rim (membrana luminal e basolateral dos túbulos renais, células mesangiais, fibroblastos, células musculares lisas dos vasos renais (58,74). Nos rins também se observou a presença e a funcionalidade do eixo ECA 2 - Ang (1-7) - receptor Mas, uma vez que camundongos knockout para receptor Mas exibiam hiperfiltração e microalbuminúria (75) e camundongos knockout para ECA 2 desenvolviam glomerulosclerose, albuminúria e acelerada nefropatia diabética (76–78). Observou-se ainda que a redução local de Ang II e o paralelo aumento da Ang (1-7) (efeito atribuído à ECA 2) favorecia a hemodinâmica renal (43).

No sistema nervoso central trabalhos de nosso laboratório têm indicado a expressão e funcionalidade do SRA local não só em animais normotensos, mas principalmente em indivíduos hipertensos. Observou-se em 2 modelos de hipertensão (SHR e ratos submetidos à coarctação da aorta abdominal) aumento significativo da expressão de RNAm de Aogen e AT_1 nos núcleos do trato solitário (NTS), dorso-motor da vago, bulbo rostroventrolateral e paraventricular do hipotálamo, áreas sabidamente envolvidas com o controle autonômico da circulação

(79,80). Expressão aumentada de Aogen e AT_1 encontravam-se associadas ao aumento da PA, sendo acompanhados de disfunções do sistema cardiovascular como redução do ganho do nervo depressor aórtico, déficit da integração a nível do NTS, desequilíbrio simpato-vagal ao coração, prejuízo do reflexo barorreceptor e hipertonia simpática periférica (81–83). Interessante foi a observação de que a hiperatividade do SRA cerebral foi significativamente reduzida (79,80), assim como os déficits do controle cardiovascular foram corrigidos (parcial ou totalmente) pelo bloqueio crônico dos receptores AT_1 com losartan (81,83) ou treinamento aeróbio de baixa intensidade (79).

Atualmente não há dúvidas da existência do SRA nos diferentes tecidos e de sua importante contribuição na manutenção da homeostase do organismo. Deste modo, a visão contemporânea do SRA o descreve como um sistema hormonal e tecidual, que atua principalmente por meio da ação conjugada de dois eixos (47,84). O primeiro eixo é formado pela clássica via envolvendo *ECA–Ang II–receptor AT_1* , o segundo eixo compreendendo a *ECA 2–Ang (1-7)–receptor Mas*. Muitas das ações mediadas pelo eixo *ECA–Ang II–receptor AT_1* , estão amplamente consolidadas na literatura e sabe-se que elas se relacionam com efeitos vasoconstritores, proliferativos, migração celular; por outro lado o eixo *ECA 2–Ang (1-7)–receptor Mas* promove efeitos vasodilatadores e antiproliferativos, resultando em uma contra-regulação do SRA (47,84). O equilíbrio entre as ações destes dois eixos é de extrema importância para a manutenção das diversas ações fisiológicas do SRA que contribuem para a manutenção da homeostase de organismo. No entanto, a hiperatividade do SRA, associado ao desequilíbrio entre os eixos com predomínio do eixo *ECA–Ang II–receptor AT_1* , contribui significativamente para o desenvolvimento e

manutenção de doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão arterial (27,49,84).

1.3.5 Envolvimento do SRA no desenvolvimento e manutenção da HA

A hiperatividade do SRA, em especial do eixo ECA–Ang II–receptor AT_1 , encontra-se intimamente relacionada à hipertensão por ações desencadeadas em diversos órgãos e sistemas, levando a complicações cardiovasculares tanto em humanos como em diferentes modelos de hipertensão experimental (85). Nos vasos o aumento da expressão de Ang II encontra-se relacionado à hipertrofia/hiperplasia da musculatura lisa e ao remodelamento vascular, determinando maior razão parede/luz, o que aumenta a resistência local ao fluxo sanguíneo, contribuindo para a gênese/manutenção da hipertensão (86). No coração, a hiperatividade da Ang II está intimamente relacionada ao remodelamento cardíaco, acompanhado de respostas hipertróficas e fibróticas, o que pode conduzir à disfunção cardíaca (87,88). Nos rins, o aumento nos níveis de Ang II promove aumento da retenção de sódio (e conseqüentemente da PA), além de prejuízos funcionais e estruturais (89). Além disto, a importância do SRA renal na hipertensão é ressaltada pelo fato de que uma das isoformas da ECA - a de 90 kD, presente apenas em indivíduos hipertensos, foi identificada como um dos marcadores genéticos de hipertensão (90–93). Também no tecido cerebral a maior disponibilidade de Ang II (observada em indivíduos hipertensos e portadores de insuficiência cardíaca) encontra-se correlacionada à hipertonia simpática e aos efeitos deletérios dela advindos (94,95).

A comprovação de que parte dos efeitos deletérios da hipertensão sobre os vasos, coração, rins e cérebro são devidos à hiperatividade do SRA veio através de observações em que o bloqueio dos efeitos da Ang II (inibidores da ECA, bloqueadores receptores AT_1) era efetivo em corrigir parcialmente a hipertrofia

vascular, em reduzir o remodelamento cardíaco (96) e a disfunção renal (97–99) e em diminuir a expressão de Aogen e AT₁ em áreas cerebrais de controle autonômico simultaneamente à redução do tônus simpático ao coração e vasos (80,81). Interessante foi a observação de que no modelo de hipertensão por coarctação da aorta abdominal (em que a elevação da PA é mantida por um fator mecânico) a correção das disfunções cardiovasculares, após o bloqueio crônico dos receptores AT₁, era independente da alteração da PA, uma vez que ela era mantida elevada nos ratos coarctados tratados com losartan (80,83).

Em conjunto estas observações comprovam a hiperatividade do SRA na hipertensão e sugerem a importância da redução de sua atividade no controle da PA e na redução dos déficits funcionais. Neste contexto, a busca por medidas capazes de reduzir a atividade do SRA é de fundamental importância para reverter/minorar muito dos efeitos deletérios da hipertensão, contribuindo assim para a melhora da qualidade de vida e para a redução da morbi-mortalidade.

1.3.6 Remodelamento cardíaco: Relação entre SRA, estresse oxidativo e inflamação

O remodelamento cardíaco é um processo complexo que pode ser tanto fisiológico como patológico. Geralmente a hipertrofia fisiológica é observada em resposta a prática regular de exercício físico ou gravidez. Caracteriza-se pelo crescimento uniforme do septo e ventrículo esquerdo, e a nível celular observa-se a adição de sarcomeros em série o que resulta no aumento da câmara do VE, ou seja a hipertrofia excêntrica. Por outro lado, a hipertrofia patológica ou concêntrica, geralmente decorrente de sobrecarga pressórica, apresenta a adição de sarcomeros em paralelo culminando na redução do tamanho da câmara cardíaca (12,100).

Existe uma tênue linha que distingue o remodelamento cardíaco compensado do patológico a qual é influenciada por uma série de mecanismos celulares e moleculares que resultam em apoptose, necrose e hipertrofia dos cardiomiócitos bem como alteração da matriz extracelular e desequilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno, as quais podem ao final ter consequências fatais (12,101).

Embora a hiperatividade do SRA tenha grande influência no desenvolvimento do remodelamento cardíaco, cabe aqui ressaltar que em condições fisiológicas o SRA auxilia na manutenção da função cardíaca. Ao se ligar aos receptores AT₁, a Ang II tem potente efeito inotrópico positivo, mediado por seu papel no controle do transiente de Ca²⁺ durante o processo de contração cardíaca bem como na condutância elétrica nos cardiomiócitos (102,103). Este efeito é ainda potencializado pela facilitação da liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos que também apresentam expressão de receptores AT₁ (104)(105).

Apesar de o aumento da sobrecarga cardíaca decorrente do aumento da resistência vascular periférica ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca hipertensão arterial, o SRA influencia significativamente este processo (105). Além disso, muitas das ações do SRA no remodelamento cardíaco são devidas ao aumento do estresse oxidativo e inflamação desencadeadas pela Ang II (106).

Vários estudos suportam a constatação de que a elevação crônica de Ang II tem grande repercussão sobre as células miocárdicas, estimulando o crescimento dos cardiomiócitos, o acúmulo de matriz extracelular e a hipertrofia. A Ang II ao ligar-se aos receptores AT₁ promove seu acoplamento ao complexo de proteínas G, resultando na ativação de vias intracelulares, no aumento de processos proliferativos e inflamatórios, na síntese de colágeno e no aumento do estresse oxidativo (107).

Apesar da complexidade no estudo das vias de transdução de sinais, experimentos em modelos animais já demonstram que algumas das ações da Ang II via receptor AT1 são decorrentes da ativação das vias das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), tirosina quinases, PI3k/AKT, PKC, PKD e alguns receptores tirosina quinases (12,100,108). A ativação destas vias de sinalização intracelular tem como resultado a fosforilação de múltiplos alvos intracelulares, como os fatores de transcrição (NFkB, NFAT, STAT, GATA 4, CREB) que são capazes de alterar a expressão de inúmeros genes regulatórios dos constituintes cardíacos (12,100,108).

Análises histológicas confirmam que a infusão de Ang II cronicamente por 14 dias é capaz de aumentar significativamente a expressão gênica e proteica de colágeno I, colágeno III, CTGF e TGF- β em camundongos *wild-type* (109). Aumento na deposição de colágeno é também observado no modelo de hipertensão espontânea (SHR) quando comparados aos WKY, seus controles normotensos (110). Além disso, a produção de metaloproteinases, enzimas envolvidas na degradação de colágeno é modulada pela Ang II (111). Outros marcadores do remodelamento cardíaco são as alterações significativas na expressão dos genes α -MHC, β -MHC, α -actina, BNP e ANP, observadas tanto no modelo SHR como em resposta à infusão de Ang II (12,110,112,113). A hipertrofia cardíaca nestes modelos experimentais é confirmada pelo aumento da razão ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia e/ou peso corporal e pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos (12,110).

Apesar da Ang II ativar diretamente as vias envolvidas na hipertrofia cardíaca muito dos seus efeitos são mediados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). O efeito pró oxidativo da Ang II se dá principalmente através da ativação do sistema NADH/NADPH, que tem como consequência aumento da produção de espécies

reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (114). De fato, a atividade da NADPH e a produção de EROs encontram-se elevadas em ratos SHR bem como em modelos de hipertensão por infusão de Ang II (115–117). Assim como Ang II, as EROs são importantes moléculas sinalizadoras capazes também de ativar as vias das MAPK, de fatores de transcrição como o NF-kB, NFAT e assim alterar o padrão de expressão de genes relacionados a estrutura cardíaca entre outros (118).

Outra condição observada na hipertensão arterial é o elevado perfil inflamatório, associado ao aumento tanto circulante como tecidual de citocinas pró-inflamatórias (119,120). Inflamação de baixo grau de fato caracteriza a hipertensão espontânea, uma vez que SHR apresentam aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL1- β , IL6 e TNF α) circulantes e teciduais (121). Aumento da inflamação é também observado no coração dos SHR, como confirmado pela elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias IL1 β e TNF α , as quais são acompanhadas por aumento da fosforilação do NF-kB (122). O aumento de citocinas pró-inflamatórias é também atribuído às ações da Ang II; além disso, a presença de hipertrofia cardíaca associada a estes fatores sugere o envolvimento da inflamação no remodelamento deletério do coração induzido pela Ang II (123,124)

Por outro lado, o eixo ECA2-Ang (1-7)-receptor Mas confere proteção ao coração prevenindo o estresse oxidativo, inflamação e o remodelamento cardíaco descompensado (125). Parte dos efeitos cardioprotetores deste eixo tem sido atribuído à formação de Ang (1-7) por ação da ECA 2, que tem como consequência a degradação e a redução da biodisponibilidade da Ang II (126,127). Além disso, a ausência de hipertrofia de cardiomiócitos e de fibrose em ratos tratados com Ang (1-7) durante infusão crônica de Ang II suportam o efeito direto da Ang (1-7) na

proteção cardíaca (128). Adicionalmente, a função cardíaca de ratos, submetidos ao infarto do miocárdio associado à infusão de Ang (1-7) durante 8 semanas iniciada 2 semanas após o infarto, encontra-se preservada (129). Os efeitos da Ang (1-7) são também observados em experimentos *in vitro* onde a hipertrofia de cardiomiócitos em resposta à endotelina foi bloqueada pela presença de Ang (1-7) (130). A presença dos receptores Mas demonstra ser crucial na prevenção da deposição de colágeno e fibronectina uma vez que estes componentes encontram-se aumentados em camundongos deficientes para o receptor Mas (131). Embora os mecanismos de ação da Ang (1-7) não estejam completamente elucidados, atribui-se à Ang (1-7) ações anti-inflamatórias uma vez que a hiperexpressão de Ang (1-7) no coração de ratos submetidos a infarto do miocárdio foi acompanhado de baixos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (132). O efeito protetor da Ang (1-7) é também atribuído à sua ação inibitória das vias de sinalização das MAPK (ERK 1/2, P38 MAPK, JNK), JAK/STAT e PKC (133–135). Além disso, a Ang (1-7) confere ao coração proteção antioxidante por reduz a produção de EROs (133,136,137). Assim, a Ang (1-7), atuando de maneira contra-regulatória à Ang II, previne o remodelamento cardíaco descompensando reduzindo a hipertrofia dos cardiomiócitos, a deposição de colágeno e a fibrose (125,136,138).

1.3.7 Utilização do treinamento aeróbio no tratamento da hipertensão arterial: envolvimento do SRA.

A hipertensão é uma doença que exige tratamento contínuo, incluindo abordagens farmacológicas e não farmacológicas, que não são exclusivas. O tratamento medicamentoso envolve a utilização de diuréticos, vasodilatadores, atenuadores do sistema simpático, bloqueadores de canais de cálcio e os inibidores do SRA, como os inibidores da própria renina e da ECA, além de bloqueadores dos

receptores de Ang II (1,13). Por outro lado abordagens não farmacológicas envolvem mudanças no estilo de vida dentre as quais destaca-se a prática regular de exercício físico aeróbio de baixa a moderada intensidade (139).

Análises de correlação entre atividade física diária e risco de comprometimento cardiovascular na hipertensão arterial demonstraram que, independente de gênero, quanto mais treinado o indivíduo menor é o risco de apresentar hipertensão arterial e suas complicações (140). De fato, o treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade tem sido amplamente indicado como importante terapia coadjuvante no tratamento da hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares (139). Embora não se conheçam precisamente os mecanismos que modulam os efeitos benéficos do treinamento em hipertensos, diversos trabalhos têm demonstrado sua potencialidade na redução dos níveis de PA no homem (1,139) e em diferentes modelos de hipertensão, como os ratos SHR (considerados o melhor modelo de hipertensão primária do homem), além de reverter/minorar muitos dos déficits cardiovasculares induzidos pela hipertensão (9,10,60,141–145).

Trabalhos de nosso laboratório têm demonstrado que o treinamento aeróbio é uma conduta eficaz para reduzir a expressão/atividade do eixo ECA–Ang II–receptor AT_1 . Submetendo ratos SHR e WKY a um protocolo de treinamento aeróbio de baixa intensidade durante um período de 12 semanas, Felix e Michelini (2007) (79) e Chaar et al (2015) (94) observaram bradicardia de repouso, redução da PA e de sua variabilidade e aumento da variabilidade da FC (vs. respectivos controles sedentários) que foram nos SHR treinados acompanhados de completa normalização da expressão gênica/proteica do Aogen em áreas autonômicas de controle cardiovascular. Importante foi a observação de que a redução do conteúdo

de Aogen nas áreas pré-autonômicas dos SHR treinados correlacionava-se com a redução do simpático vasomotor, com a redução do balanço simpato-vagal ao coração e com a queda parcial da PA observadas após treinamento (79,94).

Em trabalho recente analisamos os efeitos sequenciais do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre o conteúdo de angiotensinas [Ang I, Ang II e Ang (1-7)] em artérias renais, carótidas, femorais e torácicas de ratos SHR e WKY (60). No início dos protocolos (semana 0) o conteúdo de Ang II dos SHR vs WKY era mais elevado nas artérias renais, femorais e carótidas, mas semelhante na aorta torácica; já o conteúdo de Ang (1-7) era inferior nas renais e femorais dos SHR vs WKY e semelhante nas carótidas e aorta torácica. Desta forma, a razão Ang II/Ang (1-7) mostrava-se mais elevada nas artérias renais, femorais e carótidas indicando o predomínio do eixo ECA-AngII-receptor AT_1 nas artérias musculares de hipertensos em detrimento ao eixo ECA2-Ang (1-7)-receptor Mas (60). Estes dados mostrando grande variação no conteúdo endógeno de Ang II e Ang (1-7) entre os diferentes segmentos arteriais confirmam observações anteriores da grande importância do eixo vasoconstritor no tecido renal (146,147). De grande interesse foi a observação de que o treinamento aeróbio promoveu, já ao término da 1ª semana, redução significativa do SRA vascular de hipertensos: o conteúdo de Ang II mostrava-se reduzido nas renais, carótidas, femorais (e mesmo na aorta torácica), com quedas adicionais nas semanas subsequentes em alguns segmentos. Também o conteúdo de Ang (1-7) dos SHR treinados foi reduzido a partir da 1ª semana, confirmando nossas observações anteriores sobre o efeito primordial do treinamento em reduzir a disponibilidade do Aogen, o precursor da síntese de todas as angiotensinas(79,94). A análise da razão AngII/Ang(1-7) indicou que o treinamento reduziu similarmente o conteúdo de Ang II e Ang (1-7) nas femorais, carótidas e aorta dos SHR, sem alterar

o balanço, mas nas artérias renais houve queda mais acentuada do conteúdo de Ang II, com redução significativa da razão AngII/Ang(1-7), indicando que neste tecido o treinamento alterou o balanço entre os eixos, favorecendo proporcionalmente mais a atividade do eixo ECA 2-Ang (1-7)-receptor Mas. Este efeito diferencial do treinamento antecedia a queda parcial da PA, indicando que a redução da vasoconstrição renal nos SHR treinados favorecia a perfusão renal e a queda da PA (60). O treinamento também foi eficaz em reduzir o conteúdo de Ang II e Ang (1-7) nos WKY, mas mais tardiamente e sem alterar em nenhum dos segmentos vasculares o balanço entre Ang II/Ang (1-7) e os níveis pressóricos. A redução da razão Ang II/Ang (1-7) nas renais de SHR e a subsequente queda da PA apenas neste grupo sugeria uma possível relação causa-efeito, ou seja, que a redução da atividade do SRA vascular contribuía (ao lado de outros efeitos) para a redução da PA subsequente ao treinamento.

Pelo exposto depreende-se que o treinamento aeróbio de baixa intensidade é um importante modulador da expressão/atividade do SRA vascular. É bastante provável que o treinamento também module a expressão/atividade do SRA em outros territórios, como por exemplo, o coração, os rins e o próprio SRA plasmático (49). Apesar de alguns estudos na literatura já terem demonstrado efeitos benéficos do treinamento sobre o SRA circulante e cardíaco (148,149), lacunas no conhecimento existem e muitos pontos precisam ser melhor esclarecidos. Gomes Filho et al (2008) e Zamo et al (2011) (148,149) demonstraram que SHR submetidos a treinamento de natação por 8 semanas apresentavam aumento nos níveis de Ang (1-7) e de receptores Mas no ventrículo esquerdo, redução nos níveis de Ang II circulante e queda da PA sem alteração da hipertrofia cardíaca. No entanto, desconhecem-se os mecanismos intracelulares que condicionam estas respostas. É

nossa hipótese de trabalho que o treinamento possa alterar o balanço entre os eixos vasoconstritor e vasodilatador do SRA no plasma e coração dos SHR e desta forma alterar a sinalização intracelular no miócito cardíaco modificando a atividade da NADPH oxidase, a produção de EROS, a ativação de fatores de transcrição e a expressão gênica e a síntese proteica de diversos genes envolvidos na geração do perfil inflamatório e oxidativo assim como no remodelamento cardíaco. A proposta do presente trabalho é justificada pela grande potencialidade do treinamento aeróbio em modular positivamente as ações do SRA, promovendo relevantes ajustes que determinam a queda parcial da PA e a prevenção de lesão em órgãos alvos nos hipertensos assim como a melhora da função cardíaca contribuindo para a reversão dos efeitos deletérios da hipertensão.

2 OBJETIVOS

Neste projeto avaliamos a sequência temporal das respostas cardiovasculares simultaneamente à sequência temporal de alterações dos diferentes componentes do SRA plasmático e cardíaco de SHR e WKY submetidos ao treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade ou mantidos sedentários. Avaliamos também as repercussões das alterações do SRA plasmático e tecidual sobre o perfil inflamatório e o estresse oxidativo e sobre os mecanismos que influenciam o processo de remodelamento cardíaco. São nossos objetivos específicos:

- A – Avaliar os efeitos sequenciais (semanas 0, 1, 2, 4 e 8) do treinamento aeróbio e sedentarismo sobre os valores basais de PAM e FC;
- B – Quantificar, nos mesmos tempos experimentais, através da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), o conteúdo de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no coração e plasma;
- C – Avaliar no ventrículo esquerdo de SHR e WKY sedentários e treinados a expressão proteica dos receptores AT₁, AT₂ e Mas;
- D – Analisar no coração dos mesmos grupos experimentais os efeitos sequenciais do treinamento sobre enzimas pró- e anti-oxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio;
- E – Avaliar no ventrículo esquerdo de SHR e WKY sedentários e treinados a expressão gênica de citocinas pró- e anti-inflamatórias;
- F – Analisar nos SHR e WKY os efeitos sequenciais do treinamento ou sedentarismo sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo e sobre marcadores de hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, com aproximadamente dois meses de idade pesando entre 200-250 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Metade dos animais de nosso grupo experimental foi composta por ratos normotensos da linhagem Wistar-Kyoto (WKY) e a outra metade por animais hipertensos da linhagem Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). Durante todo o período experimental os animais foram alojados em caixas plexigas (cinco por caixa) no Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 e 23 °C), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e alimentação. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEEA) do ICB registrado sob o número 188 nas folhas 115 do livro 2 para uso de animais de experimentação.

3.2 Protocolo de Treinamento Físico

O protocolo de treinamento físico (corrida) foi realizado em esteira ergométrica (Inbramed, Mellennium) adaptada para ratos. A esteira é constituída de 10 (dez) raias de alumínio com tampas de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente escuro para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. Estas modificações facilitam o treinamento dos ratos evitando o uso de choques elétricos.

a) Período de adaptação

Duas semanas iniciais foram destinadas à adaptação dos animais ao protocolo experimental: a primeira semana foi destinada à adaptação ao novo ambiente (Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica), e a segunda ao treinamento na esteira (cinco sessões de 0,4-0,6 km/h, 0% inclinação, 10 minutos/dia). Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo.

b) Teste de esforço máximo

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada individualmente e de forma indireta através de protocolo de teste esforço máximo escalonado em esteira ergométrica. O protocolo do teste consiste em estágios escalonados com duração de 3 minutos cada, com o primeiro estágio iniciando-se à velocidade de 0,3km/h, seguido de incrementos sucessivos de 0,3 km/h a cada 3 minutos. Os estágios prolongam-se até o ponto de exaustão do animal quando o teste é suspenso. O tempo/velocidade máxima atingidos foram considerados para o cálculo da capacidade aeróbia máxima de exercício.

O teste de esforço máximo foi realizado três vezes para cada animal durante o protocolo experimental: no início (semana zero) e nas semanas 4 e 8 do treinamento ou sedentarismo. O primeiro teste serviu para a alocação dos animais aos grupos treinados ou sedentários de maneira que ambos iniciassem o treinamento de um mesmo nível de desempenho físico e serviu também para se determinar a velocidade de treinamento. O segundo teste teve por objetivo identificar a nova capacidade máxima e readequar a velocidade de treinamento e o terceiro teste serviu para a avaliação comparativa dos efeitos do treinamento entre os grupos.

c) Formação dos grupos experimentais:

Com base nos testes de esforço máximo, WKY e SHR foram divididos em dois grupos: sedentários (S) e treinados (T), de modo que ambos os grupos iniciassem o treinamento de um mesmo nível de desempenho físico. Os grupos S foram acompanhados semanalmente e submetidos aos protocolos experimentais nas semanas 0 (S0) e 8 (S8), prestando ao controle temporal das variáveis experimentais. Por sua vez os grupos T foram submetidos aos protocolos experimentais nas seguintes semanas: T₀ – animais na semana 0; T₁ – animais após 1 semana de treinamento; T₂ – animais após 2 semanas de treinamento; T₄ – animais após 4 semanas de treinamento; T₈ – animais após 8 semanas de treinamento. Considerando-se os grupos WKY e SHR, foram formados, portanto, 12 subgrupos experimentais.

d) Protocolo de treinamento ou sedentarismo:

O protocolo de treinamento físico consistiu em sessões de exercício aeróbio, de intensidade moderada (50 – 60% da intensidade máxima alcançada no teste de esforço). A velocidade de treinamento foi determinada por uma combinação da velocidade e tempo de exercício, sem inclinação da esteira, de forma a atingir a intensidade estabelecida. A velocidade de treinamento correspondeu a 50 – 60% da velocidade máxima, sendo corrigida na semana 4 de acordo com os testes máximos. Cada sessão teve a duração de uma hora, sendo realizada uma vez por dia, 5 vezes na semana durante o período máximo de 8 semanas. Os animais do protocolo de sedentarismo foram mantidos sedentários por igual período de tempo, ou seja 8 semanas.

3.3 Registro direto da PA e FC

a) Confecção 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, a qual foi soldada, por aquecimento, à parte distal de maior calibre (diâmetro interno: externo = 0,50:1,50 mm) com aproximadamente 17 cm de comprimento. As cânulas foram preenchidas com salina (0,9 %) e ocluídas com pino de metal.

b) Implantação da Cânula Arterial

Para o processo cirúrgico de implantação da cânula, os ratos foram anestesiados com 100 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina. Uma incisão foi realizada na região ventral na altura da articulação coxo-femoral, para localização do tronco vâsculo-nervoso e isolamento da artéria femoral onde foi introduzida e fixada a parte mais fina da cânula de Tygon. A extremidade mais grossa foi exteriorizada através do espaço subcutâneo na região cervical dorsal e fixada com fio de algodão. Após a cirurgia os ratos receberam uma dose profilática de antibiótico (24.000 UI/Kg Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge, s.c.) e analgésico (2 mg/Kg ketoprofeno – Merial, s.c.) sendo em seguida alocados em caixas individuais, em sala com temperatura, umidade e luminosidade controladas com água e ração ad-libitum, até a realização dos experimentos no dia seguinte.

c) Registro Simultâneo da PA e FC

Todos os registros dos parâmetros funcionais foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação e obtidos no mínimo 24 horas após a canulação arterial. A PA (pulsátil e média) e FC foram registradas diretamente na

artéria femoral, via cânula implantada na femoral direita, conectada a um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs, Lakewood, CO, USA), o qual estava acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) e este a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália). A frequência de amostragem para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos foi de 2000 Hertz. Os valores de PAP, PAM e FC foram analisados *off-line*. Para obtenção desses valores, aguardamos o tempo necessário (15-30 min) para o desaparecimento da atividade exploratória do animal. Os registros basais propriamente ditos (30 minutos) só foram iniciados após a estabilização dos níveis de PA e FC.

3.4 Coleta dos tecidos e sangue

Após os registros funcionais foi retirado 2 mL de sangue de cada animal através da cânula implantada na artéria femoral esquerda. Na sequência os animais foram profundamente anestesiados (300 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 60 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina). Imediatamente após perda dos reflexos, o tórax foi aberto e o coração exposto para realização de perfusão transcardíaca. Os animais foram perfundidos, via ventrículo esquerdo, com solução de KCL 14 mM em salina estéril e tamponada (~ 5 minutos). A perfusão foi realizada sob pressão semelhante à registrada nos animais conscientes. Após a perfusão o coração foi extraído acondicionado em papel alumínio devidamente identificado e mantido em gelo seco. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização.

3.5 Quantificação das Angiotensinas plasmáticas e teciduais

Foram quantificadas Ang I, Ang II e Ang (1-7) no plasma e VE de ratos SHR e WKY treinados e sedentários. A quantificação das angiotensinas foi realizada a partir de homogenatos destes tecidos utilizando-se da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). As amostras de plasma adicionou-se tampão de inibidores de proteases (Complete Mini, Roche) como recomendado pelo fabricante.

A extração das angiotensinas foi realizada em colunas Oasis C₁₈ previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura etanol/ácido acético/água na proporção 90%/4%/6%. Os eluatos foram então liofilizados, redissolvidos em 500 µL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico) e filtrados com membrana 0,22 µm para serem analisados por HPLC. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 µ, utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC em sistema da Milton Roy constituído de duas bombas constaMetric 3000, um detector de UV spectroMonitor 3100, um programador GM 4000 e um misturador. Utilizou-se padrões sintéticos como calibradores e a detecção dos peptídeos foi feita em absorbância de 214 nm. Os resultados das angiotensinas plasmáticas foram expressos em pmol/ml e corrigidos pelo volume total de plasma enquanto que as angiotensinas do VE. Os cálculos foram efetuados a partir de uma curva padrão de concentração conhecida

3.6 Western Blot

3.6.1 SDS PAGE

As amostras foram pulverizadas em almofariz de porcelana e pistilo, homogeneizadas e incubadas por 30 minutos em 400 μ L de tampão de lise (Triton-X-100 1%, Tris 100 mM pH 7.4, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml) em gelo. Os extratos teciduais foram centrifugados (10.000 g - 4 °C - 30 min.) para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e utilizado para quantificação do conteúdo protéico total, utilizando o método de Pearce BCA (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitól, 200 mM). Foram utilizadas 50 μ g de proteína de cada amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, EUA). Em cada gel foi aplicado também um marcador com peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel de poliacrilamida foi feita eletricamente com sistema molhado (BioRad, Hercules, EUA) para uma membrana de nitrocelulose, por 2 hora a 100 volts.

3.6.2 Immunoblotting

As membranas utilizadas foram incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado em pó a 5% ou albumina sérica bovina -BSA- 5%) durante 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos a membrana. Imediatamente após o bloqueio as membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse overnight a 4 °C em agitação. Na sequência, as membranas foram lavadas com solução basal durante 30 minutos, sendo a solução trocada a cada 10 minutos. As membranas foram então incubadas por uma hora, em

temperatura ambiente, em agitação com anticorpo secundário marcado com peroxidase anti-rabbit [*ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody from donkey (Amersham Pharmacia, UK)*]. O procedimento de lavagem foi repetido novamente e após esse procedimento, as membranas foram incubadas com solução quiluminescente, como descrito no protocolo do kit (Super Signal West Pico). Posteriormente as membranas foram expostas durante tempos variados em filmes de raio-X, os quais após revelados, foram submetidos à análise de densitometria óptica utilizando o software Image J. Os valores obtidos em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à proteína de interesse, foram normalizados pelos valores obtidos pela marcação do PONCEAU.

3.7 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada pelo método da Dihidroetidina (DHE) (Invitrogen, Brasil). O DHE quando oxidado dá origem a 2 produtos fluorescentes com afinidade pelo DNA nuclear, o etídeo (E) e o 2-hidróxietídeo (EHO), que podem ser quantificados. Após coleta a fresco, os corações foram submersos em meio para congelamento (OCT Compound) e mantidos a -80 °C até o processamento. Cortes transversais foram obtidos em criostato (16 µm, Leica, Alemanha) à temperatura de -25 °C e arranjados em lâminas recobertas com poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Os cortes circundados com caneta hidrofóbica, foram incubados com tampão fosfato (PB 0,1 M), a 37 °C em câmara úmida por 10 minutos para hidratação. Foram a seguir incubados em solução de DHE (5 µM) contendo PB (0,1 M) e DTPA (100 µM), e mantidos em estufa aquecida a 37 °C por 30 minutos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Leica), equipado com filtro para rodamina e câmara fotográfica (Leica), utilizando-se objetiva para fluorescência. Para a quantificação da geração de

EROs foram utilizados 4 áreas por corte, 3 cortes por ventrículo esquerdo, observando-se a integridade da musculatura cardíaca e a marcação nuclear das células. Para se determinar a intensidade óptica da marcação de EROs utilizou-se o programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos). A densidade óptica de cada VE (expressa em unidades arbitrárias, UA), correspondeu à média dos 12 quadrantes analisados.

3.8 PCR em tempo real

Após coleta a fresco parte do ventrículo esquerdo foi armazenada em tubo estéril, imediatamente congelada e armazenadas a -80 °C para a análise da expressão gênica por meio da técnica de PCR em tempo real.

Os RNAs totais de cada amostra foram extraídos utilizando o método de Trizol (*TRIZOL® Reagent*, Invitrogen Brasil, Cat. No. 15596-026 Carlsbad, Califórnia, EUA) segundo manual do fabricante. A cada amostra foi adicionado 500 µl do reagente trizol e procedeu-se a homogeneização no *Precellys® 24*. Foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma no. Cat. C1062.01.BJ) seguido de agitação (15-20 s), e incubação a temperatura ambiente por 3 min. Após centrifugação (15 min a 4 °C) a fase superior contendo RNA total foi aspirada e transportada para tubo estéril. A cada amostra foi acrescentado 500 µL de álcool isopropílico (SIGMA no. Cat. A1078.01.BJ) e adicionado 500 µL de álcool etílico a 75% (Sigma no. Cat. A1084.01.BJ), seguida de nova centrifugação (7500 RPM por 5 min a 4 °C). O sobrenatante foi desprezado e ao tubo (temperatura ambiente) foram acrescentados 18 µL de água DEPC para solubilização do corpo de fundo. O tubo foi incubado em banho seco a 65 °C por 10 minutos e armazenado em freezer -80 °C. O RNA obtido foi quantificado no *NanoDrop (Thermo Scientific)* nos comprimentos de onda de 260, 230 e 280 nm.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) amostras de 1µg de cada RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa. Primeiramente as amostras foram tratadas com DNase I, *Aplification Grade* (Cat. No. 18068-015, *Invitrogen™ Carlsbad*, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo padrão do fabricante. Para transcrição reversa foi utilizado o *kit ImProm II, Transcriptase Reverse* (Cat. No. A3802, Promega, Madison, WI, EUA), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. No processo de síntese do DNA complementar foram ainda utilizados *primers* randômicos (*Random Primers*, No Cat. 48190-011, *Invitrogen™ Carlsbad*, Califórnia, EUA) e dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados, No Cat. 10297-018, *Invitrogen™ Carlsbad*, Califórnia, EUA) e RNase Out (No Cat. 10297-018, *Invitrogen™*, Carlsbad, Califórnia, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C.

A expressão do RNAm foi estimada pelo PCR semi-quantitativo em tempo real (*Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System*), utilizando-se a coloração pelo 'SYBR Green', que segue o princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e a enzima KAPA (Cat. No. KK4603, SciencePro, Boston, Massachusetts, EUA). Os resultados das reações de PCR em tempo real foram analisados pelo software Excel (Microsoft). O gene endógeno, ou constitutivo, 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 pelo treinamento físico e nem pela idade do animal. Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante e os *primers* utilizados específicos para cada gene (Quadro 1), foram desenhados pelos programas Primer3 Plus (Bioinformatics) e Primer Premier 5.0 (*Biosoft International*), levando-se em consideração o tamanho dos *primers*, a temperatura de anelamento, a porcentagem de guanina e citosina, a possibilidade

de formação de *hairpine* e falsos *primers*, além do posicionamento em diferentes éxons.

Quadro 1 - Sequencia de primers utilizados na análise da expressão de RNAm por RT-PCR

Gene	Primer FW	Primer RW
NOX2	ACCCTTTCACCCTGACCTCT	TCCCAGCTCCCCTAACATC
NOX4	CCAGAATGAGGATCCCAGAA	AGCAGCAGCAGCATGTAGAA
SOD	TTGGAGACCTGGGCAATGT	TCCACCTTTGCCCAAGTCA
NQO1	TCAGCGCTTGACACTACGA	TCTTCAGAGCCTCCACAGC
Catalase	GGCTCACACACCTTCAAGC	TGTGCAAGTCTTCTGCCT
GpX	AGTGCGAGGTGAATGGTGA	ACTTGGGGTTCGGTCATGAG
TNF- α	TGCCTCAGCCTCTTCTCATT	CCCATTTGGGAAGTCTCCT
IL-1 β	CTGTGACTCGTGGGATGATG	GGGATTTTGTGCTTGCTTGT
IL-10	CCTGCTCTTACTGGCTGGAG	TGTCCAGCTGGTCCTTCTTT
α -MHC	CACCAACCTGTCCAAGTTCC	ATCGTGGATTTTCTGCTTGG
β -MHC	AAACTGAAAACGGCAAGACG	TGACGGTGACACAGAAGAGG
α -actina	GTCGGTATGGGTCAGAAGGA	TGTCGTCCCAGTTGGTGATA
ANP	AGGGCTTCTTCTTCTTCTG	CCAGGTGGTCTAGCAGGTTT
Col I	TTGACCCTAACCAAGGATGC	CACCCCTTCTGCGTTGTATT
Col III	AACGTGGCTCTAATGGCATC	CATCTTTTCCAGGAGGTCCA
MMP2	AGCTCCCGGAAAAGATTGAT	TCCAGTTAAAGGCAGCGTCT
TIMP1	CATGGAGAGCCTCTGTGGAT	ATGGCTGAACAGGGAAACAC
TIMP2	TCCCCAGAAATCATCGAGAC	TCAGATTATGCCAGGGAACC
HPRT	TTTTGCTGACCTGCTGGATTAC	TACTTTTATGTCCCCCGTTGA

Legenda: SOD – superóxido dismutase; NQO1 – NAD(P)H quinona desidrogenase 1; Catalase; GPX – glutationa peroxidase; PRDX – peroxirredoxina ; TRX - tiorredoxina; TNF- α – fator de necrose tumoral alpha; IL-1 β – interleucina-1beta ; IL-10 – interleucina-10; α -MHC – alpha miosina de cadeia pesada; β -MHC – beta miosina de cadeia pesada; α -actina – alpha actina; ANP – peptide natriurético atrial ; Col I – colágeno I; Col III – colágeno III; MMP2 - metaloproteinase de matriz 2; TIMP1 - inibidor tecidual de metaloproteinases 1; TIMP2 - inibidor tecidual de metaloproteinases 2; HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase.

3.9 Análise do remodelamento cardíaco

Após perfusão, os corações foram removidos para análise da hipertrofia e deposição de colágeno. Os corações e os ventrículos esquerdo (VE) (parede livre do VE e septo) foram pesados (peso úmido). Posteriormente o ápice e a base dos VE foram removidos e a região central remanescente, foi imersa em solução fixadora de formalina 4% por 24 horas e mantida em geladeira. Após o período de fixação procedeu-se a desidratação dos VE os quais foram submetidos a banhos sucessivos durante 15 minutos cada em álcool 70%, 85%, 95% e 100%. Na sequência os tecidos foram imersos em xilol por 3 vezes consecutivas durante 7 minutos cada imersão. Após a desidratação os VE passaram por 3 banhos sucessivos de parafina e emblocados. Os blocos foram cortados em micrótomo de parafina, com uma espessura 5 micrômetros (μm) e estendidos em lâminas de vidro. Após secagem as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, através de 3 banhos sucessivos de 10 minutos cada um em xilol seguido por banhos sucessivos de 5 minutos cada em álcool (100%, 95%, 85%, 50%) e imersos em água por 5 minutos. Na sequência processou-se a coloração por hematoxilina-eosina ou picrossirius red para análise da hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno descritos a seguir.

3.9.1 Análise da hipertrofia cardíaca

Após hidratação parte das lâminas foi destinadas a coloração com hematoxilina-eosina para análise do diâmetro dos cardiomiócitos. Inicialmente as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina por 3 minutos. Na sequência as lâminas foram banhadas em água destilada, lavadas em água corrente por 5 minutos, imergidas brevemente (8 a 12 vezes) em etanol ácido, lavadas em água corrente por 1 minuto e água destilada por mais 2 minutos. Posteriormente as

lâminas foram mergulhadas em eosina por aproximadamente 1 minuto e mergulhadas em álcool 95% durante 5 minutos. As lâminas foram então reidratadas por meio da imersão em cubas contendo álcool etílico nas concentrações de 100%, 95%, 85%, 50% durante 15 minutos em cada cuba. Em seguida, as lâminas foram imersas em xilol em uma sequência de 3 banhos de 30 minutos cada. Ao final as lâminas foram fechadas com lamínula e Permount.

Após a montagem das lâminas procedeu-se a captura das imagens em microscópio óptico de campo claro com magnitude de 40 X acoplado a um software de captura de imagens (KS-300, ZEISS). Para a análise do diâmetro dos cardiomiócitos foram selecionados miócitos com núcleo visível e membrana celular intacta. A medição do diâmetro de cada cardiomiócito foi realizada na porção central do núcleo em aproximadamente 22 campos visuais por amostra totalizando aproximadamente 80 cardiomiócitos por coração. Para esta análise utilizamos o software *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos)

A hipertrofia cardíaca foi também avaliada a partir da relação entre o peso do VE pelo peso corporal (PC) do rato (VE/PC - mg/g) bem como pelo peso do VE pelo comprimento da tíbia (CT) (VE/CT - mg/mm).

3.9.2 Análise da deposição de colágeno

Para a análise da deposição de colágeno, depois de hidratadas, as lâminas foram coradas com picrossirius red (0,1 g de Sirius red em 100 mL de solução saturada de ácido pícrico). Inicialmente as lâminas foram imersas por uma hora em picrossirius. Na sequência as lâminas foram lavadas em água corrente por 3 minutos. Em seguida as lâminas foram mergulhadas brevemente em cubas contendo álcool etílico nas concentrações de 95%, 100% e por fim solução de álcool

e xilol (concentração: 1:1). As lâminas foram então transferidas para outra cuba também com álcool e xilol (concentração: 1:1) onde permaneceram mergulhadas durante 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram mergulhadas em cubas contendo apenas xilol onde permaneceram por 10 minutos. Por fim as lâminas foram fechadas com lamínula e Permount (Fisher Scientific, Fair Law, New Jersey, USA).

Ao término do processo de montagem das lâminas, as imagens foram capturadas em microscópio óptico de campo claro com magnitude de 20X acoplado a um software de captura de imagens (KS-300, ZEISS). As análises foram realizadas em 5 campos por corte totalizando 20 campos. Após digitalizadas as imagens foram avaliadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos) que identifica as fibras colágenas de coloração vermelha gerando a porcentagem da área total preenchida desta coloração no campo analisado. A taxa média de colágeno por região foi obtida por meio da razão entre a medida da área preenchida por fibras colágenas pela superfície total da área realizada automaticamente pelo software ImageJ.

3.10 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm EPM. O desempenho em esteira foi analisado pela ANOVA de 2 fatores (grupo e condição) para medidas repetidas. Os efeitos do treinamento e do sedentarismo sobre as variáveis analisadas foram avaliadas pela ANOVA fatorial (fatores grupo e tempo) para as análises seqüenciais. O teste *post hoc* foi o de *fischer*. Para estas análises foi utilizado o software SATATISTIC 7.0 (Stat Soft Inc.). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Alterações sequenciais do peso corporal em WKY e SHR sedentários e treinados

Como mostrado na Figura 2, ao início dos protocolos SHR-S₀ e WKY-S₀ apresentaram o mesmo peso corporal (aproximadamente 260g). Houve durante as 8 semanas experimentais aumento progressivo de peso corporal nos SHR e WKY, tanto treinados quanto sedentários. Não houve diferença de peso corporal entre os 4 grupos experimentais até a 4ª semana. No entanto, ao final dos protocolos, o peso corporal de SHR-T₈ e SHR-S₈ foram inferiores ao WKY-T₈ e WKY-S₈, respectivamente (Figura 2, P<0,05). Observamos também que os SHR-T₈ apresentavam peso corporal reduzido, quando comparado com seus respectivos controles (SHR-S₈). Não houve diferenças significativas entre WKY-T₈ e WKY-S₈.

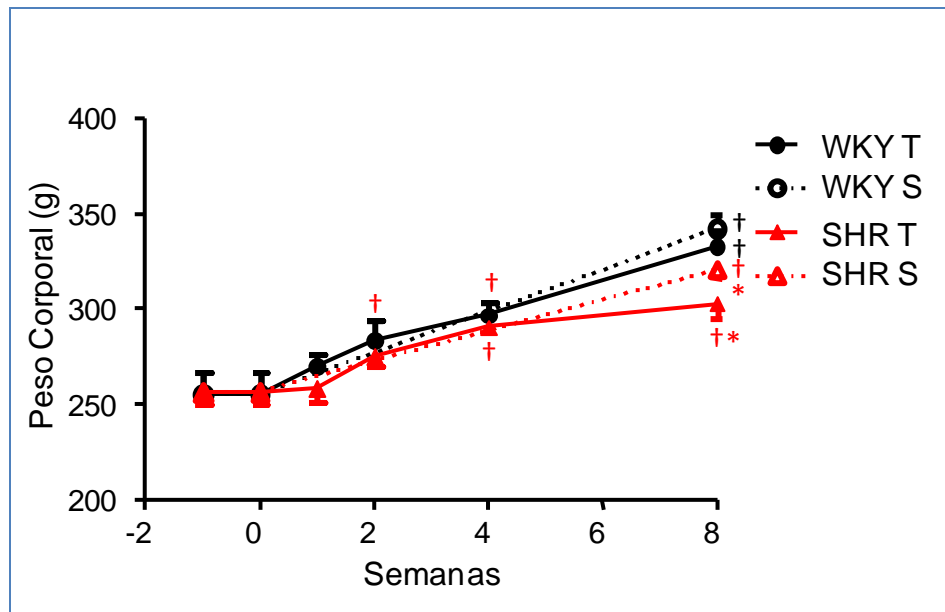


Figura 2 - Evolução temporal do peso corporal de SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo dos protocolos experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0.

4.2 Avaliação da Capacidade Física de WKY e SHR

O nível de capacidade física dos animais foi mensurado através de testes de esforço máximos em esteira ergométrica, possibilitando a identificação das

velocidades máximas atingidas, correspondentes ao desempenho dos SHR e WKY ao longo dos protocolos experimentais.

Na tabela 2 e Figura 3 apresentamos o desempenho dos animais nos testes de esforço máximo realizados nas semanas 0, 4 e 8 dos protocolos experimentais. O primeiro teste de esforço mostra que o grupo SHR já apresentava um nível de desempenho físico superior ao grupo WKY ($P < 0,05$), o que se estendeu até o final dos protocolos. É importante ressaltar que os grupos SHR sedentários e treinados partem de um mesmo nível inicial de capacidade física (SHR-T: $1,79 \pm 0,06$ Km/h, SHR-S: $1,78 \pm 0,09$ Km/h), mesma situação observada para os grupos de WKY (WKY-T: $1,19 \pm 0,06$ Km/h; WKY-S: $1,20 \pm 0,08$ Km/h). No segundo teste de esforço tanto os SHR como os WKY apresentaram significativo aumento da velocidade máxima atingida, e no 3º teste, realizado na 8ª semana, atingiram as seguintes velocidades: (SHR=T: $2,70 \pm 0,13$ Km/h; WKY-T: $2,01 \pm 0,11$ Km/h). SHR e WKY mantidos sedentários não apresentaram alteração significativa da capacidade máxima entre as semanas 0 e 8 (Tabela 2).

Tabela 2 - Velocidade máxima (em km/h) atingida nos testes de esforço máximo, realizados nas semanas 0, 4 e 8 nos grupos SHR e WKY treinados e sedentários.

Teste de esforço	WKY		SHR	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado
Semana 0	$1,20 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,09^*$	$1,79 \pm 0,06^*$
Semana 4	$1,25 \pm 0,14$	$1,75 \pm 0,07^{\dagger \ddagger}$	$1,80 \pm 0,08^*$	$2,30 \pm 0,06^{* \dagger \ddagger}$
Semana 8	$1,35 \pm 0,07$	$2,01 \pm 0,11^{\dagger \ddagger}$	$1,60 \pm 0,10^*$	$2,70 \pm 0,13^{* \dagger \ddagger}$

Valores são médias + EPM. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; ‡ vs sedentário mesmo grupo

Na Figura 3 ilustramos a evolução do desempenho em esteira ao longo dos protocolos nos grupos WKY e SHR. Observa-se que WKY e SHR treinados tiveram desempenho progressivo e paralelo ao longo do treinamento. Por outro lado, WKY e SHR mantidos sedentários não apresentaram alterações de desempenho.

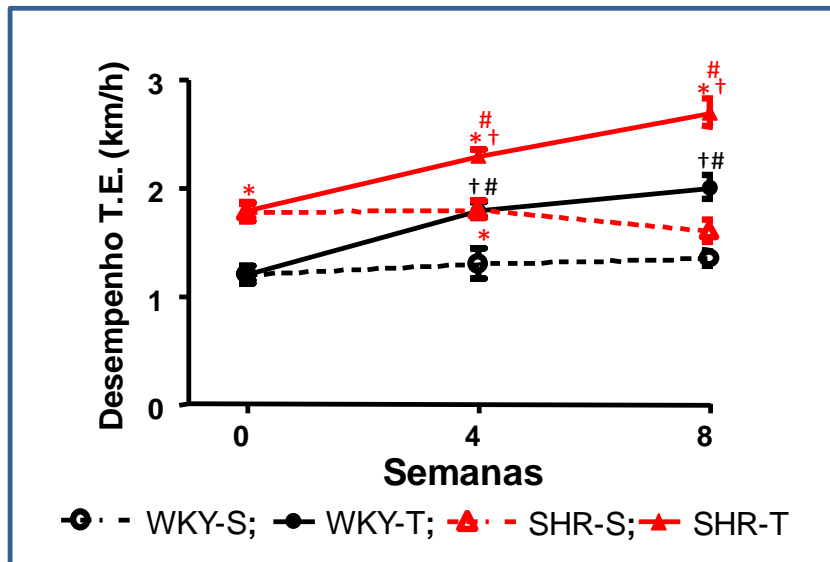


Figura 3 - Alteração sequencial do desempenho em esteira, avaliada através de testes de esforço máximo realizados no início, na 4ª e 8ª semanas dos protocolos de treinamento ou sedentarismo em ratos SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; ‡ vs sedentário mesmo grupo.

A partir da diferença entre as velocidades alcançadas nas semanas 8 e 0 calculamos o ganho de capacidade física para cada grupo. Observa-se na Figura 4 que houve aumento significativo do desempenho em ambos os grupos treinados (SHR: $+0,85 \pm 0,18$ Km/h e WKY: $+ 0,73 \pm 22$ Km/h) demonstrando a eficiência do treinamento físico em ambos os grupos. Os WKY e SHR sedentários não apresentaram alteração significativa de performance. Importante notar que o ganho de desempenho após o treinamento foi similar em ambos os grupos.

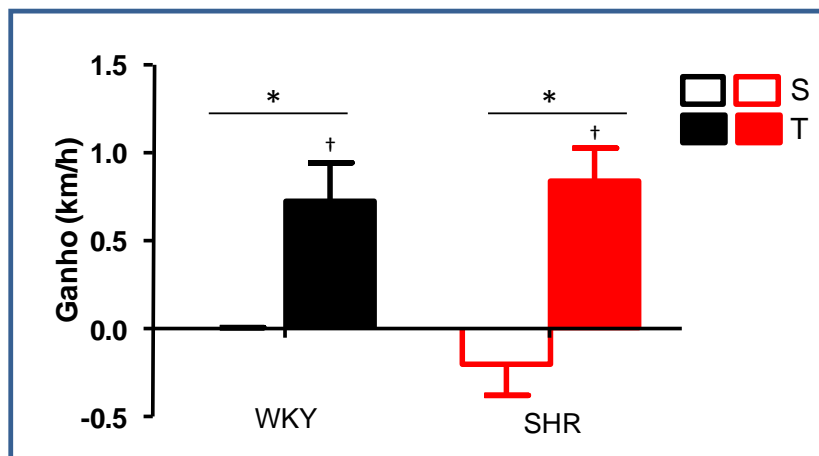


Figura 4 - Efeito do treinamento (T) ou sedentarismo(S) sobre a capacidade física dos animais, aferida como a diferença de desempenho entre as semanas 8 e 0. Significâncias ($P < 0,05$): † indica ganho significativo, * vs sedentário correspondente.

4.3 Efeito do treinamento ou sedentarismo sobre os parâmetros hemodinâmicos

Nos diferentes tempos experimentais (semanas 0, 1, 2, 4 e 8) os ratos foram submetidos à canulação da artéria femoral para registro da PA e FC basais no dia subsequente. Na Tabela 3 são apresentados os valores absolutos referentes aos níveis de PAM e FC nos grupos SHR e WKY, treinados e sedentários obtidos durante os diferentes tempos experimentais. Durante todo o período analisado os valores de PAM dos SHR foram superiores aos dos WKY. O efeito sequencial de 8 semanas de treinamento aeróbio bem como a consequência de 8 semanas de sedentarismo sobre os níveis de PAM, são ilustrados na Figura 5.

Durante o treinamento não observamos alterações significativas nos valores de PAM de SHR e WKY quando comparados aos valores da semana 0 (Figura 5, Tabela 3). No entanto SHR mantidos sedentários apresentaram um considerável aumento na PAM (± 25 mmHg), o que determinou diferença significativa na 8ª semana do protocolo. Nos WKY sedentários não foi observado nenhuma alteração (tabela 3, Figura 5). Na Figura 6 comparamos o efeito do treinamento ou sedentarismo sobre os valores de PAM ao final de 8 semanas em ratos SHR e WKY: SHR-T apresentaram níveis de PAM inferiores aos SHR-S mas nenhuma alteração de PAM foi observada nos grupos WKY-S e WKY-T.

Tabela 3 - Valores de PAM e FC basais de ratos WKY e SHR treinados e sedentários ao longo de 8 semanas.

Grupos	PAM (mmHg)		FC basal (bpm)	
	WKY	SHR	WKY	SHR
T ₀	115 ± 1	162 ± 1*	330 ± 8	358 ± 7*
T ₁	112 ± 2	165 ± 3*	318 ± 4	347 ± 5*
T ₂	112 ± 2	165 ± 4*	317 ± 11	355 ± 4*
T ₄	114 ± 2	161 ± 4*	304 ± 8#	340 ± 7*#
T ₈	119 ± 1	161 ± 3*▲	308 ± 7▲#&	326 ± 7*▲#
S ₀	115 ± 1	162 ± 1*	330 ± 8	358 ± 7*
S ₈	117 ± 8	187 ± 12*#	335 ± 40#	402 ± 35*#

T₀, T₁, T₂, T₄ e T₈ representam os animais treinados nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 respectivamente; S₀ e S₈ representam os animais sedentários nas semanas 0 e 8. Os valores estão apresentados como média ± EPM. Significâncias (P < 0.05): * vs WKY correspondente; # vs S₀; ▲ T₈ vs S₈, & vs SHR T₈.

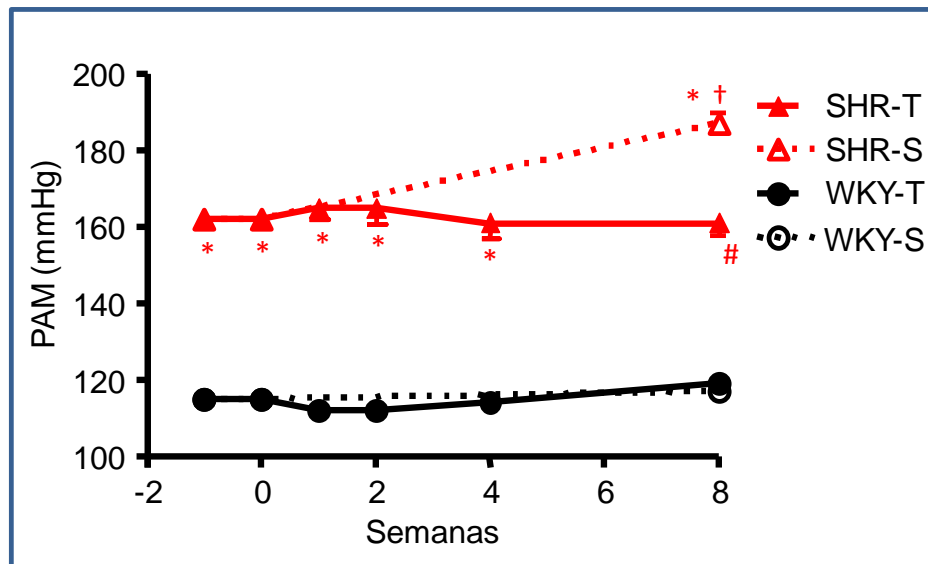


Figura 5 - Representação gráfica da evolução temporal da PAM em ratos SHR e WKY. Significâncias (P<0.05): † vs semana 0; * vs WKY correspondente, # vs S₈.

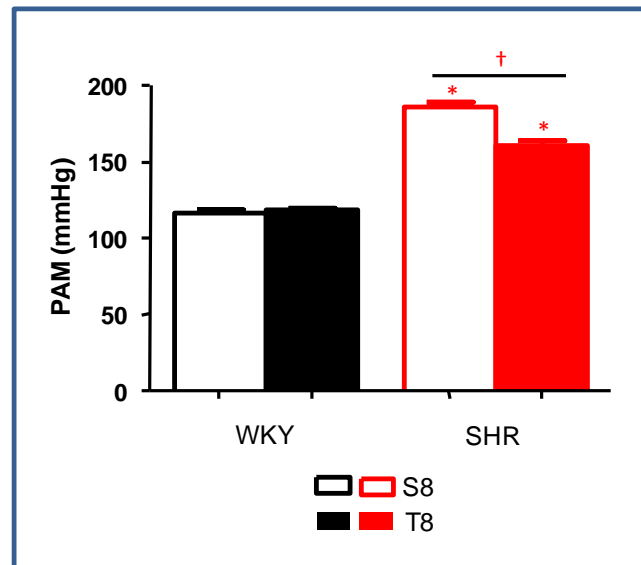


Figura 6 - Valores de PAM em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final dos protocolos experimentais (semana 8). Significâncias ($P < 0.05$): * vs WKY correspondente; † vs S8.

De maneira ilustrativa o efeito sequencial de 8 semanas de treinamento aeróbio bem como a consequência de 8 semanas de sedentarismo sobre os valores de FC, estão apresentados na Figura 7. A FC basal também se mostrou mais elevada nos SHR vs WKY durante todos os períodos analisados (Tabela 3, Figura 7). A instalação da bradicardia de repouso foi observada em ambos os grupos na 4ª semana de treinamento, quando SHR e WKY apresentaram uma redução de -18 bpm e -26 bpm respectivamente. Enquanto a FC se estabilizou nos WKY, os SHR apresentaram queda adicional de -14 bpm na semana 8.

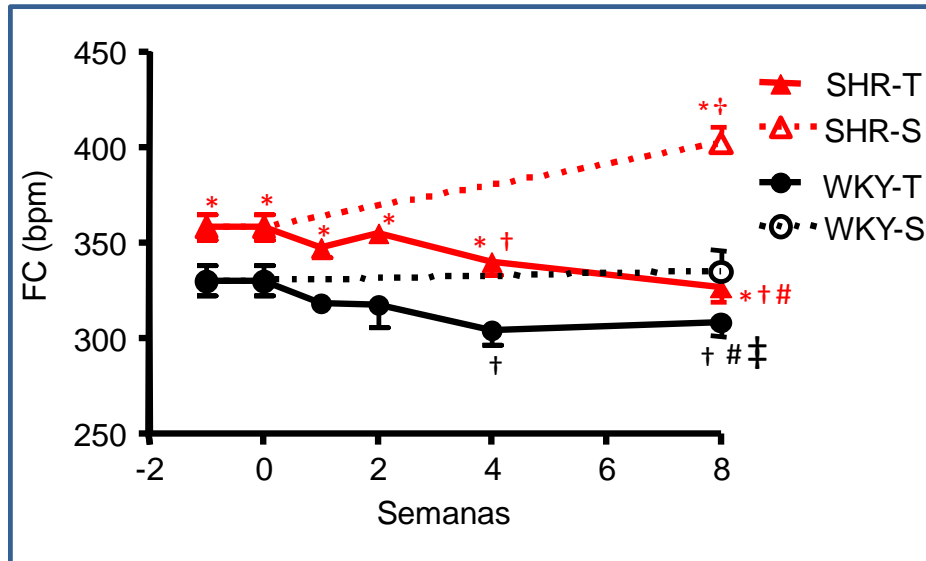


Figura 7 - Representação gráfica da evolução temporal da FC basal em ratos SHR e WKY sedentários (S) e treinados (T). Significâncias ($P < 0.05$): * vs WKY correspondente, † vs semana 0, # vs controle sedentário, ‡ vs SHR T8.

Na Figura 8 comparamos o efeito do treinamento ou sedentarismo sobre os valores de FC ao final dos protocolos em ratos SHR e WKY: SHR-T e WKY-T apresentavam reduzida FC basal quando comparados a seus respectivos controles sedentários. Além disso, o valor de FC de repouso dos SHR-T ao fim de 8 semanas foi similar ao apresentado pelos grupos WKY (Tabela 3, Figuras 7 e 8).

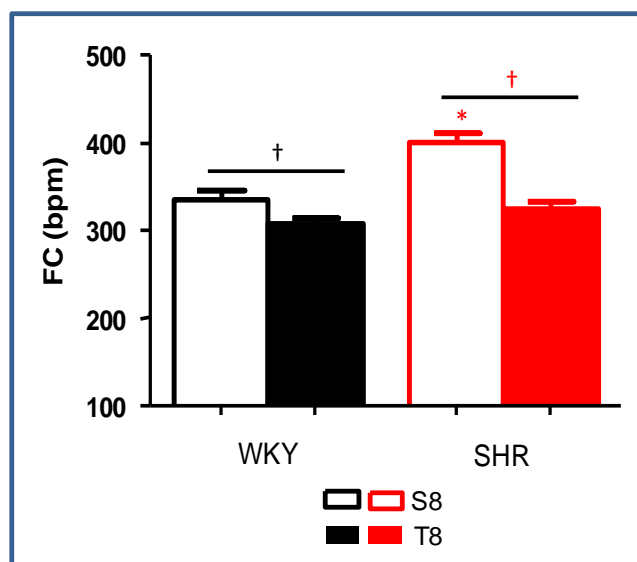


Figura 8 - Valores de FC basal em WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final dos protocolos (semana 8). Significâncias ($P < 0.05$): † T8 vs S8, * vs WKY S8.

4.4. Efeitos sequenciais do treinamento e sedentarismo sobre o conteúdo plasmático e cardíaco de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em WKY e SHR

Em todos os tempos experimentais (semanas 0, 1, 2, 4 e 8 dos protocolos) coletamos amostras de sangue de WKY e SHR S e T imediatamente após os registros funcionais. O sangue foi centrifugado; adicionou-se tampão com inibidores de proteases e procedeu-se à extração das angiotensinas que foram dosadas pelo HPLC. Para a dosagem da angiotensinas teciduais do coração parte do VE foi homegeinizada em tampão de extração com inibidores de proteases e procedeu-se à extração das angiotensinas. Na Figura 9 mostramos um cromatograma representativo de uma de nossas amostras no qual os picos da Ang-(1-7), Ang II e Ang I foram identificadas pela comparação com o tempo de retenção das angiotensinas-padrão no HPLC. A quantificação foi feita pela mensuração das respectivas áreas nos picos correspondentes à Ang-(1-7), Ang II e Ang I.

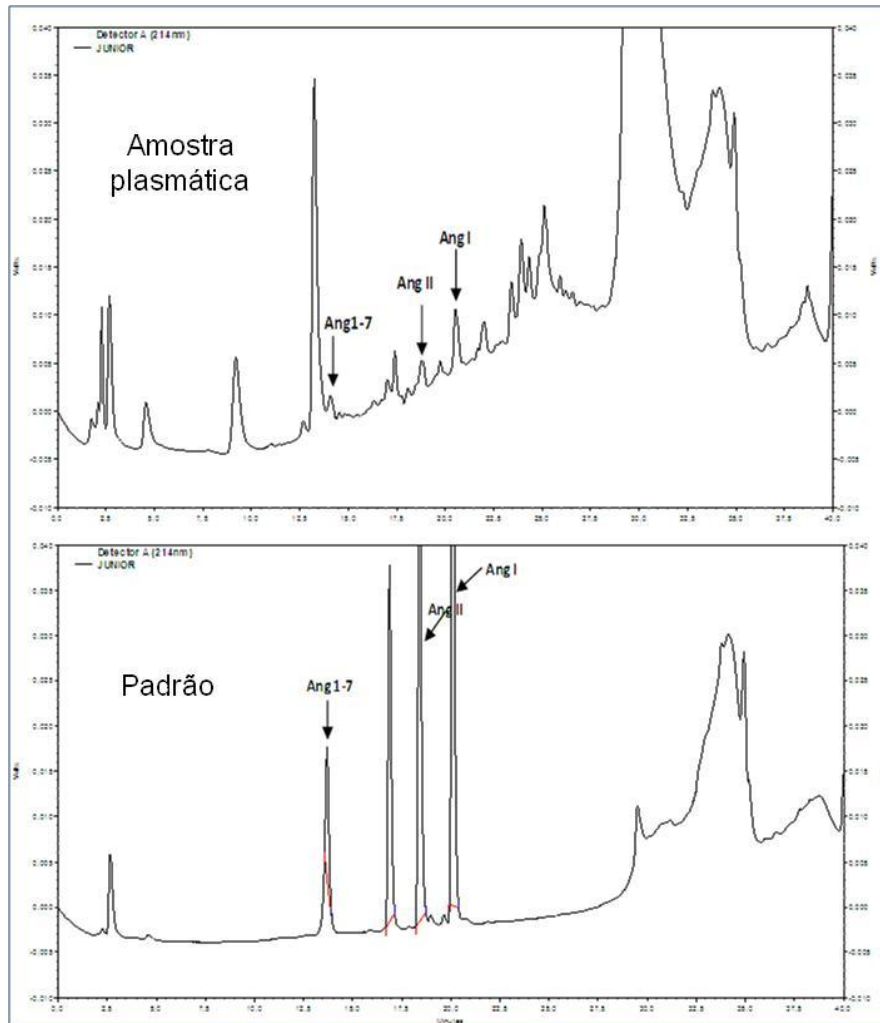


Figura 9 - Imagem representativa de um cromatograma de uma amostra plasmática .

4.4.1 Análise do conteúdo plasmático de Ang I, Ang II e Ang (1-7)

Na tabela 4 são apresentados os valores absolutos referentes à concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) plasmáticas de ratos SHR e WKY, treinados e sedentários obtidas nos diferentes tempos experimentais. Observamos que ao início dos protocolos (semana 0, ou S_0 e T_0) a concentração de Ang I e Ang II foram superiores nos SHR vs WKY, ao passo que Ang (1-7) foi similar em ambos os grupos. Houve nos SHR-T e WKY-T redução de Ang I e Ang II e aumento de Ang (1-7) com diferenças temporais e na magnitude destas repostas, as quais podem ser melhores analisadas nos gráficos apresentados em sequência.

Tabela 4 - Concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no plasma de WKY e SHR treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais.

Grupos	Ang I pmol/ml		Ang II pmol/ml		Ang (1-7) pmol/ml	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
T ₀	182,28±16,85	290,60±11,32*	243,99±17,38	333,48±14,77*	165,89±20,00	182,83±14,73
T ₁	177,68±18,45	260,68±19,28*	220,89±10,21	302,48±10,25*	230,76±7,34†	290,84±18,43*†
T ₂	153,00±15,61	190,00±9,83†	222,77±11,67	271,61±9,56*†	274,30±15,60†	304,10±29,85†
T ₄	142,44±11,46	159,61±18,45†	183,98±6,65†	219,13±12,25†	358,62±17,17†	390,46±21,25†
T ₈	131,28±11,07†#	143,58±12,11†	131,79±27,15†#	214,05±6,67*†#	369,68±20,48†#	383,36±16,36†#
S ₀	182,28±16,85	290,60±11,32*	243,99±17,38	333,48±14,77*	165,89±20,00	182,83±14,73
S ₈	253,58±12,06†	287,40±26,61	261,07±35,34	357,83±14,97*	210,98±5,69	203,97±13,64

T₀, T₁, T₂, T₄ e T₈ representam os animais treinados nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 respectivamente; S₀ e S₈ representam os animais sedentários nas semanas 0 e 8. Os valores estão apresentados como média ± EPM. Significâncias (P < 0.05): * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

Na figura 10A observamos que ao início dos protocolos a concentração plasmática de Ang II mostrou-se superior nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ (333,48±14,77 vs 243,99±17,38 pmol/ml, P<0.05). Não observamos alterações significativas na concentração de Ang II em ambos os grupos mantidos sedentários, de modo que ao final de 8 semanas a Ang II continuava superior (+36%) em SHR-S₈ vs WKY-S₈ (figura 10A). Por outro lado, o T determinou redução significativa da Ang II plasmática a partir de T₂ em SHR (-18%) e T₄ em WKY (-25%), apesar de os níveis plasmáticos de Ang II em SHR-T apresentarem-se superiores aos WKY-T durante todo o período experimental (figura 10A). Ao final das 8 semanas Ang II estava reduzida em ambos os grupos treinados quando comparados a seus respectivos controles sedentários (-36% e -46% nos SHR e WKY, respectivamente) (figura 10B). Interessante observar-se que a partir da 4^a. semana experimental o conteúdo de Ang II nos SHR-T foi normalizado, uma vez que ele não mais diferia daquele apresentado pelos WKY.

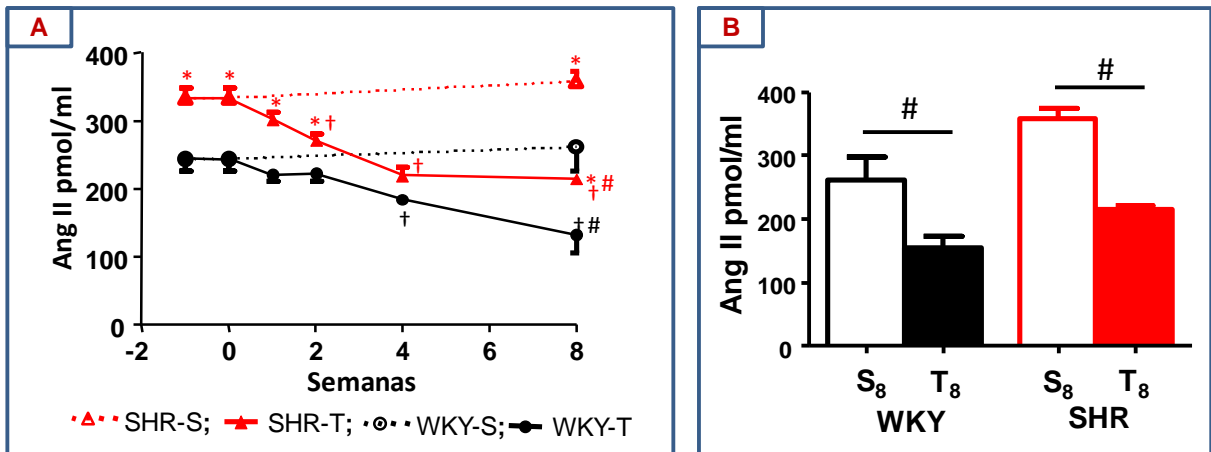


Figura 10 - A. Evolução temporal do conteúdo plasmático de Ang II ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). **B.** Comparação do conteúdo de Ang II em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente.

De acordo com a figura 11A, também não observamos ao início dos protocolos diferenças significativas no conteúdo plasmático de Ang (1-7) entre SHR-S₀ e WKY-S₀ ($182,84 \pm 14,74$ e $165,90 \pm 20,00$ pmol/ml, respectivamente). O sedentarismo não influenciou o conteúdo plasmático de Ang (1-7), assim, ao final de 8 semanas WKY-S₈ e SHR-S₈ continuaram a apresentar níveis similares de Ang (1-7) (figura 11A). Com exceção de T₁, quando o aumento da Ang (1-7) circulante foi mais intenso nos SHR que nos WKY, o T também determinou em ambos os grupos aumentos similares e progressivos do conteúdo de Ang (1-7) plasmática com significância já a partir da 1ª semana experimental (+59% e +39% para SHR e WKY em T₁), atingindo seus níveis máximos entre T₄ e T₈ (+2,2 vezes vs S₀ para ambos os grupos, figura 11A). Assim ao final de 8 semanas a concentração de Ang (1-7) tanto SHR como WKY treinados mostrou-se superior em relação aos respectivos controles sedentários (figura 11B).

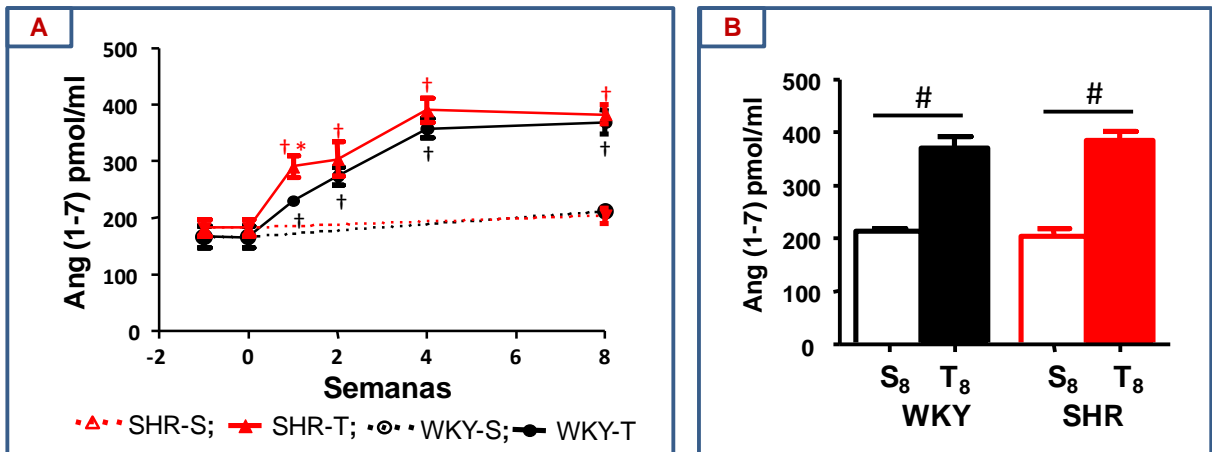


Figura 11 - A. Evolução temporal do conteúdo plasmático de Ang (1-7) ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). **B.** Comparação do conteúdo de Ang (1-7) em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T8 vs S8 correspondente.

4.4.2 Análise do conteúdo cardíaco de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em WKY e SHR

Na tabela 5 estão expostos os valores absolutos referentes ao conteúdo de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no VE de ratos SHR e WKY, treinados e sedentários nos diferentes tempos experimentais. Observamos que a concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) ao início dos protocolos (S_0 e T_0) foram similares entre SHR e WKY. Embora se observe diferenças temporais e na magnitude de concentração dos peptídeos analisados, no VE assim como no plasma, o treinamento promoveu redução de Ang I e Ang II e aumento de Ang (1-7) tanto nos SHR como nos WKY.

Tabela 5 - Concentração de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no ventrículo esquerdo de ratos WKY e SHR treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais.

Grupos	Ang I nmol/g		Ang II nmol/g		Ang (1-7) nmol/g	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
T ₀	37,40±5,52	34,22±1,54	87,73±4,60	86,91±3,70	67,86±7,76	54,10±2,60
T ₁	41,64±4,70	16,04±0,82*†	89,51±2,75	25,21±0,88*†	98,19±13,22†	70,46±2,37*
T ₂	19,97±2,66†	11,34±0,74*†	82,41±3,66	21,74±1,25*†	103,61±6,50†	87,69±4,16†
T ₄	5,44±0,49†	8,32±0,38†	13,42±0,90†	18,34±0,74†	128,91±5,63†	108,21±5,62*†
T ₈	5,09±0,50†	6,79±0,23†#	14,13±3,15†	14,85±0,78†#	139,22±6,20†	130,19±7,78†#
S ₀	37,40±5,52	34,22±1,54	87,73±4,60	86,91±3,70	58,16±7,76	54,10±2,60
S ₈	5,57±1,82†	43,42±2,25*†	79,06±7,66	110,09±9,96*†	82,33±6,48	69,07±5,42*

T₀, T₁, T₂, T₄ e T₈ representam os animais treinados nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 respectivamente; S₀ e S₈ representam os animais sedentários nas semanas 0 e 8. Os valores estão apresentados como média ± EPM. Significâncias (P < 0.05): * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

A figura 12A, demonstra que o conteúdo cardíaco de Ang II ao início dos protocolos foi similar entre WKY e SHR (87,73±4,60 vs 86,91±3,70 pmol/g). Nos WKY mantidos sedentários por 8 semanas não houve alteração de Ang II, no entanto observamos aumento de +26% nos SHR-S₈ (figura 12A). Após apenas uma semana de treinamento o conteúdo de Ang II em SHR foi prontamente reduzido a 25,21±0,88 pmol/g (-71% vs SHR-S₀) e permaneceu neste nível até a 8ª. semana de treinamento. Os WKY não apresentaram alteração no conteúdo cardíaco de Ang II nas semanas 1 e 2 do treinamento, porém redução significativa foi observada após 4 semanas de treino, quando a concentração de Ang II foi 85% reduzida em relação à semana 0, atingindo níveis similares aos observados nos SHR-T desde T₁ (figura 12A). Ao final das 8 semanas experimentais o conteúdo de Ang II cardíaco permanecia mais elevado em SHR-S₈ vs WKY-S₈, porém, nos SHR-T₈ o conteúdo de Ang II foi similar aos WKY-T₈ (figura 12B).

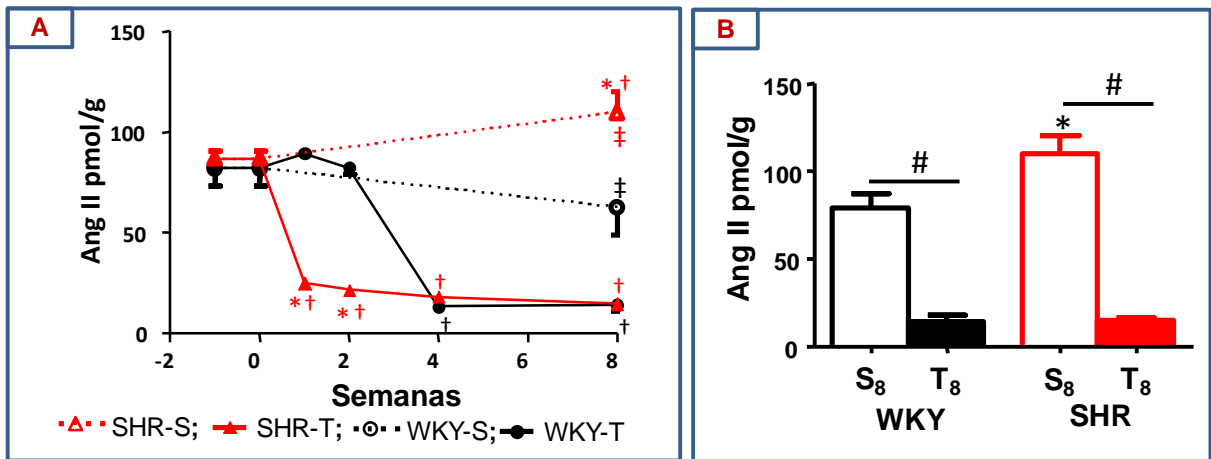


Figura 12 - A. Evolução temporal do conteúdo de Ang II no ao longo ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). **B.** Comparação do conteúdo de Ang II no VE de SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T₈ vs S₈ correspondente.

O conteúdo de Ang (1-7) apresentou-se similar entre WKY e SHR ao início dos protocolos ($67,86 \pm 7,76$ vs $54,10 \pm 2,60$ pmol/g) e manteve-se sem alterações significativas nos grupos WKY e SHR mantidos sedentários por 8 semanas conforme ilustrado na figura 13A. Por outro lado, nos grupos treinados houve aumentos significativos do conteúdo de Ang (1-7) em WKY (T₁, +68%) e SHR (T₂, +29%). WKY apresentaram ainda aumento adicional até T₄ (+122% vs semana 0) mantendo-se estável até T₈ ao passo que, nos SHR treinados o aumento no conteúdo de Ang (1-7) foi mais gradativo e atingindo o nível máximo em T₈ (+140%), quando não mais diferia de WKY-T₈ (figura 13A). Após 8 semanas de treinamento o conteúdo de Ang (1-7) encontrava-se aumentado quando comparado aos respectivos controles sedentários, sendo similar entre WKY-T₈ e SHR-T₈ ($139,22 \pm 6,20$ vs $130,19 \pm 7,78$ pmol/g, figura 13B).

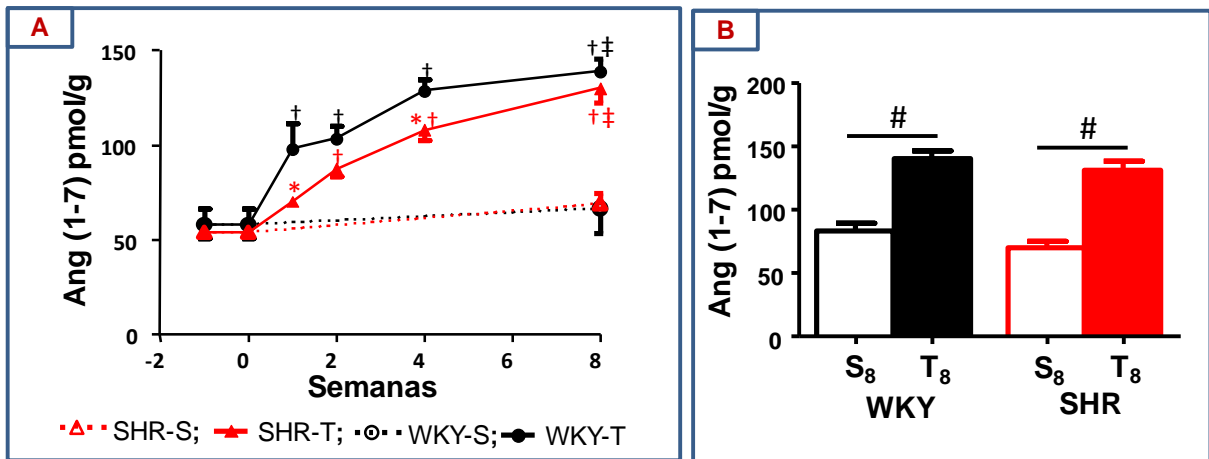


Figura 13 - A. Evolução temporal do conteúdo de Ang (1-7) no ao longo ao longo de 8 semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T). **B.** Comparação do conteúdo de Ang (1-7) no VE em SHR e WKY treinados e sedentários na oitava semana experimental. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0; # T₈ vs S₈ correspondente.

4.4.3 Efeito do treinamento e sedentarismo sobre a razão AngII/Ang(1-7) no plasma e coração de WKY e SHR

Após analisarmos os conteúdos totais das angiotensinas, analisamos a razão Ang II/ Ang(1-7) a fim de identificar o balanço entres os efeitores dos 2 eixos do SRA, no plasma e no VE, conforme ilustrado na figura 14. Ao início dos protocolos, a razão Ang II/Ang(1-7) plasmática em SHR-S₀ foi ligeiramente superior aos WKY-S₀ ($1,90 \pm 0,19$ vs $1,65 \pm 0,26$), sem no entanto atingir níveis de significância. Também não observamos diferenças na razão Ang II/Ang (1-7) no VE de WKY-S₀ vs SHR-S₀ ($1,48 \pm 0,22$ vs $1,61 \pm 0,04$). A razão Ang II/Ang (1-7) manteve-se inalterada tanto no plasma quanto no VE de SHR-S durante as 8 semanas experimentais. Houve, no entanto, redução significativa da razão Ang II/ Ang(1-7) no VE do WKY-S₈. Além disso, ao final de 8 semanas de sedentarismo a razão Ang II/ Ang(1-7) foi inferior tanto no plasma (+42%) quanto no VE(+68%) dos WKY-S₈ vs SHR-S₈. Por outro lado o treinamento determinou em ambos os grupos redução da razão Ang II/Ang(1-7), com algumas diferenças temporais entre o plasma e o VE. Enquanto que no plasma a redução da razão Ang II/Ang(1-7) de ambos os grupos WKY e SHR foi gradativa até a 4^a. semana estabilizando-se a partir de então, no VE dos SHR-T a

queda da razão Ang II/Ang (1-7) foi de grande magnitude já em T₁ (-78%) com ligeira redução nas semanas seguintes, atingido o máximo em T₈ (-98%). Por outro lado, nos WKY-T esta redução foi mais gradativa (-32% em T₁), atingindo a queda máxima entre T₄ e T₈ (-93%).

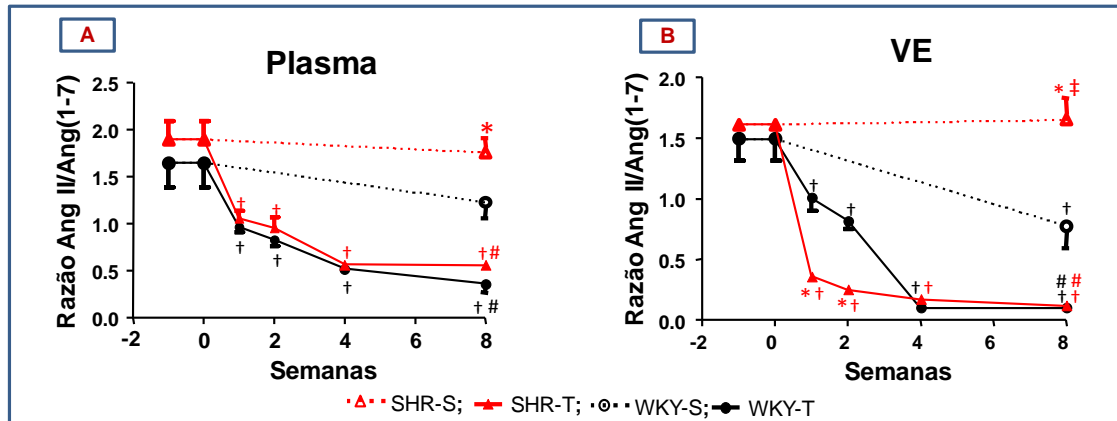


Figura 14 - Evolução temporal da razão Ang II/Ang (1-7) no plasma (A) e no VE (B) ao longo de 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S) nos grupos SHR e WKY. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY, † vs semana 0, # T8 vs S8 correspondente, ‡ SHR S8 vs WKY S8.

4.5 Expressão proteica dos receptores do SRA no VE de WKY e SHR sedentários e treinados

Parte do ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de extração e as amostras foram processadas em gel de eletroforese. As membranas foram incubadas com os anticorpos contra receptores AT₁, AT₂ e Mas e após a revelação em filmes de raio x procedeu-se à quantificação da densidade óptica das bandas

4.5.1 Receptores AT₁ no VE

A figura 15A indica a evolução temporal, a figura 15B ilustra a comparação ao final dos protocolos e a figura 15C mostra o gel representativo da expressão do receptor AT₁ nos 4 grupos experimentais. Ao início dos protocolos, quando os ratos tinham cerca de 3 meses de idade, a expressão de receptores AT₁ era significativamente maior nos SHR-S vs WKY-S (+18%). Não houve diferenças na expressão de AT₁ nos WKY e SHR mantidos sedentários por 8 semanas. Embora o

treinamento tenha reduzido parcialmente a expressão de receptores AT_1 nos SHR, esta queda não foi significativa quando comparada com os valores dos SHR- T_0 . No entanto, durante todo o protocolo de treinamento, a expressão de receptores AT_1 nos SHR-T não diferia daquela apresentada pelos WKY-T, como confirmado pela sobreposição de valores (figura 15A), ou seja, houve normalização da expressão proteica de receptores AT_1 nos SHR-T. Ao final dos protocolos, observava-se ligeiras alterações da densidade de receptores AT_1 nos SHR S e T, mas sem influências significativas nem do grupo e nem da condição experimental na expressão desses receptores.

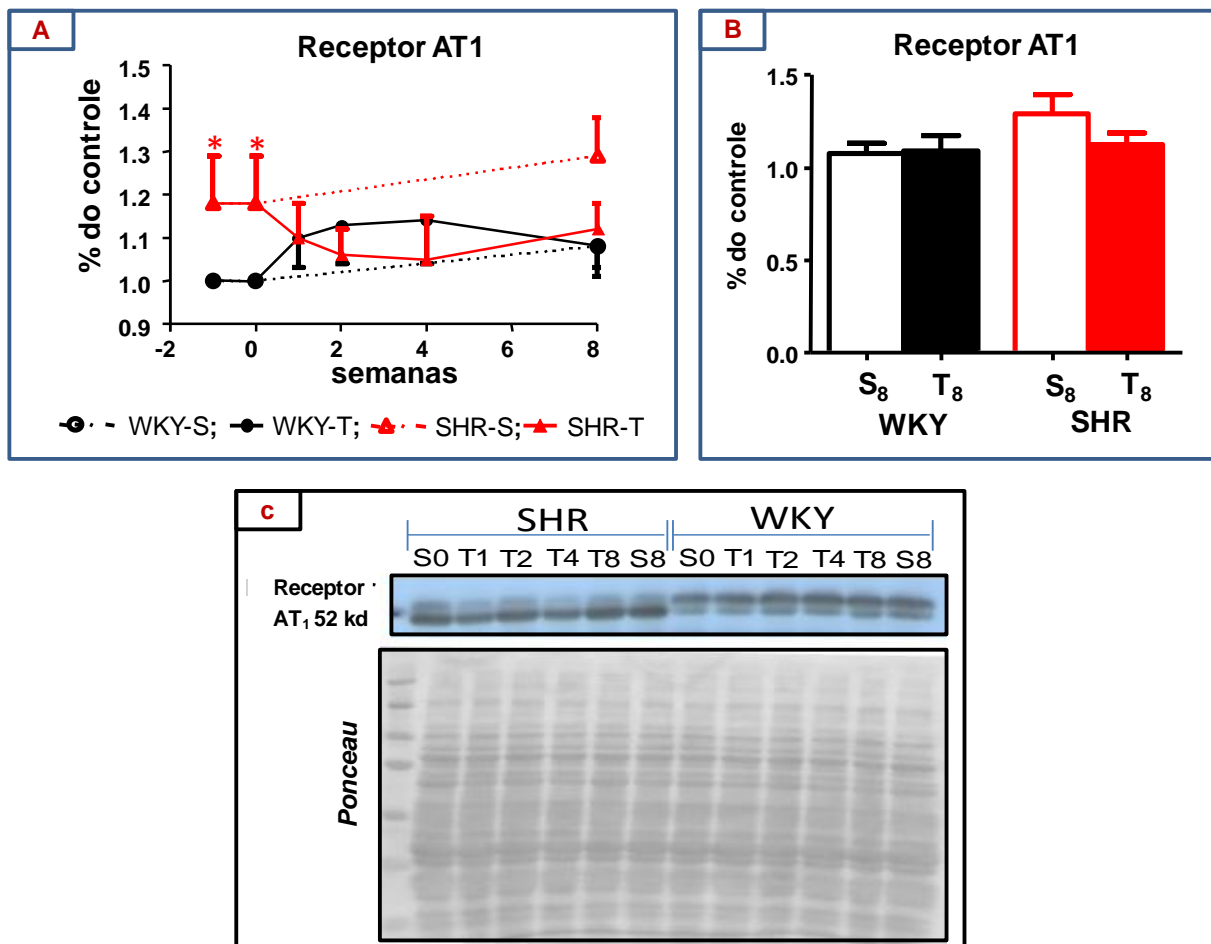


Figura 15 - A. Evolução temporal na expressão de receptores AT_1 de Ang II no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). **B.** Comparação da expressão de receptores AT_1 na 8ª. semana experimental. **C.** Gel representativo da expressão proteica de AT_1 nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY

4.5.2 Receptores AT_2 no VE

A figura 16A indica a evolução temporal, a figura 16B ilustra a comparação ao final dos protocolos e a figura 16C mostra o gel representativo da expressão do receptor AT_2 nos 4 grupos experimentais. No início dos protocolos a expressão de receptores AT_2 mostrou-se reduzida nos SHR-S quando comparado aos WKY-S. O sedentarismo não desencadeou alterações na expressão proteica de AT_2 em nenhum dos grupos experimentais. De maneira similar, o treinamento também não promoveu mudanças na expressão de AT_2 nos SHR e WKY (figura 16A). Coerentemente, ao término dos protocolos na 8ª. semana, não houve alterações na expressão de AT_2 decorrentes da condição e/ou do grupo experimental.

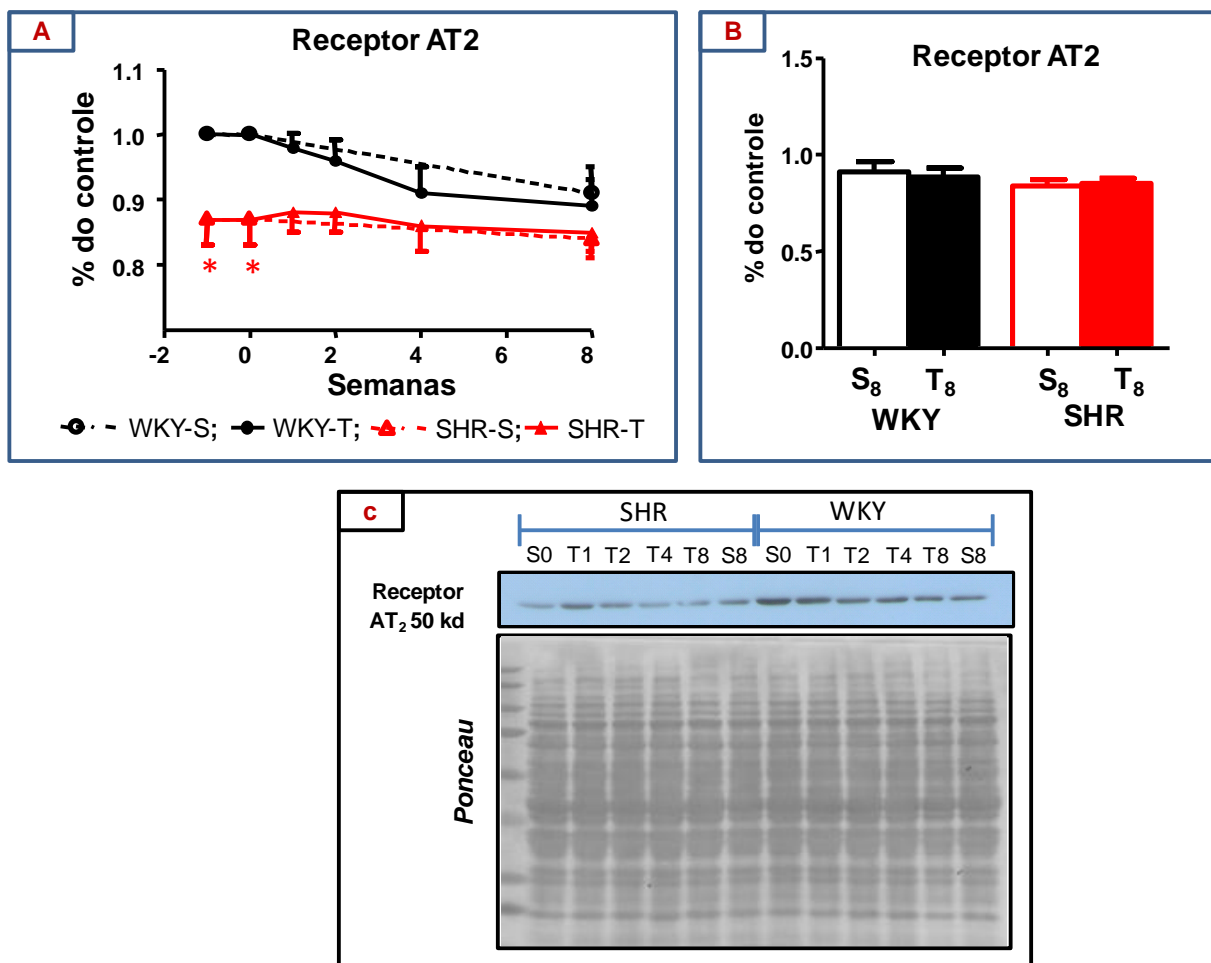


Figura 16 - **A.** Evolução temporal na expressão de receptores AT_2 de Ang II no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). **B.** Comparação da expressão de receptores AT_2 na 8ª. semana experimental. **C.** Gel representativo da expressão proteica de AT_2 nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY

4.5.3 Receptores Mas

A figura 17A indica a evolução temporal, a figura 17B ilustra a comparação ao final dos protocolos e a figura 17C mostra o gel representativo da expressão do receptor Mas nos 4 grupos experimentais. No início dos protocolos, com cerca de 3 meses de idade, a expressão de receptores Mas encontrava-se significativamente elevada nos SHR-S vs WKY-S. O sedentarismo não alterou a expressão proteica de Mas nos WKY, mas determinou queda significativa nos SHR após as 8 semanas experimentais (figura 17A). Os WKY-T (vs. WKY-S) também não mostraram alterações significativas durante todo o protocolo, enquanto que nos SHR-T houve redução transitória da expressão dos receptores Mas no VE entre T₂ e T₄ (quando não diferiam da expressão apresentada pelos grupos WKY), seguido de retorno aos valores basais em T₈ (figura 17A). Ao final dos protocolos não observamos alterações na expressão do receptor Mas entre WKY-S₈, WKY-T₈ e SHR-S₈, mas houve aumento significativo na densidade de receptores Mas nos SHR-T₈, quando comparados aos SHR-S₈ (Figura 17B).

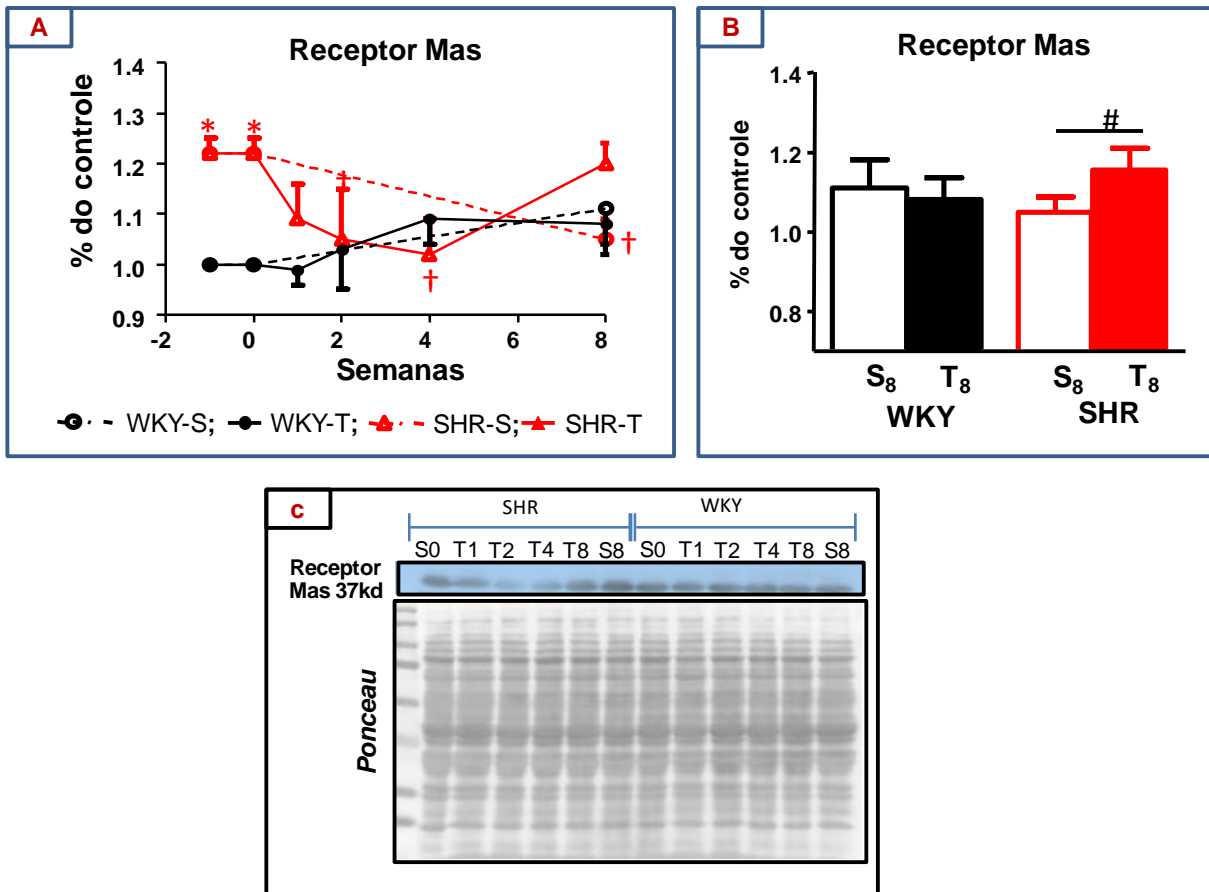


Figura 17 - A. Evolução temporal na expressão de receptores Mas de Ang-(1-7) no VE de SHR e WKY durante 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). **B.** Comparação da expressão de receptores Mas na 8ª. semana experimental. **C.** Gel representativo da expressão proteica de Mas nos diferentes grupos experimentais (normalização pelo Ponceau). Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY, † vs semana 0, # T8 vs S8 correspondente

4.6 Influência do treinamento e sedentarismo sobre o balanço oxidativo no VE de WKY e SHR.

Uma vez que alterações do SRA influenciam sobremaneira a produção de EROs, investigamos se as mudanças na ativação do SRA determinadas pela hipertensão associada ao treinamento ou sedentarismo seriam ou não acompanhadas de alteração nos níveis de estresse oxidativo no VE.

4.6.1 Análise do balanço oxidativo basal no VE de WKY e SHR

Na tabela 6 são comparados entre SHR-S e WKY-S (semana 0) os valores basais da quantificação de EROS (imunoreatividade para o DHE) no VE e a expressão gênica das enzimas produtoras de EROs (NOX2 e NOX4) e de diversas enzimas antioxidantes (SOD, NqO, Catalase, GpX, PRDX, TRX e HO-1). A

biodisponibilidade de EROs assim como a expressão gênica de NOX2 e NOX4 foram superiores em SHR-S vs WKY -S. Não houve alteração na expressão gênica de NqO, Catalase, TRX e HO-1. Por outro lado, a expressão gênica da SOD, GpX, PRDX encontravam-se elevadas nos SHR-S vs WKY-S (tabela 6).

Tabela 6 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de NOX2, NOX4, SOD, NqO, Catalase, GpX, HO-1, atividade da catalase e biodisponibilidade de EROs em SHR e WKY.

	WKY	SHR
NOX2 - RNAm	1,01±0,07	1,93±0,40 *
NOX4 - RNAm	1,04±0,12	2,97±0,45 *
SOD - RNAm	1,03±0,10	1,93±0,40 *
NqO - RNAm	1,04±0,13	1,89±0,47
Catalase - RNAm	1,03±0,11	1,35±0,22
GpX - RNAm	1,05±0,14	2,77±0,55 *
HO-1 - RNAm	1,06±0,16	1,28±0,16
Atividade da Catalase	20,62±0,23	20,39±0,11
EROs	66,11x10 ⁻³ ±1,24	77,45x10 ⁻³ ±2,71 *

Legenda: SOD – superóxido dismutase; NQO1 – NAD(P)H quinona desidrogenase 1; GPX – glutathiona peroxidase; HO-1 – heme-oxigenase-1; EROs – espécies reativas de oxigênio. Significâncias (P < 0,05): * vs WKY

4.6.2 *Influência do treinamento ou sedentarismo no perfil da expressão gênica das NOX2 e NOX4 no VE de WKY e SHR*

Como apresentado na Figura 18A, houve nos SHR-S entre as semanas 0 e 8 aumento adicional da expressão de NOX2 (+76%) além daquela apresentada no início dos protocolos (+91% SHR-S₀ vs. WKY-S₀). Por outro lado, a expressão de NOX2 manteve-se estável tanto WKY-S, não sendo neste grupo alterada pelo treinamento. Também observamos nos SHR-T uma elevação marcante da expressão gênica de NOX2 que se instalava já na 1ª semana (+110%) e se mantinha até a 8ª. semana experimental (figura 18A). Assim, ao final dos protocolos a expressão de NOX2 em SHR-T₈ e SHR-S₈ apresentava-se significativamente elevada em relação aos WKY-T₈ e WKY-S₈, respectivamente (figura 18B).

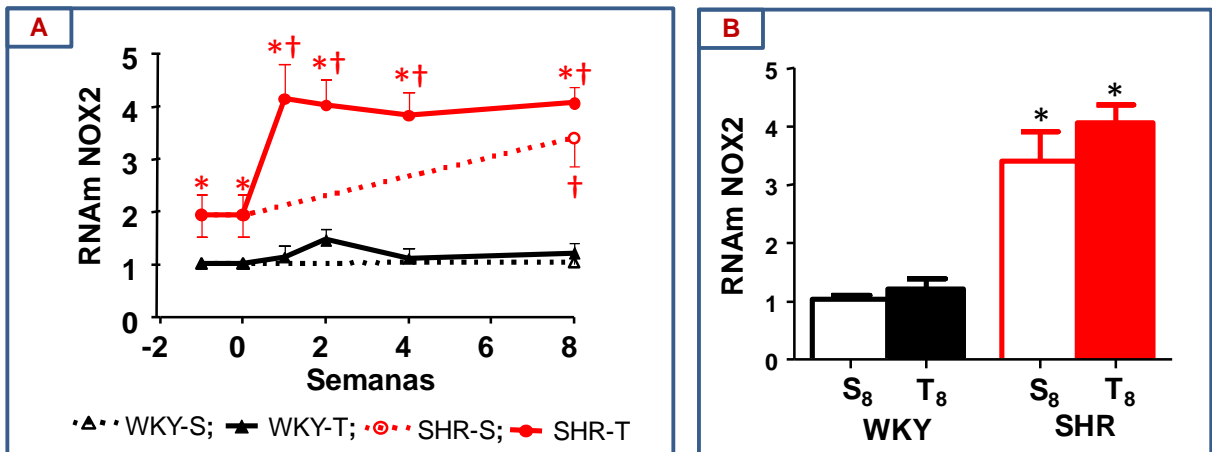


Figura 18 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da NOX2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de NOX 2 em WKY e SHR ao término das 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0.

Assim como a NOX2, a expressão gênica de NOX4 ao início dos protocolos também foi superior em SHR vs WKY (+185%, Figura 19A). Não observamos alterações nos WKY-S durante as 8 semanas de sedentarismo, mas os SHR-S₈ apresentaram redução de 43% durante o mesmo período. O treinamento determinou pequenas flutuações, mas não alterou a expressão de NOX4 nos SHR-T; já os WKY-T exibiram aumento significativo em T₂ (+190%), com grande incremento adicional entre T₄ e T₈ (+353%, (figura 18A). Desta maneira ao final das 8 semanas experimentais a expressão gênica de NOX4 em WKY-T₈ foi encontrava-se muito elevada nos WKY-T₈ (+216% vs. WKY-S₈). Não observamos diferenças entre SHR-T₈ e S₈, mas a expressão de NOX4 nos SHR-T₈ era bastante reduzida (-51%) quando comparada aos WKY-T₈ (figura 19B).

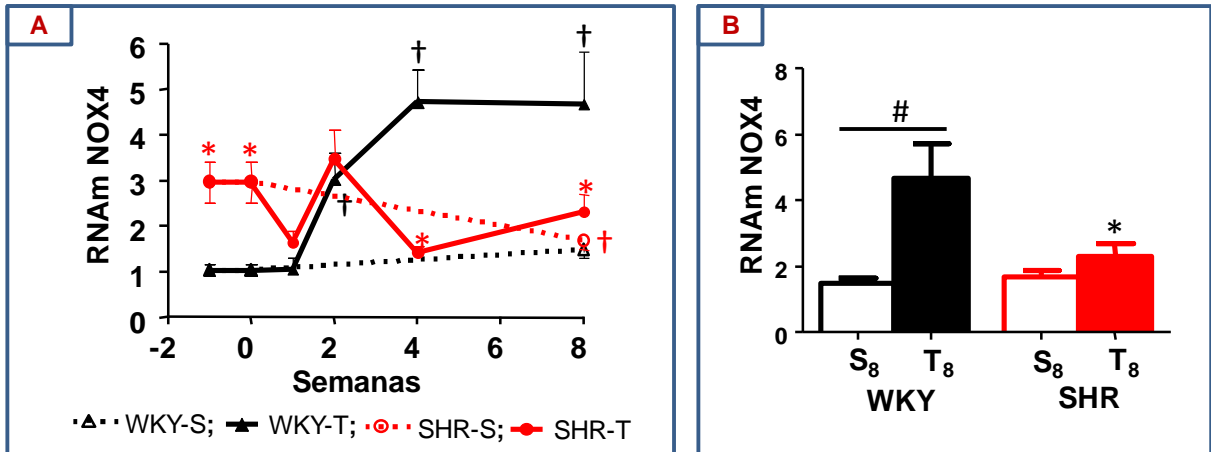


Figura 19 - Evolução temporal da expressão do RNAm da NOX4 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de NOX4 em WKY e SHR ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.6.3 Efeitos do treinamento ou sedentarismo na biodisponibilidade de EROs no VE de WKY e SHR

Na Figura 20 apresentamos uma imagem representativa da biodisponibilidade de EROs (marcação pelo DHE) no VE de WKY e SHR sedentários e treinados nos tempos experimentais 0, 2 e 8. Observa-se intensa marcação nos SHR-S₀ quando comparados a seus respectivos controles temporais (WKY-0). Não se observou nos WKY-T e WKY-S alteração da densidade de marcação nas semanas 2 e 8; no entanto nos SHR, o treinamento por 2 e 8 semanas determinou marcante redução da densidade do DHE quando comparados aos controles S₀. Os dados quantitativos, apresentados na Figura 21, confirmam estas observações. A idade e o treinamento não determinaram nos WKY nenhuma alteração significativa ($P > 0,05$ para as comparações realizadas). Por outro lado, os SHR apresentavam desde o início dos protocolos aumento significativo da biodisponibilidade de EROs (Figura 20, $P < 0,05$ para SHR-S₀ vs WKY-S₀) e o treinamento determinou redução significativa destes valores, com completa normalização da biodisponibilidade de EROs já em T₂, a qual se manteve até T₈, ou seja, os valores de imunorreatividade para o DHE em SHR-T₂ e SHR-T₈ foram menores que os observados em SHR-S₀ e não diferiam dos valores apresentados pelo grupo WKY. Observou-se também

aumento significativo da biodisponibilidade de EROs nos SHR mantidos sedentários (SHR-S₈ > SHR-S₀, P < 0.05, Figura 21) e que o treinamento foi eficaz em impedir este aumento idade-dependente.

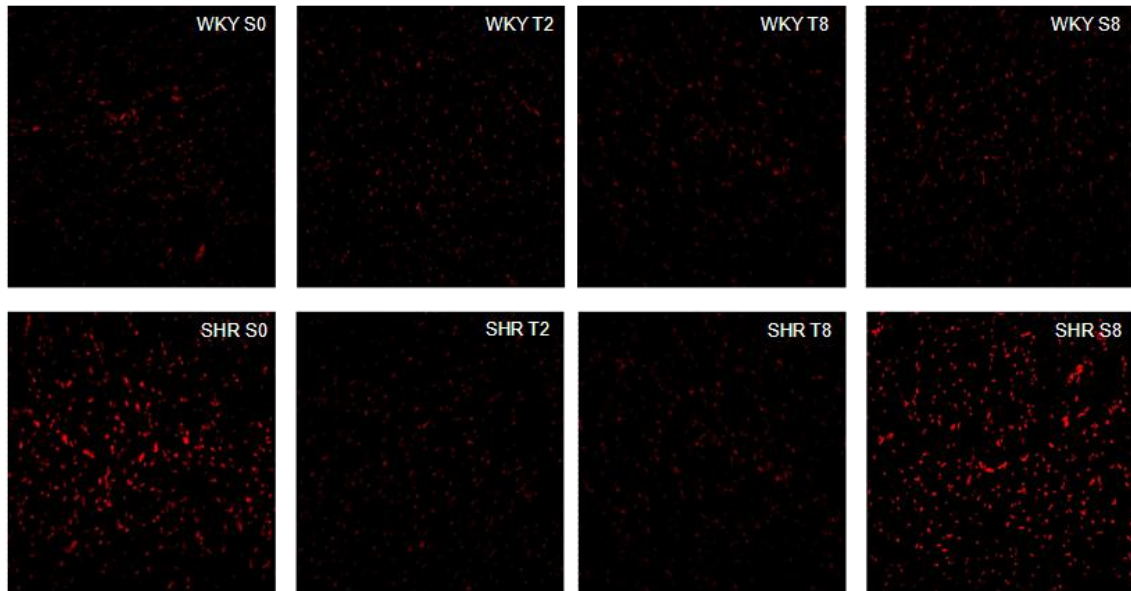


Figura 20 - Imagens representativas da biodisponibilidade de EROs (mensurada pela imunorreatividade para o dihidroxietídeo, DHE) em ratos WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores) sedentários (S) e treinados (T) nas semanas experimentais 0, 2 e 8..

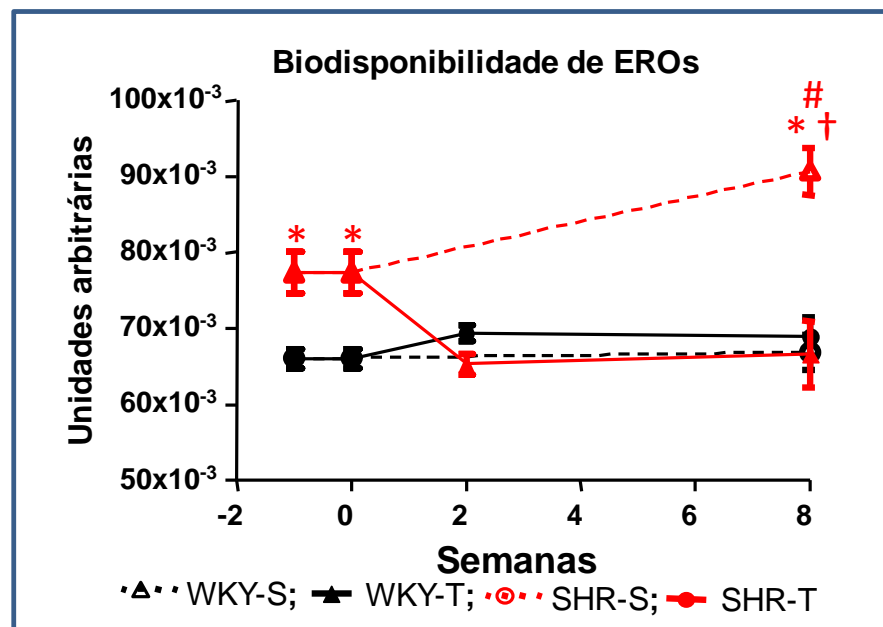


Figura 21 - treinamento (T) ou sedentarismo (S) em SHR e WKY. Significâncias (P < 0,05): * vs WKY correspondente; †, vs semana 0, # SHR-S8 vs SHR T-8.

4.6.4 Efeitos do treinamento aeróbio ou sedentarismo nos mecanismos de defesa antioxidante no VE de WKY e SHR

Como a manutenção da biodisponibilidade de EROs em níveis fisiológicos é fundamental para manter a homeostase de inúmeros processos fisiológicos, torna-se necessário o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs, realizada pelas enzimas antioxidantes. Portanto analisamos também os efeitos da hipertensão associada ao não ao treinamento sobre a expressão de enzimas antioxidantes.

4.6.4.1 Expressão gênica da SOD

Nossos dados demonstram que na semana inicial dos protocolos SHR apresentaram maior expressão de SOD em comparação a WKY (+87%). Tanto WKY como SHR não apresentaram alterações na expressão gênica de SOD após 8 semanas de sedentarismo. Aumento na expressão de SOD de WKY-T vs WKY-S foi observado já em T₂ (+100%), mantendo-se neste patamar até T₈, apesar de pequena redução em T₄ (Figura 22A). Houve nos SHR-T tendência de aumento da SOD (T₄) que, no entanto, atingiu níveis de significância em T₈ (+54%, Figura 22A). Ao final dos protocolos a expressão de SOD estava significativamente aumentada em SHR-T₈ vs SHR-S₈ (+73%, figura 22B).

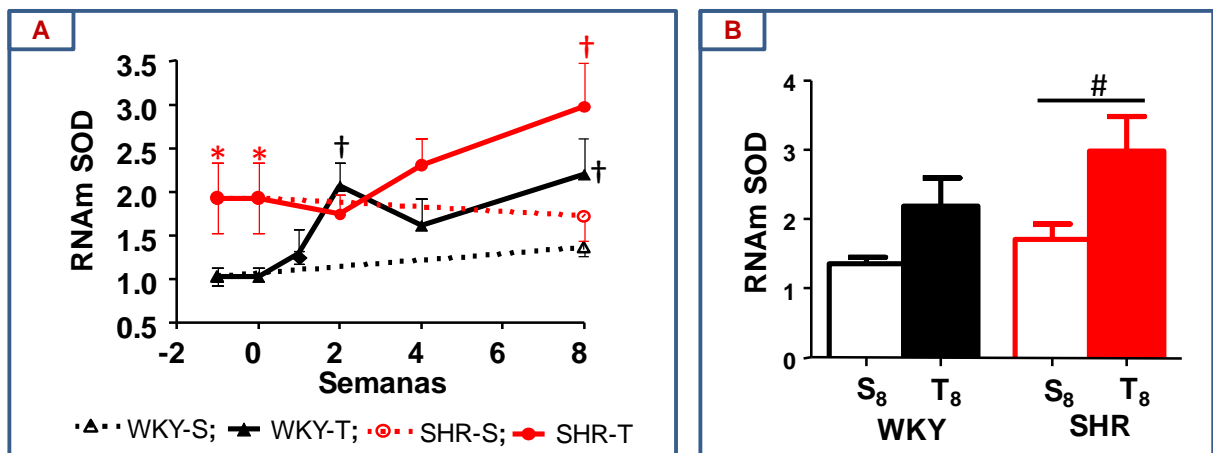


Figura 22 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da SOD em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão da SOD ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias P < (0,05): * vs WKY correspondente; † vs S0; # T8 vs S8.

4.6.4.2 Expressão gênica de NqO

Analizamos também a expressão gênica de NqO, a qual mostrou-se similar entre WKY e SHR ($1,04 \pm 0,13$ vs $1,89 \pm 0,47$) no início dos protocolos. O sedentarismo por 8 semanas não influenciou a expressão de NqO nos WKY-S e SHR-S (figura 23A). Por outro lado, o treinamento promoveu nos WKY aumento (+105% em T₂) na expressão de NqO, seguido de aumento adicional em T₄ o qual se manteve estável até T₈ (+203%). SHR-T também apresentaram aumentos na expressão de NqO, alcançando significância apenas em T₈ (+123%, figura 23A). Ao final das 8 semanas experimentais ambos os grupos treinados apresentaram aumentos na expressão de NqO em relação aos respectivos controles sedentários.

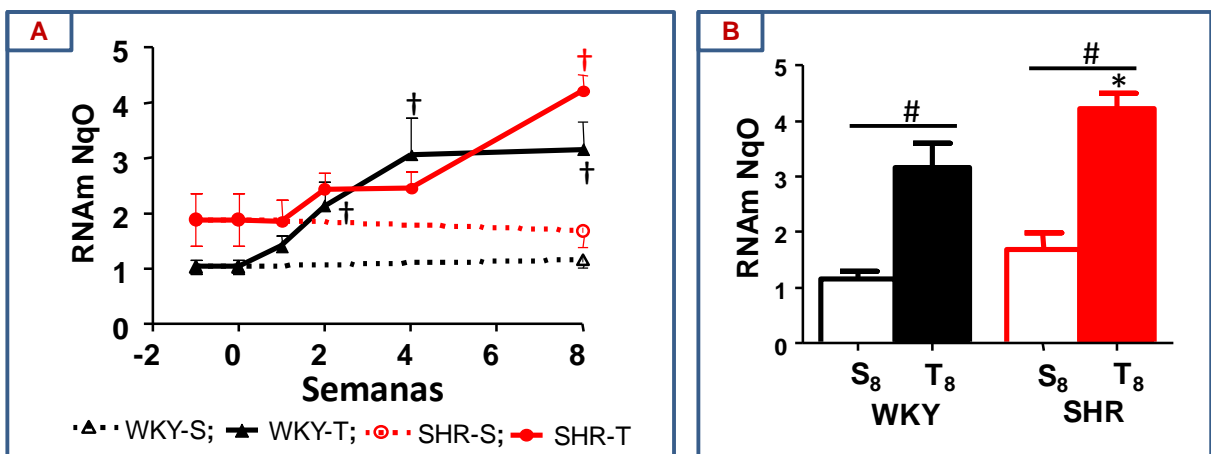


Figura 23 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de NqO em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão da NqO ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.6.4.3 Expressão gênica de Catalase

A expressão gênica da catalase foi similar entre WKY-S e SHR-S ao início dos protocolos ($1,03 \pm 0,11$ e $1,35 \pm 0,22$, respectivamente). Nos SHR-S, WKY-S e WKY-T não observamos alterações na expressão da catalase durante as 8 semanas experimentais. Nos SHR-T houve tendência ao aumento de sua expressão em T₈ ($P > 0,05$ para SHR-T₈ vs. SHR-S₀) que, no entanto, encontrava-se significativamente elevado quando comparado ao SHR-S₈ (Figura 24A). Esta constatação foi

confirmada pela comparação da expressão gênica da catalase entre grupos ao final das 8 semanas experimentais: houve aumento apenas nos SHR-T₈ (+73% vs SHR-S₈, figura 24B), que também se mostrou significativamente aumentado quando comparado aos WKY-T₈.

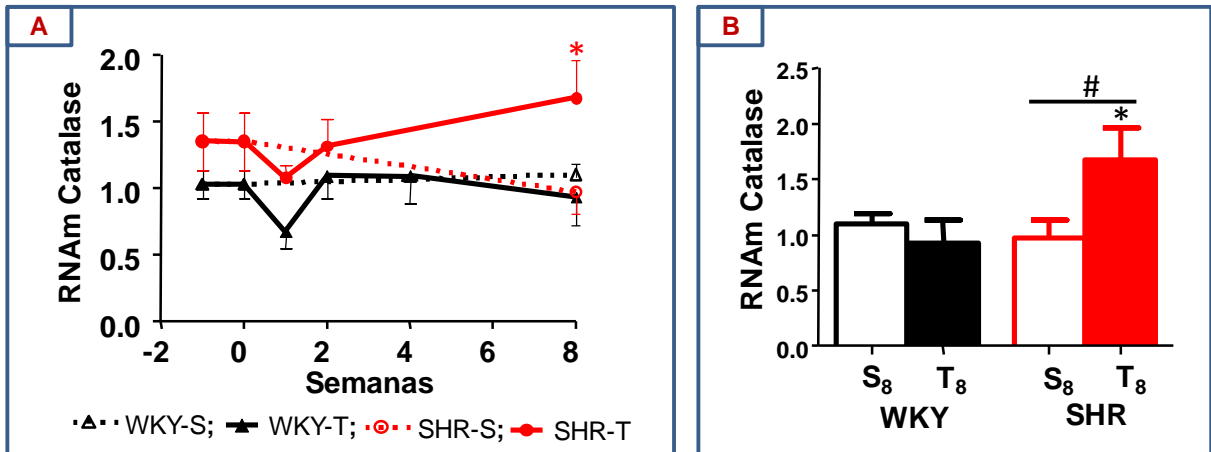


Figura 24 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da catalase em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão da catalase ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; # T₈ vs S₈.

4.6.4.4 Atividade enzimática da catalase

Além da expressão do RNAm analisamos também no VE a atividade enzimática da catalase, a qual confirmou nossos achados de expressão. Ao início dos protocolos experimentais a atividade da catalase era similar entre WKY-S₀ e SHR-S₀ ($20,62 \pm 0,23$ e $20,39 \pm 0,11$, respectivamente). WKY-T, WKY-S e SHR-S não apresentaram variações significativas ao longo das 8 semanas. Por outro lado, SHR-T apresentaram aumento significativo da atividade da catalase em T₄ (+5%) o qual se manteve até T₈ (figura 25A). Ao final dos protocolos observamos aumento da atividade da catalase nos SHR-T₈ quando comparado aos SHR-S₈ (+5%) e WKY-T₈ (+4%, figura 25B).

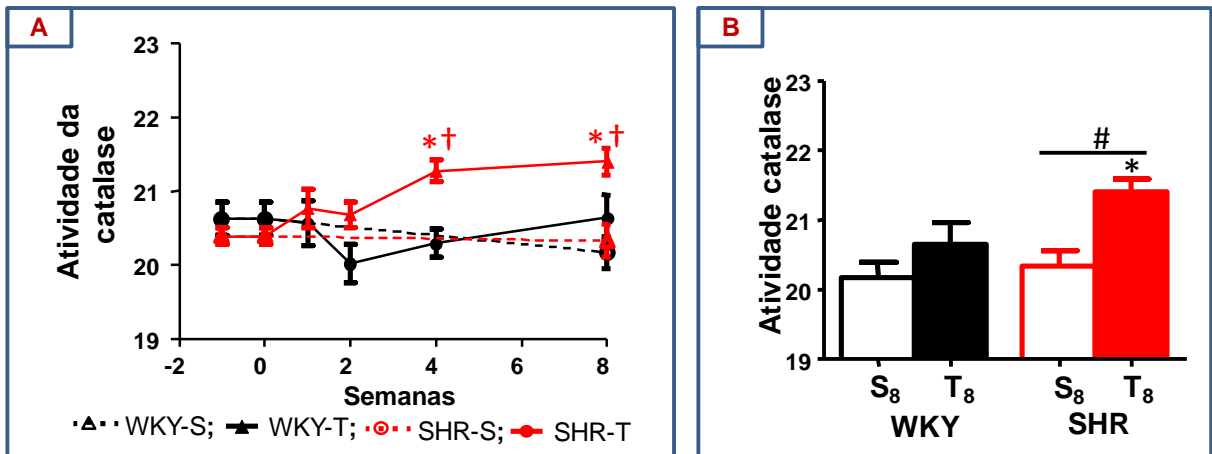


Figura 25 - A. Evolução temporal da atividade da catalase em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da atividade da catalase ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.6.4.6 Expressão gênica de GPX

A expressão gênica de Gpx no VE encontrava-se significativamente elevada nos SHR-S₀ vs. WKY-S₀ ($2,77 \pm 0,55$ vs. $1,05 \pm 0,14$, Figura 26A), sem grandes alterações desses valores durante as 8 semanas de sedentarismo. Ambos, WKY-T e SHR-T apresentaram aumento mantido do conteúdo de RNAm de Gpx entre T₂ e T₈ (+3,6-vezes e +1,9 vezes, respectivamente, figura 26A). Coerentemente o final das 8 semanas experimentais a expressão gênica de Gpx no VE não diferia entre SHR-S₈ e WKY-S₈ mas encontrava-se significativamente aumentada nos grupos treinados, quando comparadas a seus respectivos controles sedentários (figura 26B).

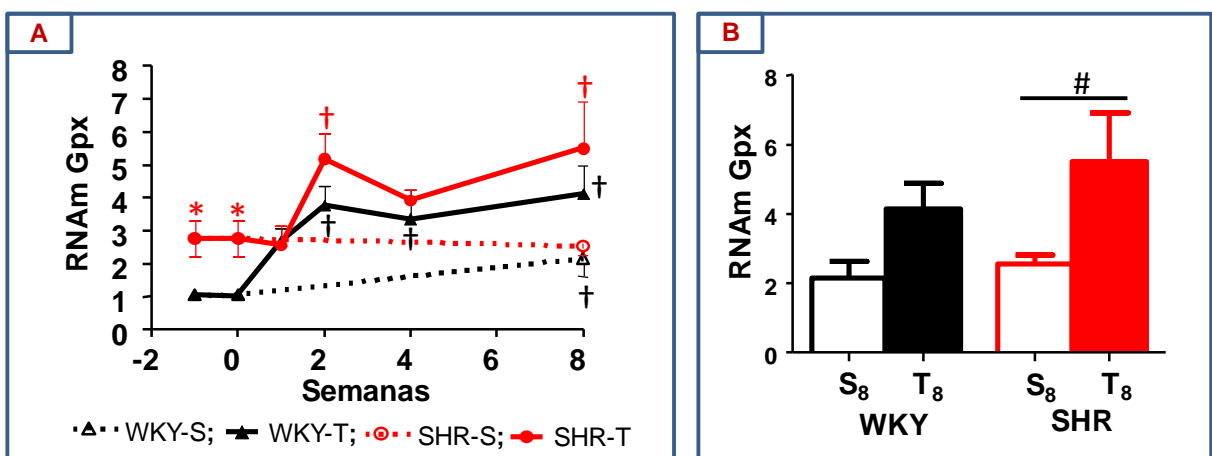


Figura 26 - A Evolução temporal da expressão do RNAm de Gpx em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de Gpx ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.7 Perfil inflamatório no VE de WKY e SHR

Uma vez que tanto o SRA quanto o estresse oxidativo encontram-se envolvidos na mediação de processos inflamatórios, nosso próximo passo foi analisar a expressão gênica de algumas das principais citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10).

4.7.1 Expressão gênica de citocinas na condição basal

Conforme ilustrado na tabela 7, na condição basal a expressão de TNF- α encontrava-se elevada nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ (aumento de 3-vezes), mas tanto a expressão de IL-1 β quanto de IL-10, não apresentaram diferenças entre os grupos.

Tabela 7 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , e IL-10 em ratos WKY e SHR sedentários (S).

	WKY-S ₀	SHR-S ₀
TNF- α - RNAm	1,06 \pm 0,16	3,16 \pm 0,60 *
IL-1 β - RNAm	1,08 \pm 0,17	0,98 \pm 0,11
IL-10 - RNAm	1,09 \pm 0,22	1,97 \pm 0,54

Legenda: TNF- α – fator de necrose tumoral alpha; IL-1 β – interleucina-1beta ; IL-10 – interleucina-10. Significância P < (0,05): * vs WKY correspondente

4.7.2 Efeito do treinamento ou sedentarismo na expressão gênica de citocinas no VE de WKY e SHR

Na sequência são apresentados os efeitos do treinamento aeróbio e do sedentarismo sobre a expressão gênica das citocinas pró- e anti-inflamatórias.

No grupo SHR, a maior expressão de TNF- α no início dos experimentos foi ainda mais aumentada durante as 8 semanas de sedentarismo (+2,3-vezes para S₈ vs. S₀), ao passo que a dos WKY manteve-se no patamar inicial (figura 27A). Durante o treinamento os SHR apresentaram aumento significativo, mas transitório da expressão gênica de TNF- α (+66%, entre T₁ e T₂) que não se manteve atingindo valores similares à semana 0 entre T₄ e T₈ (figura 27A). Desta forma, ao final dos protocolos expressão de TNF- α encontrava-se elevada apenas nos SHR-S₈, sem

diferenças entre WKY-S₈, WKY-T₈ e SHR-T₈, indicando que o treinamento foi efetivo em normalizar a elevada expressão desta citocina pró-inflamatória nos ratos hipertensos (figura 27B).

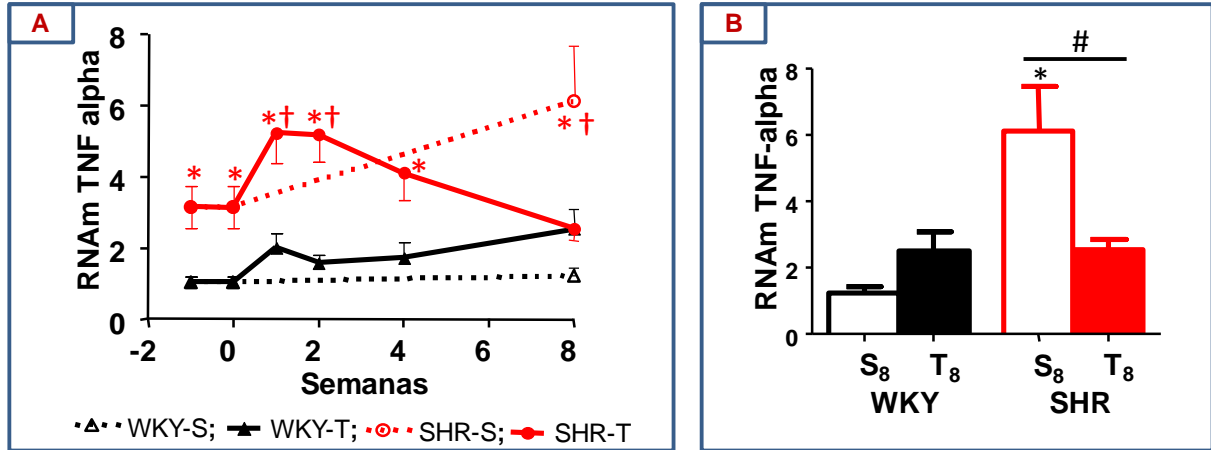


Figura 27 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de TNF- α em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de TNF- α ao término das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

A expressão gênica de IL-1 β também não diferia entre WKY-S₀ e SHR-S₀, mas apresentou nos SHR aumento significativo durante as 8 semanas de sedentarismo (de $0,98 \pm 0,11$ para $2,26 \pm 0,37$, figura 28A); não houve alteração nos WKY mantidos sedentários, assim como nenhuma alteração foi observada nos WKY durante o protocolo de treinamento. Por outro lado, os SHR-T também apresentaram aumentos significativos, mas transitórios de IL-1 β (+2,6-vezes entre T₁ e T₂, figura 28A), com retorno aos valores basais entre T₄ e T₈. Desta forma ao final dos protocolos experimentais a expressão de IL-1 β , assim como a de expressão de TNF- α , encontrava-se elevada apenas nos SHR-S₈, sem diferenças entre WKY-S₈, WKY-T₈ e SHR-T₈, confirmando a eficácia do treinamento em normalizar a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias em ratos hipertensos (figura 28B).

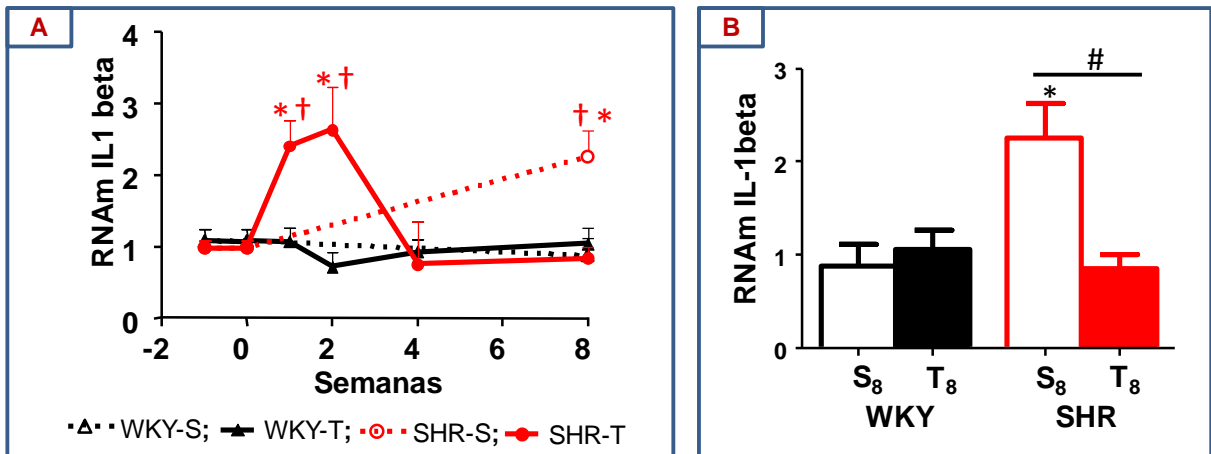


Figura 28 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de IL-1 β em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de IL-1 β ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

Na sequência analisamos a expressão gênica de IL-10, a qual também foi semelhante entre SHR-S₀ e WKY-S₀ no início dos protocolos (figura 29A). Ambos os grupos sedentários, assim como os WKY-T, não apresentaram alterações ao longo das 8 semanas experimentais. No entanto os SHR-T mostraram elevação transitória da expressão de IL-10 em T₂, com aumento significativo em T₈ (+91% vs. semana 0, figura 29A). De forma oposta ao observado para as citocinas pró-inflamatórias, expressão de IL-10 ao final dos protocolos encontrava-se elevada apenas nos SHR-T₈, sem diferenças entre WKY-S₈, WKY-T₈ e SHR-S₈, indicando que o treinamento foi efetivo em elevar a expressão desta citocina anti-inflamatória nos ratos hipertensos (figura 29B).

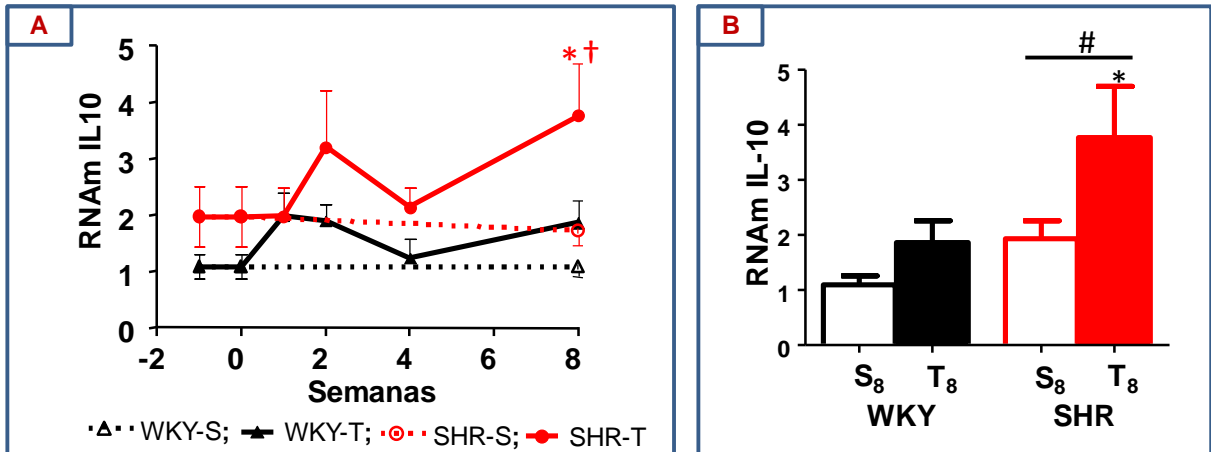


Figura 29 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da IL-10 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). Comparação da expressão de IL-10 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.8 Alterações sequenciais do treinamento sobre o remodelamento cardíaco em WKY e SHR sedentários e treinados

Nosso próximo passo foi analisar a influência da hipertensão arterial e do treinamento aeróbio sobre o remodelamento cardíaco. Para tanto analisamos em todos os grupos experimentais a hipertrofia cardíaca (diâmetro dos cardiomiócitos e deposição de colágeno), a expressão de genes marcadores da hipertrofia e da síntese/degradação de colágeno.

4.8.1 Análise da hipertrofia cardíaca

A análise da hipertrofia cardíaca foi realizada por meio de 2 índices indiretos, quais sejam a razão do peso do VE pelo comprimento da tíbia (VE/CT) e a razão do peso do VE pelo peso corporal (VE/PC).

Os SHR-S apresentaram ao longo de todo o período experimental maior VE/CT que os WKY-S pareados por idade, com tendência a aumento desta razão ao longo dos protocolos, o qual só atingiu níveis de significância na 8ª. semana experimental (Figura 30, $P < 0,05$ para SHR-T₈ vs. SHR-T₀). Em ambos os grupos experimentais, o treinamento não determinou quaisquer alterações na razão VE/CT (figura 30).

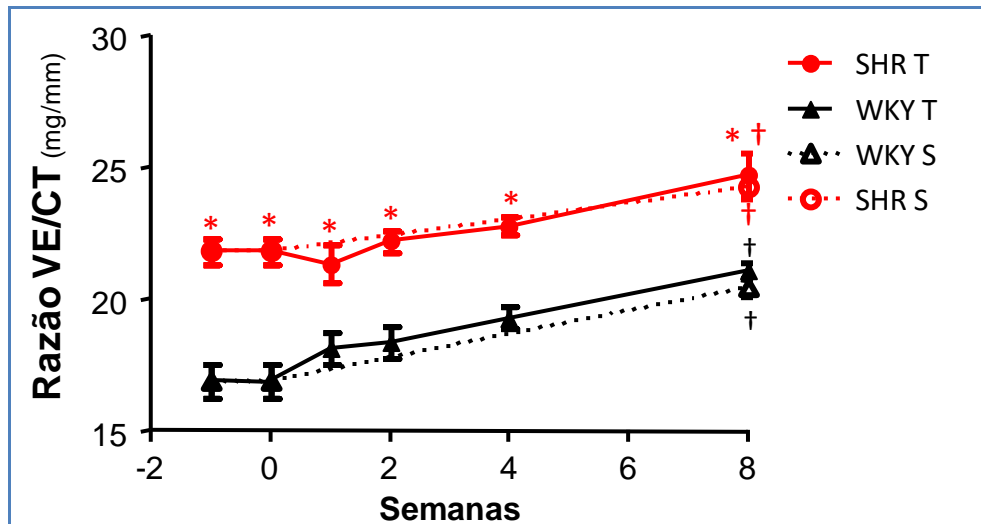


Figura 30 - Evolução temporal da razão do peso do VE/comprimento da tíbia (VE/CT) em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo das 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; † vs semana 0.

Também a análise da evolução VE/PC ao longo das 8 semanas experimentais (Figura 31) mostrou que os SHR-S apresentavam hipertrofia cardíaca quando comparados WKY-S de mesma idade. É interessante observar-se que nos 4 grupos o aumento da massa do VE foi proporcional ao aumento do peso corporal, sem alterações significativas da razão VE/PC durante as 8 semanas experimentais. O treinamento determinou apenas aumento da razão VE/PC nos SHR-T₈ vs. SHR-S₈ (Figura 31).

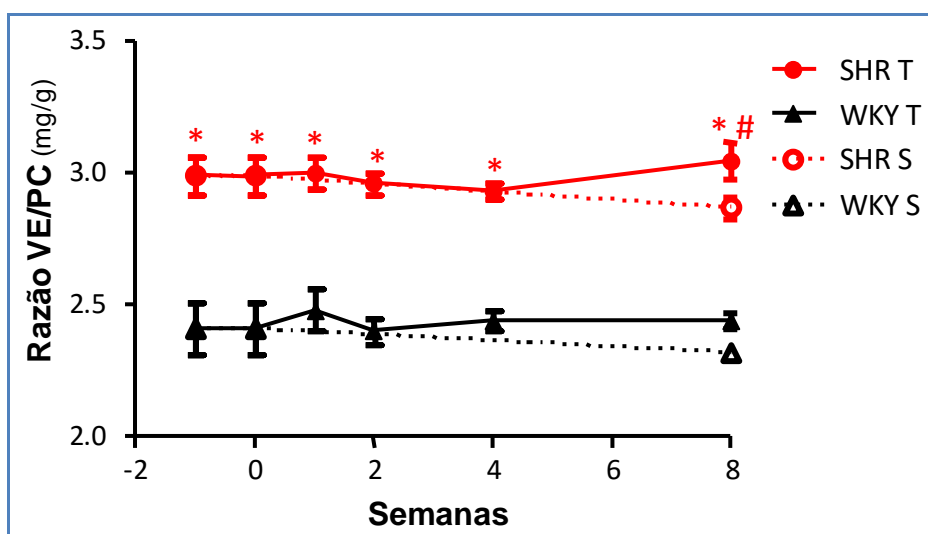


Figura 31 - Evolução temporal da razão do peso do VE/peso corporal (VE/PC) em SHR e WKY treinados (T) e sedentários (S) ao longo de 8 semanas experimentais. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente; # T8 vs S8.

A análise do diâmetro dos cardiomiócitos do VE (histologia para a hematoxilina-eosina representada na figura 32) confirmou a presença de hipertrofia cardíaca nos SHR-S quando comparados aos WKY-S ($13,43 \pm 0,23$ vs. $10,39 \pm 0,15$ μm , respectivamente, figura 33). Também não observamos nenhuma alteração no diâmetro dos cardiomiócitos nos SHR-T e WKY-T quando comparados a seus respectivos controles sedentários, mostrando que o treinamento de baixa a moderada intensidade em esteira ergométrica não alterou este parâmetro morfológico.

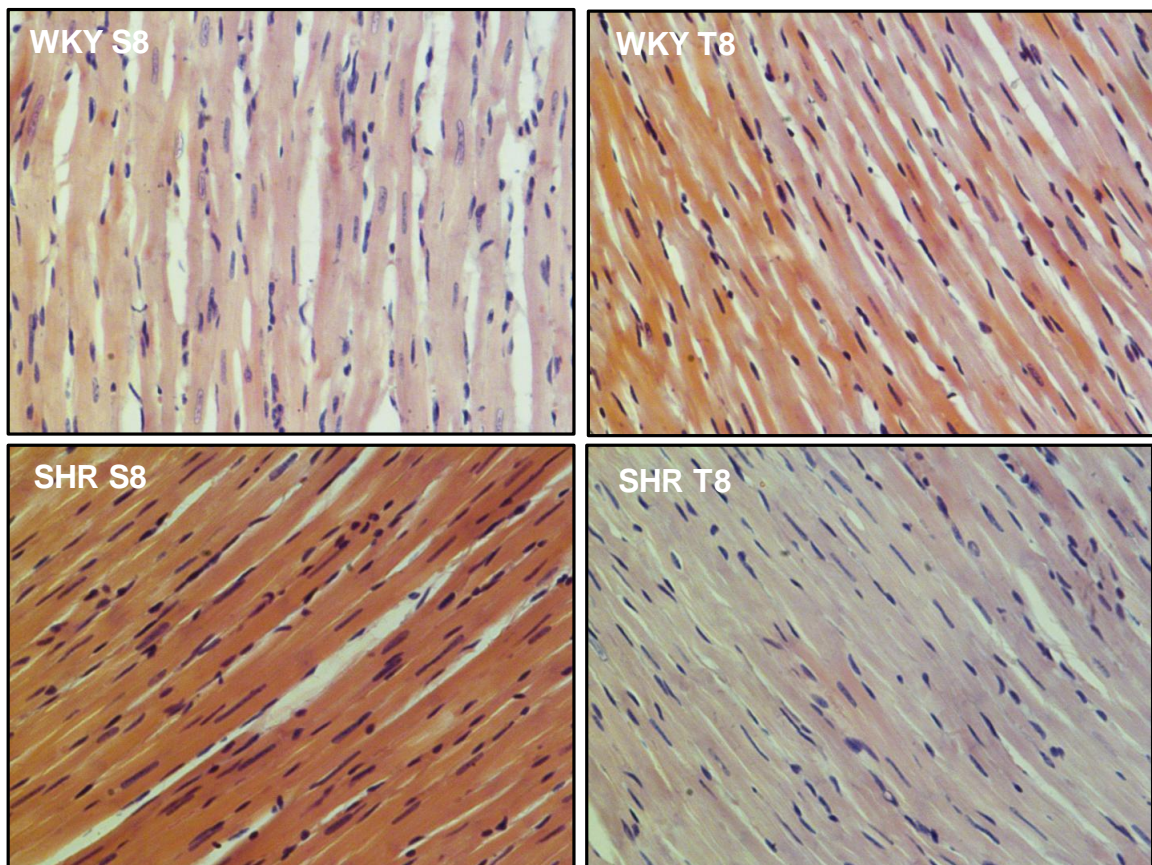


Figura 32 - Imagem representativa de cortes histológicos corados com solução de hematoxilina-eosina para análise do diâmetro de cardiomiócitos no VE de ratos WKY e SHR

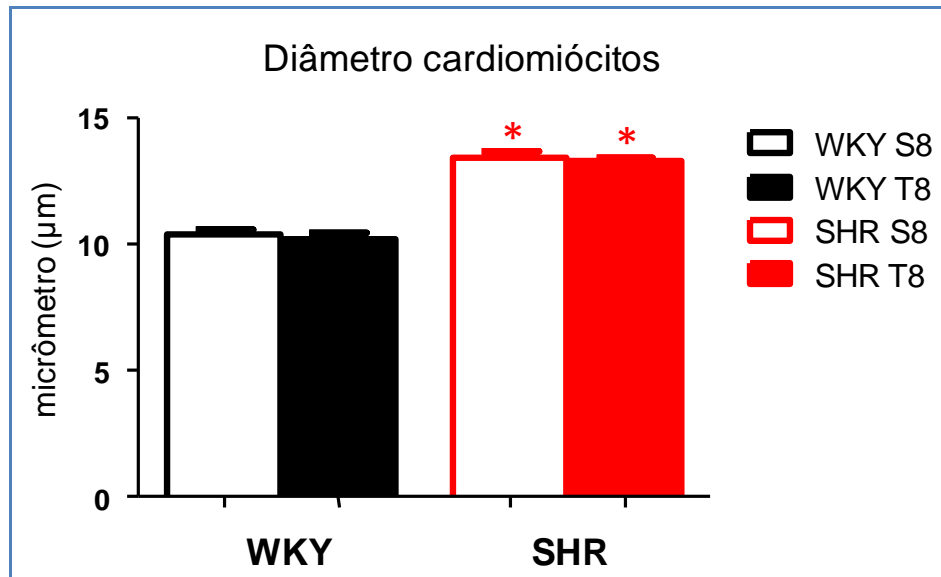


Figura 33 - Comparação do diâmetro dos cardiomiócitos nos grupos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao final da oitava semana de protocolos. Significâncias ($P < 0,05$): * vs WKY correspondente.

4.8.2 Expressão de genes indicadores da hipertrofia cardíaca

O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em resposta a estímulos patológicos e/ou fisiológicos é acompanhado da alteração da expressão de genes relacionados à produção de proteínas contráteis e estruturais do coração. Para investigarmos a expressão desses marcadores de hipertrofia, analisamos a expressão gênica de α -MHC, β -MHC, α -actina e ANP, genes comumente utilizados na caracterização da hipertrofia cardíaca. Como observado na tabela 8, ao início dos protocolos todos esses marcadores mostravam-se elevados no VE de SHR-S₀ quando comparados aos WKY-S₀ pareados por idade.

Tabela 8 - Valores basais (semana 0) da expressão gênica de α -MHC, β -MHC, α -actina e ANP em ratos WKY e SHR sedentários (S).

	WKY-S ₀	SHR-S ₀
α -MHC RNAm	1,11±0,22	2,68±0,57*
β -MHC RNAm	1,12±0,23	4,43±0,73*
α -actina RNAm	1,07±0,18	4,38±1,34*
ANP RNAm	1,19±0,35	9,99±1,22*

Legenda: α -MHC – alpha miosina de cadeia pesada; β -MHC – beta miosina de cadeia pesada; α -actina – alpha actina; ANP – peptide natriurético atrial. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente

Ao início dos protocolos a expressão de α -MHC era superior nos SHR vs. WKY (+141%, Figura 34A). Ambos, WKY e SHR mantidos sedentários por 8 semanas não apresentaram alterações na expressão de α -MHC. O treinamento promoveu em T₂ efeitos transitórios e antagônicos em WKY (aumento de 138%) e SHR (redução de 50%), com retorno aos níveis iniciais nos SHR-T₈, mas manutenção da elevação de α -MHC nos WKY-T₈ (+118% vs. WKY-S₀, figura 34A). Em função destas alterações ao longo das 8 semanas, não observamos ao final dos protocolos diferenças entre os grupos experimentais (figura 34B).

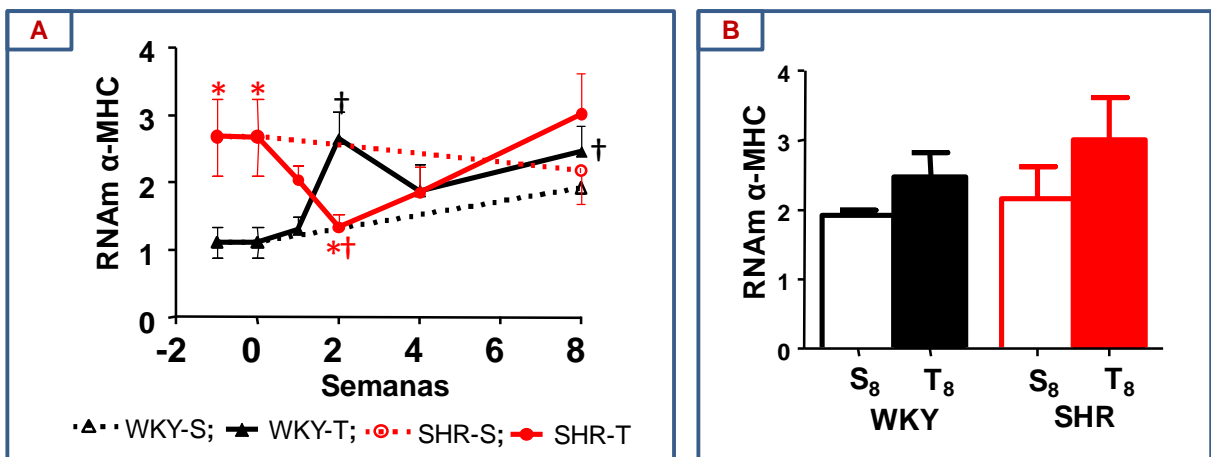


Figura 34 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da α -MHC em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de α -MHC ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀.

Também a expressão gênica de β -MHC, encontrava-se mais elevada nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ (+295%, Figura 35A). Não observamos alteração de β -MHC nos grupos sedentários após 8 semanas, apesar de tendência à redução nos SHR-S₈ e aumento nos WKY-T₈. O treinamento nos SHR evoluiu com queda na expressão de β -MHC entre T₁ (-37%) e T₄ com retorno aos níveis basais em T₈. Já nos WKY-T, observamos aumento na expressão de β -MHC em T₁ (+157%), o qual se manteve estável até T₈ (figura 35A). Ao final dos protocolos não observamos diferenças entre SHR e WKY treinados e sedentários (figura 35B).

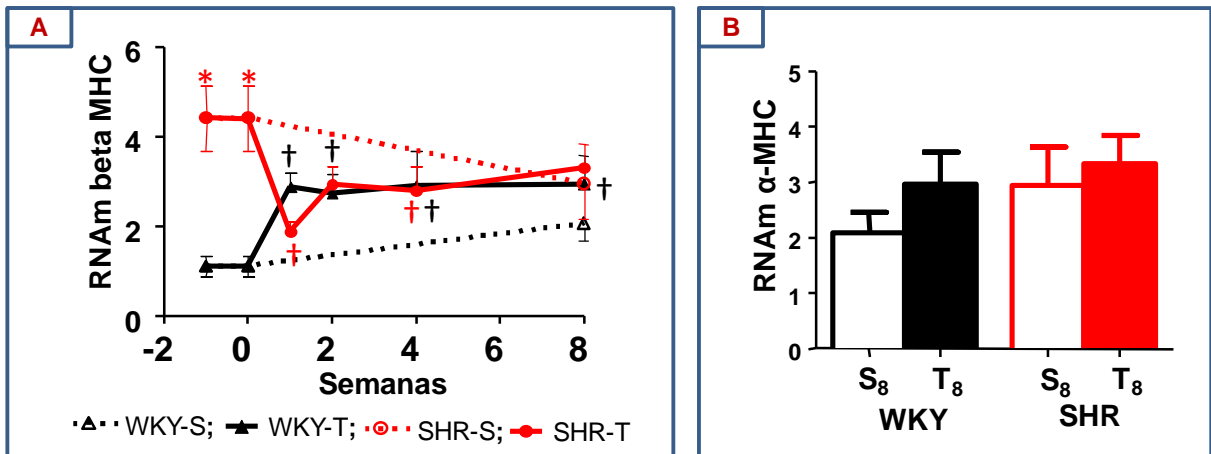


Figura 35 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da β -MHC em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de β -MHC ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S0.

Como observado para os marcadores especificados acima, também a expressão da α -actina encontrava-se significativamente elevada nos SHR-S0 em comparação com a dos WKY-S0 (+309%, figura 36A), sem alteração desses valores nos WKY e SHR mantidos sedentários por 8 semanas. Nos WKY houve durante o treinamento tendência a aumento da expressão de α -actina, que, no entanto, não atingiu níveis de significância. Já nos SHR-T observamos aumento significativo da expressão de α -actina em T₂ (+75%) seguido de pequena redução em T₄, mas aumento ainda mais intenso em T₈ (+165%, figura 36A). Desta forma, ao final das 8 semanas experimentais, a α -actina encontrava-se aumentada em SHR-S₈ vs. WKY-S₈ (+3,9 vezes) com aumento ainda mais intenso nos SHR-T₈ vs. SHR-S₈ (11,61±1,76 vs. 5,76±0,83, correspondendo a uma elevação de cerca de 2-vezes, figura 36B).

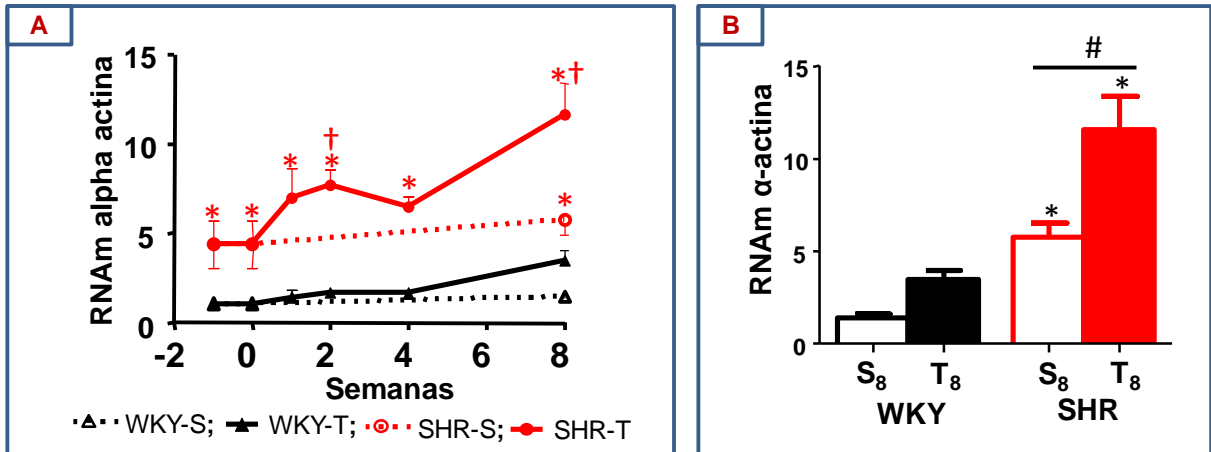


Figura 36 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de α -actina em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de α -actina ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

A expressão gênica de ANP, um importante marcador de hipertrofia cardíaca encontrava-se muito elevada nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ ($9,99 \pm 1,22$ vs $1,19 \pm 0,35$, correspondendo a um aumento de 8,4-vezes, figura 37A). À semelhança dos demais marcadores, 8 semanas de sedentarismo não ocasionaram alterações significativas na expressão de ANP de ambos os grupos. Nos WKY-T a expressão de ANP manteve-se estável nas 2 primeiras semanas, mas o treinamento aumentou sua expressão entre T₄ e T₈ (de $1,19 \pm 0,35$ na semana 0 para $7,80 \pm 1,48$). Nos SHR-T a expressão de ANP manteve-se inalterada até a 4^a. semana, apresentando uma intensa elevação em T₈ (de $9,99 \pm 1,50$ na semana 0 para $21,89 \pm 4,77$, um aumento de 2,2-vezes, figura 37A). Desta forma, ao final das 8 semanas experimentais, a α -actina expressão de ANP encontrava-se aumentada em SHR-S₈ vs. WKY-S₈ (+2,6 vezes) com aumento ainda mais intenso nos SHR-T₈ vs. SHR-S₈ ($21,99 \pm 4,77$ vs. $8,00 \pm 1,22$, correspondendo a uma elevação de 2,8-vezes, figura 37B).

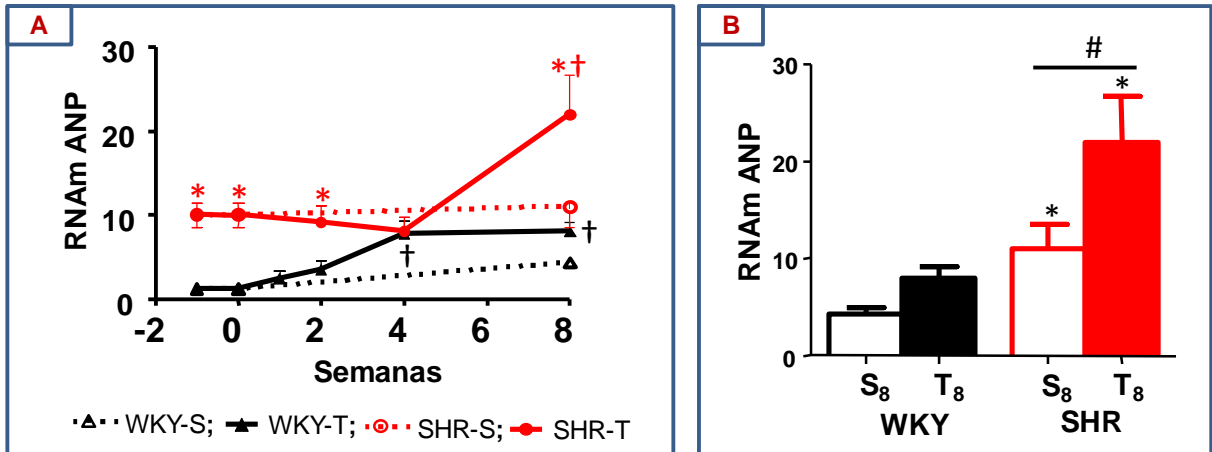


Figura 37 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm do ANP em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão do ANP ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.8.3 Análise da deposição de colágeno

Analizamos também o volume de deposição de colágeno por meio da marcação por picrossírius, que indica em vermelho o conteúdo total de colágeno tecidual. A Figura 38 ilustra para SHR e WKY representativos dos diferentes tempos experimentais, as alterações na deposição de colágeno induzidas pela hipertensão (maior nos SHR-S vs. WKY-S) e os efeitos do treinamento aeróbio (intensa redução da coloração avermelhada nos SHR-T₈ vs. SHR-S₈). Dados quantitativos confirmaram estas observações: no início dos protocolos já observávamos maior deposição de colágeno nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ ($6,06 \pm 0,27$ vs $5,09 \pm 0,25$ AU), a qual foi ainda mais intensificada nos SHR pela manutenção do sedentarismo por 8 semanas ($6,62 \pm 0,83$ AU), sem alteração da deposição de colágeno nos WKT mantidos sedentários (figura 39). O treinamento não alterou a deposição de colágeno nos WKY-T, mas determinou intensa redução do conteúdo de colágeno nos SHR-T₈ quando comparados aos SHR-S₈ ($6,76 \pm 0,81$ vs $9,62 \pm 0,83$ AU). Portanto o treinamento foi efetivo em evitar a deposição de colágeno induzida pela manutenção da hipertensão, reduzindo seus níveis no VE apenas nos SHR-T₈ (figura 39).

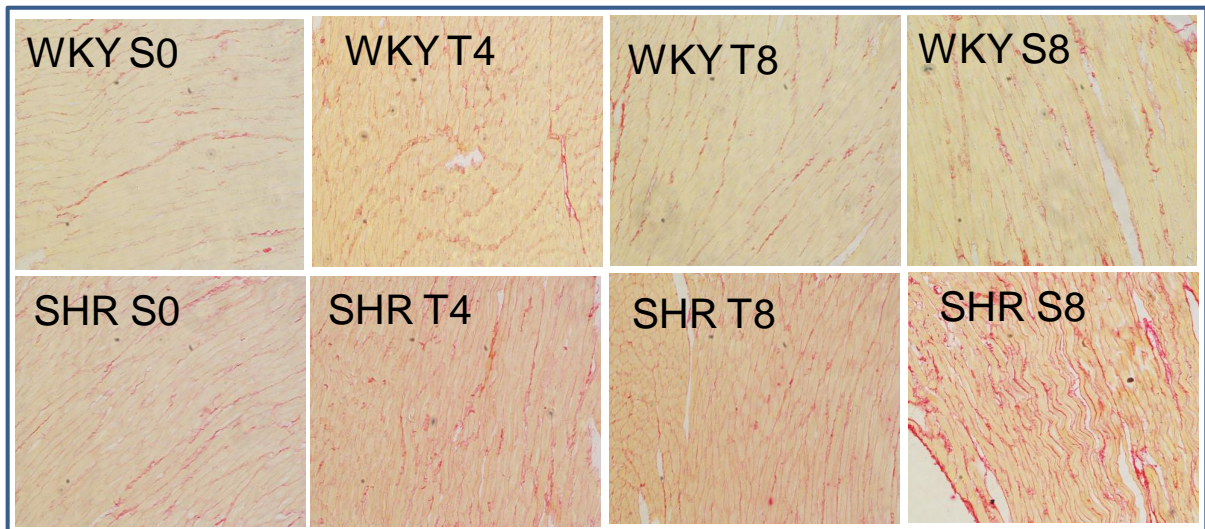


Figura 38 - Imagens representativas da deposição de colágeno em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) ao longo das 8 semanas experimentais

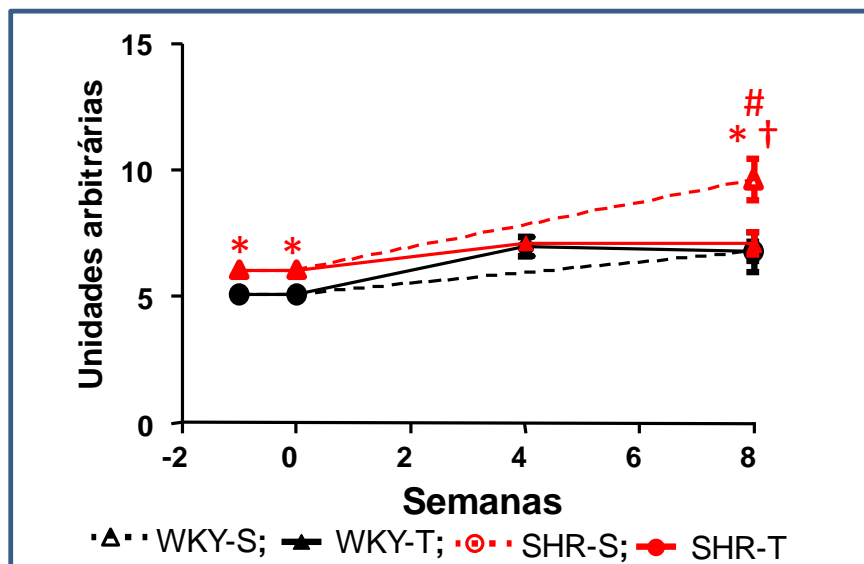


Figura 39 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e do sedentarismo (S) sobre a deposição de colágeno total em ratos WKY e SHR durante as 8 semanas experimentais.

4.8.4 Efeitos do treinamento sobre a síntese de colágeno no VE de WKY e SHR

Para melhor entendermos os efeitos da hipertensão associada ao treinamento sobre a deposição de colágeno no VE, analisamos também em todos os grupos experimentais a expressão gênica do colágeno I e III neste tecido. Ao início dos protocolos a expressão do RNAm de colágeno I mostrava-se significativamente elevada nos SHR-S₀ quando comparados aos WKY-S₀ ($5,97 \pm 1,37$ vs $1,18 \pm 0,35$ fold change, figura 40A). Durante as 8 semanas de sedentarismo a expressão de

colágeno I manteve-se inalterada em WKY-S, mas foi reduzida em 48% nos SHR-S₈. Por sua vez determinou a partir de T₂ tendência ao aumento de sua expressão no VE dos WKY-T, atingindo níveis de significância nos WKY-T₈ quando comparado à semana 0 (+180%, figura 40A). Em oposição a esta resposta, os SHR-T mostraram já em T₁ redução significativa da expressão gênica de colágeno I (-50%), que se manteve neste patamar até T₄, com ligeira elevação em T₈. A comparação da expressão gênica de colágeno I indicou efeitos significativos do grupo (P=0,049) e condição (P=0,025), mas sem atingir significância na comparação entre os 4 grupos experimentais (figura 40B).

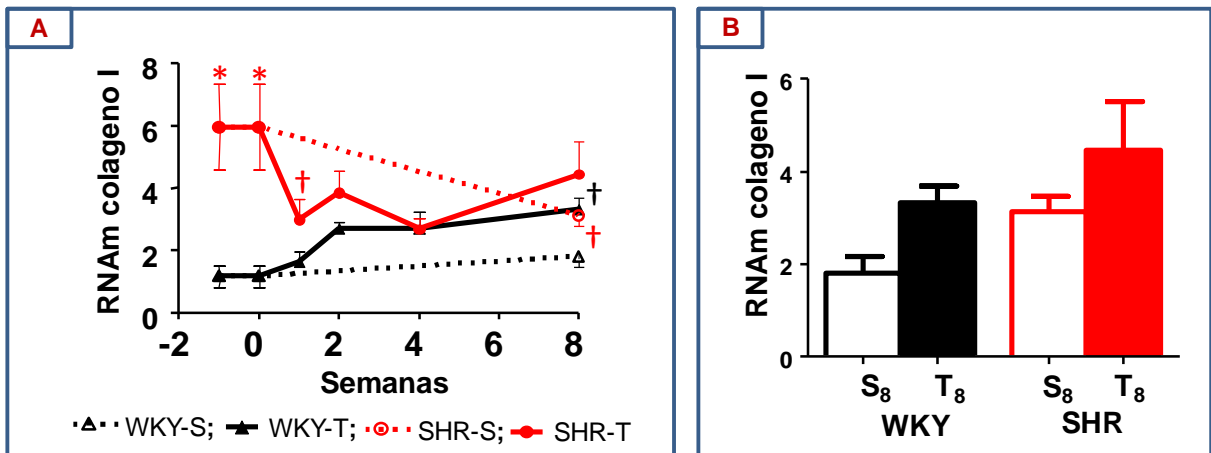


Figura 40 - **A.** Evolução temporal da expressão do RNAm de colágeno I em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de colágeno I ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀.

Também a expressão gênica de colágeno III mostrava-se mais elevada nos SHR-S₀ vs. WKY-S₀ ($3,71 \pm 0,87$ vs $1,17 \pm 0,32$ *fold change*, um aumento de 217%, figura 41A). Durante as 8 semanas de sedentarismo observamos tendência ao aumento da expressão nos WKY-S, mas redução significativa nos SHR-S₈ (-58%), quando comparados à semana 0. O treinamento foi acompanhado a partir de T₂ de tendência ao aumento da expressão de colágeno III no VE dos WKY-T, atingindo níveis de significância nos WKY-T₈ quando comparado à semana 0 (+147%, figura 41A). O treinamento determinou tendência à redução dos níveis de colágeno III nos

SHR-T₄ ($P > 0,05$), com retorno aos valores basais em T₈. A comparação da expressão gênica de colágeno III ao final dos protocolos indicava significância para o fator condição ($P = 0,034$), com aumento significativo nos SHR-T₈ quando comparados aos SHR-S₈ (+146%), sem diferenças entre WKY-T₈ e WKY-S₈ (figura 41B).

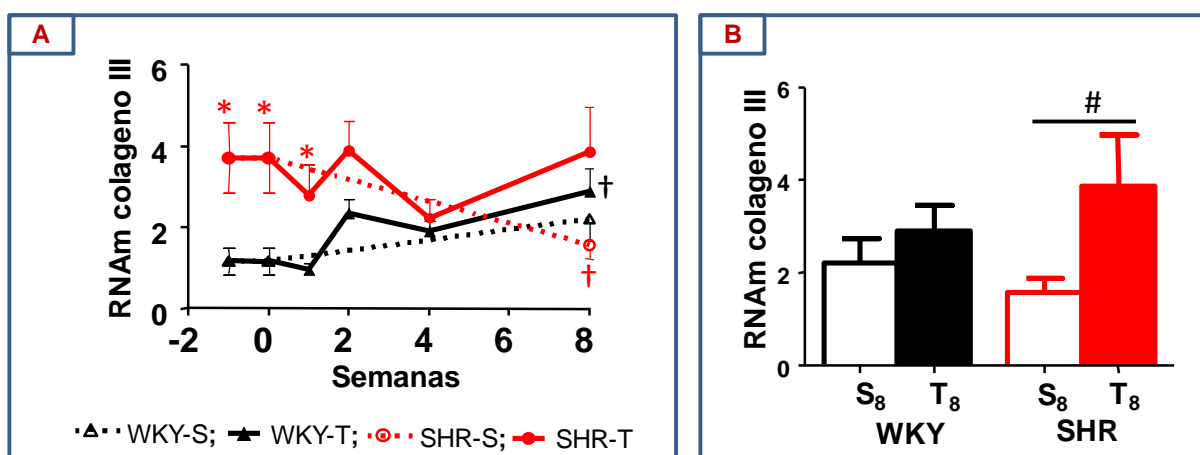


Figura 41 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm de colágeno III em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de colágeno III ao final das 8 semanas experimentais. Significâncias $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

4.8.5 Efeitos do treinamento sobre a expressão de genes envolvidos na regulação da degradação do colágeno

O balanço entre a síntese e degradação de colágeno é essencial para a manutenção do conteúdo ideal de colágeno no VE. Entre as enzimas envolvidas neste processo destacam-se as metaloproteínas de matriz extracelular (MMP) e os inibidores das metaloproteínas (TIMPS).

Ao início dos protocolos a expressão gênica de MMP2 era maior nos SHR-S₀ vs WKY-S₀ ($1,90 \pm 0,25$ vs $1,05 \pm 0,16$ *fold change*, correspondendo a uma elevação de 80%, figura 42A). A manutenção do sedentarismo por 8 semanas não causou nos WKY-S e SHR-S alterações significativas na expressão de MMP2. Por outro lado, observamos redução significativa mas transitória na expressão de MMP2 nos SHR entre T₂ e T₄ (queda de 43%, figura 42A), a qual retornou aos níveis basais em T₈. Já nos WKY-T a expressão de MMP2 manteve-se estável nas 2 primeiras semanas

de treinamento, apresentando tendência ao aumento entre T_4 e T_8 . Ao final dos protocolos a expressão de MMP2 mostrou-se elevada em SHR- S_8 vs. WKY- S_8 (+66%) e entre WKY- T_8 vs WKY- S_8 (+72%, figura 42B).

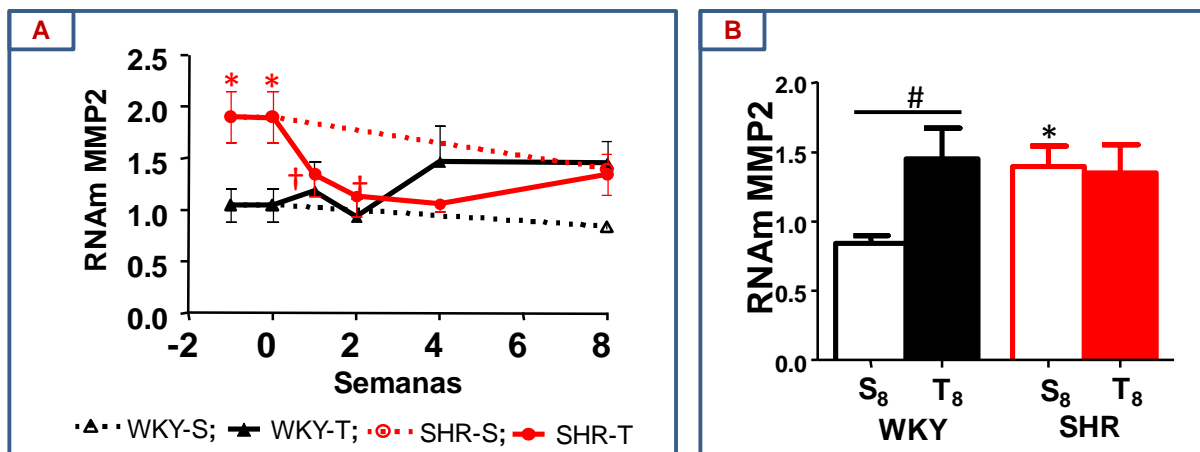


Figura 42 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da MMP2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão da MMP2 final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S_0 ; # T_8 vs S_8 .

A expressão de TIMP1 também estava aumentada em SHR- S_0 vs WKY- S_0 ($3,61 \pm 1,10$ vs $1,11 \pm 0,23$ fold change, correspondendo a uma elevação de 225%, figura 43A). Houve ligeira elevação nos grupos WKY-S e SHR-S, mas o sedentarismo não promoveu mudanças significativas de seu conteúdo. O treinamento não alterou a expressão de TIMP1 nos WKY-T, mas mostrou tendência à redução nos SHR-T entre T_4 - T_8 ($P > 0,05$, figura 43A). Após 8 semanas experimentais a expressão de TIMP1 encontrava-se aumentada nos SHR- S_8 vs WKY- S_8 (+2,2-vezes), mas reduzida nos SHR- T_8 vs SHR- S_8 (-53%, figura 43B).

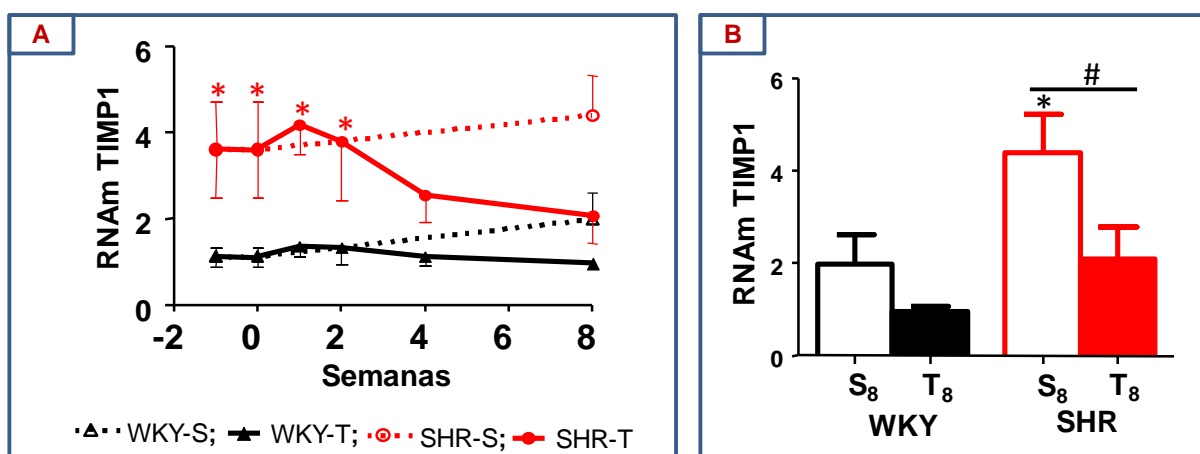


Figura 43 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da TIMP1 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de TIMP1 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente; † vs S₀; # T₈ vs S₈.

Também a expressão de TIMP2 mostrava-se elevada nos SHR-S₀ vs. WKY-S₀ ($4,11 \pm 1,64$ vs $1,14 \pm 0,27$ *fold change*, uma elevação de 260%, figura 44A). Tanto WKY como SHR não apresentaram alterações durante as de 8 semanas de sedentarismo. De modo similar, os grupos treinados também não apresentaram alterações na expressão de TIMP2, o que determinou durante todos os protocolos valores mais elevados nos grupos SHR (figura 44A). Ao término das 8 semanas experimentais a expressão de TIMP2 foi superior em SHR-T₈ (+253%) e SHR-S₈ (+172%) vs seus respectivos controles normotensos (figura 44B).

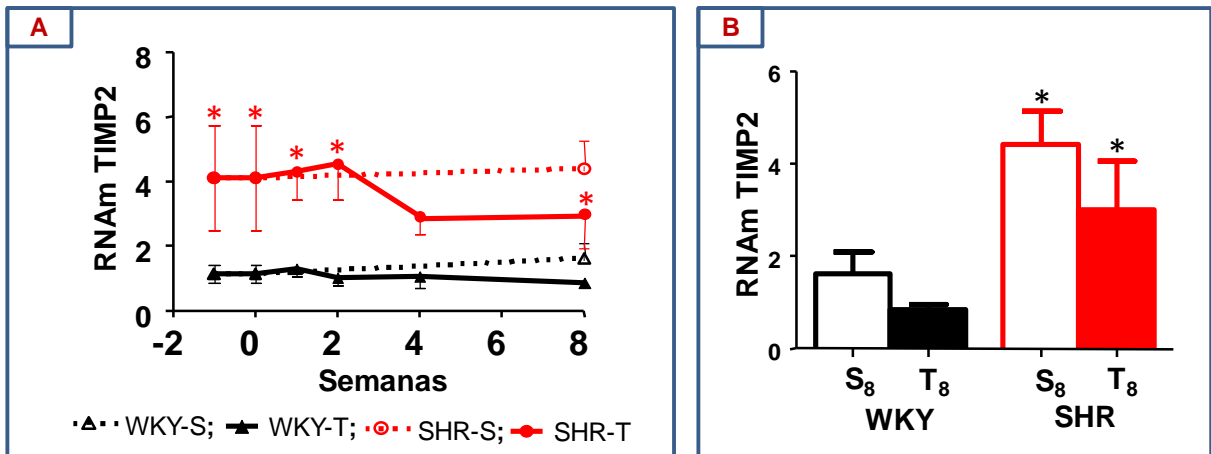


Figura 44 - A. Evolução temporal da expressão do RNAm da TIMP2 em ratos WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T). **B.** Comparação da expressão de TIMP2 ao final das 8 semanas experimentais. Significância $P < (0,05)$: * vs WKY correspondente.

5 DISCUSSÃO

Durante todo o protocolo experimental acompanhamos o desenvolvimento corporal dos grupos WKY e SHR pela mensuração do peso corporal total (g). Observamos que até a 4ª semana de protocolo SHR e WKY treinados e sedentários apresentaram desenvolvimento corporal similar como demonstrado pelo ganho de peso semelhante. No entanto na 8ª semana, SHR apresentaram menor peso corporal em relação aos WKY pareados por idade, fato que pode ser atribuído ao fato dos SHR serem simpatotônicos (BRODY e O'NEILL, 1984) o que implica em comportamento mais agitado, representando um maior gasto energético diário.

A análise da capacidade física por meio de testes de esforço ao longo dos nossos protocolos experimentais confirmou, como esperado, a potencialidade do treinamento aeróbio em aumentar similarmente o desempenho físico de WKY e SHR, bem como a manutenção do desempenho nos WKY e SHR mantidos sedentários repetindo dados de trabalhos anteriores do laboratório (79,145,150). Entre os fatores que contribuem para a melhora do desempenho físico decorrente do treinamento aeróbio destacamos a redução da resistência muscular esquelética e o aumento da densidade capilar na musculatura exercitada, o que já havíamos demonstrado tanto em WKY como SHR (10,145,151). O remodelamento arteriolar com redução da razão parede/luz assim como o aumento da capilarização muscular facilitam o aporte sanguíneo, o transporte e a captação de oxigênio contribuindo para o aumento do consumo máximo de oxigênio e conseqüentemente melhora do desempenho (10,151–153). O primeiro teste de esforço máximo também demonstrou que os SHR partem de um nível superior de desempenho quando comparados aos controles normotensos, condição atribuída a fatores comportamentais como a ansiedade (154), e/ou locomoção e fuga a estímulos

aversivos (155) características comuns dos SHR. Importante ressaltar que apesar da maior capacidade física dos SHR em relação aos WKY, o ganho observado após 8 semanas de treinamento foi exatamente o mesmo em ambos os grupos, demonstrando a similaridade do estímulo aplicado. Em relação aos animais mantidos sedentários, WKY não apresentaram alteração de desempenho, mas os SHR apresentaram pequeno declínio após 8 semanas que embora não tenha alcançado significância, sugere que o sedentarismo pode a longo prazo ser mais prejudicial para indivíduos hipertensos do que para os normotensos.

A melhora no desempenho físico nos WKY e SHR treinados confirma-se ainda pela menor FC de repouso tanto em relação a semana 0, observada já em T₄, como em relação aos controles S₈. A redução da frequência cardíaca, denominada na literatura científica de bradicardia de repouso é um efeito clássico do treinamento aeróbio o qual tem se reproduzido em estudos de nosso (10,60,79,142,143) e outros laboratórios (156,157). Adaptações a nível central e periférico encontram-se envolvidas no estabelecimento da bradicardia de repouso tanto em modelos de experimentação animal como em humanos. Diferentes estudos já demonstraram que a redução da frequência de disparos do nódulo sinoatrial, também conhecida como frequência intrínseca de marcapasso é um dos mecanismos responsáveis pela bradicardia de repouso (158–160). Com relação as adaptações neurais, estudos de nosso laboratório demonstraram a eficácia do treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade em facilitar a modulação ocitocinérgica ao complexo solitário-vagal dos indivíduos treinados (8,161), aumentando o tônus vagal e favorecendo a redução da FC de repouso, assim como a menor resposta taquicárdica ao exercício dinâmico observada em indivíduos treinados (150,162,163). Outros estudos demonstraram ainda redução do tônus simpático (161) bem como aumento da

atividade vagal ao coração (144,150). A bradicardia de repouso decorrente do treinamento aeróbio é também atribuída à melhora da eficiência contrátil do coração caracterizada pelo aumento do volume sistólico de ejeção, garantindo assim a manutenção do débito cardíaco apesar da FC reduzida (164).

Durante todo o período experimental os valores de PAM em SHR foram superiores em relação aos WKY, confirmando a presença da hipertensão neste modelo experimental de forma semelhante aos trabalhos da literatura (60,79,149,165). Um dos principais objetivos de intervenções tanto farmacológicas quanto não farmacológicas adotadas no tratamento da hipertensão arterial é a redução dos níveis pressóricos (2,166). Embora nosso protocolo de treinamento não tenha normalizado a PA dos SHR, ao final dos protocolos a PA foi parcial mas significativamente reduzida nos SHR-T₈ vs SHR-S₈. Especificamente, o treinamento impediu nos SHR treinados o aumento progressivo da PA conforme observado nos SHR sedentários, indicando que o treinamento neste lote de ratos foi iniciado pouco antes da estabilização da hipertensão a qual é geralmente observada ao redor dos 3 meses de idade (167). Nossos dados confirmam, portanto, a eficiência do treinamento aeróbio em manter os níveis de PA em um patamar inferior ao dos sedentários, o que é extremamente importante considerando que reduções mesmo que pequenas da PA diminuem significativamente a incidência de lesões em órgãos-alvo e eventos cardiovasculares. Reforçam ainda utilização do exercício aeróbio como medida preventiva em indivíduos que apresentam fatores de risco para doenças cardiovasculares (2,166). As análises dos dados funcionais mostrou, portanto, que a melhora da capacidade física nos animais treinados foi acompanhada de bradicardia de repouso em ambos os grupos e redução da PA nos

hipertensos treinados, resultados esses que vão de encontro a dados da literatura (1,60,110,139,144).

Vários estudos têm sugerido que os efeitos benéficos do treinamento aeróbio sobre o sistema cardiovascular são em parte mediados por alterações na expressão/ atividade do SRA induzidos pelo exercício (168–171). De fato, demonstramos recentemente que o treinamento aeróbio foi muito eficaz em reduzir a atividade do SRA pela intensa diminuição do conteúdo de Ang II e Ang (1-7) nas artérias aorta, carótida, renal e femoral de ratos SHR (60). Observamos também que sendo o SRA diferencialmente expresso em diferentes segmentos do leito arterial (concentrações mais elevadas na renal, intermediárias na femoral e carótida e menores na aorta), os efeitos do treinamento também diferiram entre os vasos, com maior magnitude de redução da Ang II em relação à Ang (1-7) na artéria renal, determinando menor razão Ang II/Ang (1-7) neste segmento arterial em relação aos SHR sedentários, o que constatamos contribuir para a redução da PA observada (60). A partir deste trabalho nos questionamos sobre a possibilidade do treinamento em corrigir diferencialmente a expressão/ativação do SRA em outros territórios como por exemplo o cardíaco, comparando-o ao plasmático. Para responder esta questão, analisamos os efeitos do treinamento aeróbio sobre parâmetros cardiovasculares simultaneamente à expressão de vários componentes do SRA nestes dois territórios. Além disto, para melhor entendermos os mecanismos que condicionam estas respostas, analisamos também alterações no balanço oxidativo, no perfil inflamatório e na hipertrofia cardíaca determinadas pelo treinamento em SHR e seus controles normotensos

Nossos dados demonstraram na fase crônica da hipertensão espontânea elevada concentração plasmática de Ang I em SHR-S vs WKY-S. Embora não

apresente ações biológicas conhecidas, a Ang I é um importante precursor da Ang II, via ECA, assim como da Ang (1-7), originada através de vias alternativas (49). Portanto, a elevada concentração de Ang I é um indicativo da hiperativação do SRA plasmático, além de ser condição essencial para a maior formação de Ang II em SHR. De fato, confirmamos maior conteúdo de Ang II plasmática nos SHR-S vs WKY-S na semana inicial dos protocolos (identificada como semana 0), condição esta que se manteve inalterada nos ratos mantidos sedentários por 8 semanas. Assim a maior PA observada nos SHR pode ser atribuída à elevada concentração de Ang II, a qual agindo em receptores AT_1 promove vasoconstrição (172,173). Por outro lado, não observamos diferenças no conteúdo plasmático de Ang (1-7) entre WKY-S₀ e SHR-S₀. A razão Ang II/Ang (1-7) plasmática mostrou-se ligeiramente superior em SHR-S₀ vs WKY-S₀, porém significativa ao término de 8 semanas de sedentarismo, confirmando assim nos hipertensos o desequilíbrio entre as ações da Ang II e da Ang (1-7), com predomínio da Ang II (47,174). Além da vasoconstrição, a Ang II ao ligar-se aos receptores AT_1 , ativa diferentes vias intracelulares que promovem o remodelamento vascular, a rarefação capilar e a facilitação da atividade nervosa simpática aos vasos, fatores estes que contribuem para o aumento da resistência vascular periférica e conseqüentemente da PA (107,173,175).

Para nossa surpresa, apesar da hipertensão já estabelecida nos SHR no início dos protocolos experimentais, não observamos diferenças no conteúdo cardíaco de Ang II entre SHR-S₀ e WKY-S₀. Porém, após 8 semanas de sedentarismo a Ang II cardíaca mostrava-se significativamente superior nos SHR-S₈ vs WKY-S₈. A análise temporal do perfil de angiotensinas no plasma e VE sugerem que a hiperativação do SRA plasmático precede a hiperativação do SRA cardíaco mostrando uma especificidade tecido-dependente, de maneira similar ao

anteriormente observado para os diferentes segmentos arteriais (60). O conteúdo de Ang (1-7) foi também similar entre WKY-S₀ e SHR-S₀ contribuindo para a igualdade da razão Ang II/Ang (1-7) no ventrículo esquerdo de normotensos e hipertensos na semana 0. Apesar da elevada PA observada nesta fase de vida dos SHR (3 meses de idade), o SRA cardíaco ainda se encontra em equilíbrio, como demonstrado pela igual proporção dos principais efetores dos 2 eixos do SRA. Esta condição foi, no entanto, perdida pela manutenção do sedentarismo uma vez que em 8 semanas após a razão AngII/Ang(1-7) estava aumentada em relação ao WKY-S₈ (47,174).

Observamos também que ao início dos protocolos a expressão de receptores AT₁ e Mas no VE foram superiores em SHR-S₀ vs WKY-S₀. Assim acreditamos que neste período (3 meses de idade) os efeitos deletérios em SHR desencadeados possivelmente pela ação da Ang II cardíaca, via receptores AT₁, possam ser contrabalançados pelas ações da Ang (1-7) via receptores Mas (136,176).

Em conjunto nossos dados sobre a evolução da expressão simultânea do SRA no plasma e coração indicaram que a hipertensão arterial nos SHR é acompanhada de aumento da atividade do SRA plasmático já aos 3 meses de idade enquanto que hiperativação do SRA cardíaco foi observada apenas ao final do protocolo de sedentarismo, quando a prole tinha 5 meses de idade. Em razão da enorme potencialidade deletéria hiperativação do SRA pelo eixo Ang II-ECA-receptor AT₁, o bloqueio farmacológico desta via tem sido amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial (177). Além disso, mudanças no estilo de vida que estimulam a prática regular de atividade física são também amplamente recomendadas por diversos estudos (2,139,166). Frente a estas observações

analisamos se os efeitos benéficos do treinamento aeróbio são extensivos ao SRA plasmático e cardíaco.

O treinamento determinou redução de Ang II tanto no plasma como coração de SHR e WKY, porém diferenças temporais e na magnitude da queda nos indicam que possivelmente o SRA plasmático e cardíaco respondem de maneira diferenciada ao exercício aeróbio de maneira similar ao observado em segmentos arteriais (60). Observamos que em SHR-T, a redução significativa do conteúdo plasmático de Ang II ocorreu em T₂ atingindo o máximo em T₄, ao passo que nos WKY-T a queda de Ang II ocorreu apenas em T₄. No coração a queda significativa e máxima da concentração de Ang II nos SHR-T ocorria já em T₁ ao passo que em WKY-T redução significativa só foi observada em T₄. Por outro lado, os conteúdos plasmático e cardíaco de Ang (1-7) responderam ao treinamento com aumentos similares e progressivos nos SHR-T e WKY-T. Ao compararmos estes resultados com os obtidos anteriormente em artérias novamente constatamos a uma resposta tecido-específica do SRA, uma vez que em artéria renal e femoral o conteúdo de Ang (1-7) foi reduzido pelo treinamento (60) ao passo que o conteúdo de Ang (1-7) se mostrava aumentado no plasma e VE dos SHR-T .

Em função da grande redução do conteúdo de Ang II e do aumento da Ang (1-7) no plasma e VE, o treinamento promoveu em ambos intensa redução da razão Ang II/Ang (1-7), indicando uma desativação seletiva do eixo Ang II-ECA-AT1 e o favorecimento do eixo Ang(1-7)-ECA2-receptor Mas, como observado anteriormente para vasos e cérebro em trabalhos de nosso laboratório (60,94). Realmente vários trabalhos da literatura têm mostrado a eficácia da redução do eixo vasoconstritor-proliferativo-pró-inflamatório assim como a potencialização do eixo vasodilatador-

anti-proliferativo-anti-inflamatório no tratamento de várias patologias que cursam com hiperativação do SRA(47,174).

Acreditávamos que as diferenças observadas no conteúdo de Ang II e Ang (1-7) fossem devido a alterações na atividade da ECA e ECA2 respectivamente, porém trabalhos anteriores não demonstraram alterações na atividade plasmática destas enzimas após treinamento aeróbio, sugerindo que o exercício pode também modular vias alternativas de produção destes peptídeos (60,178). Em relação ao coração, é também possível que o treinamento possa modular a atividade da quimase, enzima cardíaca que cliva Ang I em Ang II. Há também a possibilidade de que a redução das concentrações de Ang II e Ang (1-7) nos animais treinados seja devida à redução da expressão do angiotensinogênio, o precursor da síntese de todas as angiotensinas. Em apoio a esta possibilidade, demonstramos recentemente em áreas autonômicas de controle cardiovascular que o principal efeito do treinamento em reduzir a expressão/atividade do SRA cerebral de SHR é a pronta e extensa redução da síntese do angiotensinogênio nestas áreas (79,94). De fato, a redução no conteúdo de Ang I observada no plasma e VE dos SHR-T e WKY-T é em parte decorrente da redução da expressão do angiotensinogênio nestes territórios. Ainda o conteúdo reduzido de Ang I sugere que uma menor atividade da renina também possa estar envolvida neste processo (179). Um outro fator a ser considerado na redução da ativação do SRA subsequente ao treinamento é o tipo de exercício utilizado: o treinamento aeróbio em esteira foi eficaz em determinar '*downregulation*' do SRA plasmático e tecidual (79,94) e dados do presente trabalho, enquanto que o treinamento por natação (também realizado durante 8 semanas) não desencadeou alterações na concentração de Ang II no VE e de Ang (1-7) no plasma de SHR e ratos Wistar (148). A comparação desses dados indica ser o treinamento

aeróbico em esteira uma excelente prática a ser adotada para redução da atividade do SRA. Acreditamos, portanto, que a menor ativação do eixo vasoconstritor-proliferativo-pró-inflamatório do SRA desencadeada pelo treinamento em esteira esteja em parte modulando seus efeitos benéficos sobre as adaptações hemodinâmicas e cardíaca observadas nos SHR-T.

A associação das ações da Ang II com a hipertensão arterial nos sugere que a menor PA observada em SHR-T₈ vs SHR-S₈ é parcialmente devida à redução da disponibilidade de Ang II induzida pelo treinamento. Redução de Ang II plasmática em SHR foi também observada em 2 estudos que utilizaram o treinamento de natação por 8 semanas, porém em apenas um deles a PA foi reduzida ao final dos protocolos (149,180). Essa divergência na resposta da PA ao treinamento reforça ainda a importância da escolha do tipo de exercício, uma vez que estudos de nosso e outros grupos reportam repetidamente redução da PA quando se utiliza do treinamento aeróbico em esteira (60,110,143,144,181,182). Corroborando a ideia de que redução da biodisponibilidade da Ang II é capaz de reduzir a PA, diversos estudos utilizando antagonistas do receptor AT₁, inibidores da ECA e da renina, tem demonstrado grande eficiência na redução da PA (2,166,172).

Simultaneamente à redução da Ang II plasmática, a Ang (1-7) plasmática foi aumentada pelo treinamento. Sabe-se que ativação do receptor Mas pela Ang (1-7) desencadeia ações vasodilatadoras, anti-proliferativas e anti-inflamatórias, de forma que a maior biodisponibilidade de Ang (1-7) promovida pelo exercício aeróbico desponta como outro fator a determinar queda da PA em SHR-T₈. Embora os mecanismos envolvidos não estejam totalmente elucidados, sabe-se que a Ang (1-7) está relacionada com a maior liberação de óxido nítrico, um potente vasodilatador, o qual pode contribuir para a redução da PA (13). Em adição a seus efeitos sobre a

função endotelial e o tônus vascular, Ang (1-7) também apresenta efeitos opostos aos da Ang II em relação à proliferação celular no músculo liso vascular (175,183). Assim a normalização da razão parede/luz em ratos SHR treinados bem como aumento da rede capilar que foram associados à redução da PA em trabalhos anteriores de nosso laboratório (10,145,151), podem ter sido em parte condicionados pela alteração do balanço Ang II/Ang(1-7) demonstrada no presente trabalho.

Como a precoce desativação do SRA plasmático e cardíaco foi acompanhada de queda da PA e FC nos SHR-T, nosso próximo passo foi investigar se a redução da atividade do SRA nos SHR-T era acompanhada de alterações do estresse oxidativo, da inflamação e do remodelamento do VE.

Aos 3 meses de idade os SHR-S, além do maior conteúdo de Ang II plasmática, apresentaram também maior expressão gênica de enzimas geradoras de EROs (NOX2 e NOX4) e maior biodisponibilidade de EROs no VE quando comparados aos WKY-S. Sabe-se que a Ang II é um potente estimulador da atividade e expressão das NOXs bem como de suas subunidades reguladoras levando ao aumento da geração de EROs (15,107,114,184). Como ressaltado por Touyz e Schiffrin (2000) (15) a Ang II tem importante participação na maior biodisponibilidade de EROs nos hipertensos. De fato, no grupo SHR-S ao final de 8 semanas a razão AngII/Ang(1-7) plasmática e cardíaca mostrava-se elevada sendo acompanhada de aumento na expressão de NOX2 e maior estresse oxidativo no VE de SHR-S₈ quando comparado aos valores iniciais. No entanto, o acompanhamento dos efeitos temporais do treinamento e sedentarismo ao longo das 8 semanas experimentais nos impede de atribuir a maior biodisponibilidade de EROs no VE de SHR apenas à atividade das NOXs, uma vez que ao final dos protocolos a

expressão de ambas NOX2 e NOX4 no VE de SHR-S₈ eram similares à dos SHR-T₈, ao passo que a biodisponibilidade de EROs encontrava-se elevada nos SHR-S₈ e reduzida nos SHR-T₈. Embora inúmeros estudos tenham confirmado a potencialidade do exercício em reduzir o estresse oxidativo, o papel do treinamento sobre a atividade da NADPH oxidase bem como sobre a expressão de suas subunidades não se encontram completamente esclarecidos (120).

Deve-se ressaltar que os efeitos do treinamento sobre o SRA plasmático e tecidual e sobre o estresse oxidativo no coração (a partir de T₂) ocorreram mesmo com a manutenção de níveis pressóricos elevados, uma vez que a queda de PA induzida pelo treinamento foi parcial (-11% em T₈ vs S₈) e observada apenas na 8ª semana experimental. A dissociação entre os efeitos deletérios da hipertensão induzidos pela hiperatividade do SRA daqueles induzidos pela elevação da PA *per se* já foram demonstrados em ratos hipertensos por coarctação subdiafragmática da aorta tratados ou não com losartan nos quais se mostrou o papel crucial desempenhado pela Ang II (80,81,83,185). Além disso, embora não seja foco de nosso trabalho, tem-se demonstrado que a alta sobrecarga cardíaca desencadeada pela hipertensão pode levar à disfunção mitocondrial (as mitocôndrias são um dos maiores constituintes do coração) com o conseqüente aumento de produção de EROs (186,187).

Fato que chamou nossa atenção foi o aumento da expressão de NOX4 no VE de WKY-T mas não nos SHR-T quando comparados aos respectivos controles sedentários. A NOX4 é responsável principalmente pela produção de H₂O₂, à qual vem sendo atribuído importante papel cardioprotetor (188,189). Possivelmente, a maior expressão de NOX4 nos WKY-T₈, via sinalização iniciada pelo H₂O₂, pode ser

um dos mecanismos envolvidos na adaptação funcional do coração de normotensos ao treinamento (12,188).

Sabe-se que o aumento exacerbado da produção de EROs é usualmente combatido pelas enzimas antioxidantes, cuja ativação pode se mostrar deficiente na condição hipertensiva (106,190). De fato, nossos dados apontaram para uma deficiência na ativação e não propriamente na sua expressão, uma vez que a maioria das enzimas antioxidantes analisadas apresentaram expressão similar (catalase, NqO) ou mesmo aumentada (SOD, GpX, PRDX) nos SHR-S₀ quando comparados aos WKY-S₀, apesar dos hipertensos já apresentarem maior biodisponibilidade de EROs no VE. Além disso, a maior expressão de SOD, GpX e PRDX nos SHR-S₀ não se mostrou eficaz em reduzir os níveis de EROs nos SHR-S₀. Este prejuízo era ainda mais evidente ao final das 8 semanas de sedentarismo uma vez que a expressão das enzimas antioxidantes bem como atividade da catalase foram similares nos SHR-S₈ e WKY-S₈ ao passo que a biodisponibilidade de EROs encontrava-se aumentada nos SHR-S₈ vs WKY-S₈. Deve-se ter presente que além da maior atividade do eixo vasoconstritor, a redução da atividade do eixo vasodilatador nos SHR-S₈ quando comparados aos WKY-S₈ (indicado pela maior razão Ang II/Ang (1-7)) seria outro fator a contribuir para a redução das defesas antioxidantes nos SHR, uma vez que atividade antioxidante têm sido atribuídas à Ang (1-7) (137,191). A importância da Ang (1-7) como defesa antioxidante foi demonstrada por Lin e colaboradores (2016) (137) que descreveram que a redução da atividade da SOD no coração de camundongos subsequente à infusão de Ang II era minimizada pela co-infusão de Ang (1-7).

Importante ressaltar que o treinamento aeróbio foi eficaz em reverter o déficit antioxidante observado nos SHR além de melhorar esta defesa nos ratos

normotensos. O treinamento induziu em hipertensos e normotensos aumentos significativos na expressão da expressão da SOD, NqO, GPx, PRDx, com efeitos de maior magnitude nos SHR-T. Além disto, o treinamento aumentou a expressão e a atividade da catalase apenas nos SHR-T. A menor expressão das enzimas antioxidantes no VE dos hipertensos sedentários quando comparado a seus controles normotensos demonstra claramente o papel deletério da hipertensão associada ao sedentarismo sobre as defesas antioxidantes (119,120), o qual, como observamos no presente trabalho, foi prontamente revertido pelo treinamento aeróbio. A intensa e pronta redução da razão Ang II/Ang (1-7) observada no VE dos SHR-T desde a 1ª. semana de treinamento deve ter sido essencial para a redução da biodisponibilidade de EROs nos SHR-T, que se encontrava praticamente normalizada a partir de T₂. Realmente, vários trabalhos têm ressaltado os efeitos da Ang II e da Ang (1-7) em modificar o estresse oxidativo (115,116,192). Abordamos previamente o possível papel protetor da NOX4 via produção de H₂O₂ no coração de WKY (188). De encontro a esta hipótese, a inalteração tanto da expressão gênica como atividade da catalase nos WKY-T, fortalece a proposição de que a maior produção de H₂O₂, decorrente do aumento de NOX4 no VE dos WKY-T, não apresenta ações citotóxicas e sim promova melhora da função cardíaca como sugerido por(188,189). Este efeito não se encontrava presente no coração de hipertensos, indicando um possível efeito citotóxico do H₂O₂ no coração dos SHR e que os efeitos benéficos do treinamento nesta linhagem ocorra por outras vias (12,120).

A maior expressão de TNF- α no VE de SHR-S₀ vs WKY-S₀ indica a presença da inflamação crônica de baixo grau, condição frequentemente associada a hipertensão arterial (193,194). Os efeitos deletérios da hipertensão sobre a

inflamação cardíaca foram ainda mais evidentes ao final do protocolo de sedentarismo (ratos com cerca de 5 meses de idade) quando observamos aumentos significativos da expressão de TNF- α e IL-1 β no VE dos SHR-S₈ tanto em relação à semana 0 quanto em relação a seus controles normotensos. Nossos dados suportam a proposição de que este estado pró-inflamatório possa ser atribuído tanto às ações da Ang II como ao estresse oxidativo, em razão da potente capacidade pró-inflamatória destes agentes (195).

Interessante observar-se que as 2 primeiras semanas de treinamento desencadearam um aumento transitório na expressão de TNF- α e de IL-1 β no VE de SHR ao passo que os WKY não apresentaram variações significativas na expressão destas citocinas. Sabe-se que o exercício físico promove uma resposta inflamatória, que se prolonga por horas após o término da sessão de treinamento (196). Como nossos animais foram sacrificados em média 26 a 30 horas após a última sessão de treinamento, acreditamos que este efeito pró-inflamatório agudo possa ter sido prolongado nos SHR em virtude da ineficiência dos mecanismos de defesa anti-inflamatória na condição hipertensiva. Por outro lado, o retorno de TNF- α e IL-1 β aos níveis basais no VE de SHR ao término da 4ª semana de treinamento, associado ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 demonstra que cronicamente predomina o efeito anti-inflamatório do treinamento aeróbio, indicando sua eficácia no tratamento da hipertensão (119,144). Esta constatação é ainda mais evidente ao término dos protocolos quando a expressão de TNF- α e IL-1 β era inferior nos SHR-T₈ vs SHR-S₈ e similar a seus controles normotensos. Além disso, a expressão de IL-10 encontrava-se muito elevada nos SHR-T₈ vs SHR-S₈ bem como em relação aos controles normotensos. Nossos dados demonstram ainda que a redução da

razão AngII/Ang(1-7) além favorecer a menor pressão arterial nos SHR-T e reduzir o estresse oxidativo, contribuiu efetivamente a redução da inflamação.

Sabe-se que a hiperativação do SRA, associada ao estresse oxidativo e à inflamação desencadeiam o remodelamento deletério no coração de hipertensos. Uma vez demonstrado a eficiência do treinamento aeróbio em combater estes agentes, nosso próximo passo foi investigar as consequências destas adaptações sobre a estrutura cardíaca.

O cálculo das razões VE/CT e VE/PC assim como a quantificação do diâmetro dos cardiomiócitos indicaram intensa hipertrofia cardíaca nos SHR quando comparados aos WKY, durante todo o período experimental. Sabe-se que a instalação da hipertrofia cardíaca na hipertensão arterial representa inicialmente um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento da sobrecarga adicional imposta pela elevada resistência periférica (197,198). Além disso, os SHR apresentam um potente componente genético que desencadeia a hipertrofia cardíaca (165). O treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade em esteira não induziu alterações adicionais na hipertrofia cardíaca, uma vez que, ambos os grupos treinados e sedentários apresentaram valores similares e progressivos da razão VE/CT durante as 8 semanas experimentais e não observamos ao final dos protocolos diferenças no diâmetro dos cardiomiócitos entre os grupos treinados e sedentários. Já o aumento da razão VE/CT refletiu uma adaptação idade-dependente uma vez que Zheng e colaboradores demonstraram aumento progressivo (aos 2, 6, 12 e 18 meses) no peso do VE e peso total do coração em WKY e SHR (199). A maior razão VE/PC nos SHR-T₈ vs SHR-S₈, pode ser atribuída ao menor ganho de peso corporal observado nos SHR-T e não a um possível aumento da hipertrofia cardíaca. Além disso, o treinamento aeróbio de baixa a

moderada intensidade em esteira dificilmente promove hipertrofia cardíaca, a qual é geralmente observada no treinamento de natação (180,200,201).

A expressão do ANP, um importante indicador de hipertrofia cardíaca (202,203) também se encontrava elevado nos SHR-S₀ vs WKY-S₀, mantendo-se inalterada ao término das 8 semanas de sedentarismo. Sabe-se que sobrecarga cardíaca, como a observada em SHR, estimula a liberação de ANP, a qual agindo em receptores de peptídeos natriuréticos (NPR-A) antagoniza os efeitos deletérios induzidos pelo maior trabalho cardíaco bem como as ações de fatores hormonais como a Ang II (203). No entanto, acreditamos que frente o elevado conteúdo de Ang II presente no VE de SHR sedentários possa ser um fator limitante as ações benéficas do ANP no coração dos hipertensos. O treinamento aeróbio promoveu aumento da expressão ANP a partir de T₄ nos WKY e em T₈ nos SHR, de forma que ao final dos protocolos a expressão de ANP encontrava-se aumentada em ambos os grupos. Sabe-se também que além do envolvimento no controle da natriurese e diurese os peptídeos natriuréticos apresentam ações antifibróticas no coração e contribuem para melhorar a fração de ejeção (204,205). Assim, como sugerido por D'Souza et al., (2014) (160), Pescatello et al., (2004) (139) e Cornelissen et al., (2011) (156), propomos que o aumento da expressão de ANP concomitante à redução de Ang II e ao aumento de Ang (1-7) plasmática e cardíaca induzidos pelo treinamento tiveram participação relevante em se contrapor aos efeitos deletérios da hipertensão e do sedentarismo sobre o coração de SHR. O ANP possui ainda ações anti-inflamatórias (206), de forma que o aumento do ANP no VE de SHR treinados também deve ter contribuído para a redução das citocinas pró-inflamatórias no VE dos SHR.

A expressão gênica das proteínas contráteis do coração (α -MHC, β -MHC e α -actina) são também considerados marcadores de hipertrofia cardíaca (12). Nossos dados mostraram elevada expressão desses 3 marcadores no VE de SHR-S₀, quando comparados aos WKY-S₀; mas ao término de 8 semanas de sedentarismo apenas α -actina permanecia significativamente elevada. É possível que a redução da expressão de α -MHC e de β -MHC nos SHR mantidos sedentários, culminado inclusive com a perda de estruturas contráteis e menor atividade ATPase (207,208), possa ser um dos fatores a determinar a futura disfunção cardíaca. Esta condição é ainda agravada pelo aumento da deposição de colágeno levando à fibrose cardíaca. Inúmeros estudos tem de fato demonstrado perda da isoforma α -MHC e aumento da isoforma β -MHC com o avançar da idade com consequências negativas na função cardíaca (209,210). É provável que a maior expressão de proteínas contráteis no VE de SHR-S aos 3 meses de idade, quando da instalação da hipertensão crônica, seja um dos mecanismos a garantir funcionamento eficiente do VE frente à elevada sobrecarga cardíaca (12,207), situação esta que se deteriora com o aumento da atividade do eixo vasoconstritor, trófico, pró-oxidativo e pró-inflamatório do SRA observado entre o 3^o. e o 5^o. mês de idade.

Tratamentos farmacológicos têm se mostrado eficientes em preservar a expressão de α -MHC, facilitando a manutenção da função cardíaca (210). Nossos dados mostraram redução transitória da expressão gênica de α -MHC, β -MHC no VE de SHR em T₁-T₂ com retorno aos valores basais em T₈ sugerindo que o treinamento crônico não interfere com a expressão dessas estruturas contráteis. Já a expressão de α -actina foi significativamente aumentada pelo treinamento no VE dos SHR-T₂ com aumento adicional de grande magnitude sendo observado nos SHR-T₈. O treinamento também ativou precocemente a expressão de α -MHC e β -MHC no VE

dos WKY-T, mantendo-as elevadas até T₈ sem, no entanto, alterar a expressão da α -actina. Embora os efeitos do treinamento sobre a expressão de proteínas contráteis do VE tenham diferido entre SHR-T e WKY-T, houve aumentos significativos em ambos os grupos, sugerindo ser o treinamento aeróbio uma importante conduta para atenuar os efeitos deletérios da hipertensão sobre a contratilidade cardíaca.

Além das proteínas contráteis, o treinamento também reduziu significativamente a elevada expressão gênica de colágeno I e colágeno III (marcadores do colágeno maturo e imaturo, respectivamente, (211)) observada no VE dos SHR-S₀ aos 3 meses de idade e impediu o aumento da deposição de colágeno no VE (marcado pelo picrossirius red), que caracterizava a evolução dos SHR sedentários entre os 3 e 5 meses de idade. Embora a idade esteja associada ao acúmulo de colágeno (212–214), nossos dados demonstraram que este efeito ocorre precocemente nos SHR-S e que o treinamento foi eficaz em impedir o aumento de sua deposição nos SHR submetidos ao treinamento aeróbio.

A comparação da expressão gênica e proteica do colágeno durante os protocolos de treinamento e sedentarismo mostra resultados contraditórios. No entanto, estudos anteriores têm demonstrado que apesar do aumento da deposição idade-dependente da proteína (demonstrada nas análises histológicas), a expressão gênica do pró-colágeno I e III bem como colágeno I e III encontrava-se reduzida ou não apresentava alterações (213–215) indicando, como observado em nossos dados, uma interação inversa entre a expressão gênica e proteica de colágeno. Em conjunto esses resultados indicam que a instalação da hipertensão espontânea desencadeia alterações precoces nos processos de síntese e degradação de colágeno, alterações estas que na ausência da hipertensão são observadas apenas

em idades mais avançadas (212,216,217). Por outro lado, o treinamento ao impedir a redução da expressão gênica de ambos os tipos de colágeno no VE de SHR, deve proporcionar condições para a manutenção da renovação de colágeno, bem como impedir a reposição de colágeno estruturalmente defeituoso.

A manutenção da integridade da matrix extracelular é mediada principalmente pelas ações das MMPs, que determinam a taxa de degradação de colágeno e que estão sob controle das TIMPs, inibidoras específicas das MMPs (218,219). O padrão de expressão de TIMP-1 e TIMP-2 no VE de SHR-S₀ (significativamente elevadas em comparação aos WKY-S₀) sugere um perfil inibitório da degradação de colágeno, condição refletida pela maior deposição de colágeno nos SHR-S. Estudo prévio em ratos normotensos (220) havia demonstrado que o envelhecimento é acompanhado por aumento de TIMP, redução das MMPs e aumento da deposição de colágeno, indicando o potente efeito inibitório das TIMPs sobre as MMPs. Elevação similar das TIMPs e deposição aumentada de colágeno observados já aos 3 meses de vida em ratos SHR, sugerem uma aceleração deste processo na hipertensão arterial. O treinamento aeróbio novamente mostrou-se benéfico aos SHR uma vez que foi acompanhado de redução significativa da expressão de TIMP-1 e de TIMP-2, facilitando a ação das MMP-2 em degradar o colágeno, o que foi confirmado pela menor deposição de colágeno no VE dos SHR-T₈. Efeito similar já havia sido descrito no coração de ratos idosos (SHR de 21 meses e FBNF1 de 31 meses de idade) submetidos ao treinamento em esteira (110,220).

6 CONCLUSÕES

Nossos dados confirmam que a hipertensão arterial em SHR é acompanhada de hiperativação do SRA plasmático e tecidual. No entanto demonstramos pela primeira vez que a hiperatividade do eixo Ang II – ECA – AT₁ plasmático antecede sua hiperatividade no coração de ratos SHR. Atribuímos às ações da Ang II plasmática (via receptores AT₁) o elevado estresse oxidativo e perfil pró-inflamatório assim como a deposição de colágeno no VE de SHR ao início dos protocolos (3 meses de idade). Acreditamos que o conteúdo similar de Ang II no VE de SHR-S e WKY-S aliado a ações cardioprotetoras da Ang (1-7) conferem certa proteção ao coração nesta fase da hipertensão. Já aos 5 meses de idade a manutenção do desequilíbrio Ang II / Ang (1-7) tanto plasmática quanto cardíaca que foi acompanhada nos SHR-S de agravamento do estresse oxidativo, perfil pró-inflamatório e remodelamento deletério do VE e aumento progressivo da PA.

O treinamento aeróbio nos SHR promoveu pronta redução da hiperatividade do SRA cardíaco (T₁) e plasmático (T₂) com redução simultânea do estresse oxidativo e correção mais tardia (T₄-T₈) do perfil inflamatório no VE. Estas respostas ao treinamento aeróbio foram essenciais para evitar o aumento progressivo da PA observada nos SHR-S. Contribuíram também para evitar a progressão do remodelamento deletério do VE observado nos SHR-S, preservando a funcionalidade do ventrículo esquerdo nos SHR-T.

REFERÊNCIAS*

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206–52.
2. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1 Suppl):1–51.
3. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507–20.
4. Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation*. 2016;133(4):422–33.
5. Seravalle G, Mancia G, Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2014;21(2):89–105.
6. Smolensky MH, Hermida RC, Portaluppi F. Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning. *Sleep Med Rev*. 2016 Mar 2;
7. Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R264-71.
8. Cruz JC, Cavalleri MT, Ceroni A, Michelini LC. Peripheral chemoreceptors mediate training-induced plasticity in paraventricular nucleus pre-autonomic oxytocinergic neurons. *Exp Physiol*. 2013;98(2):386–96.
9. Amaral SL, Michelini LC. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):814–26.
10. Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000;18(11):1563–72.
11. Chen HI. Hemodynamic mechanism of ventricular hypertrophy in hypertension. *Chin J Physiol*. 2012;55(6):369–79.
12. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191–227.
13. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:439–65.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

14. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747–803.
15. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):639–72.
16. Tigersted R, Bergman P. Niere und kreilauf. *Skand Arch Physiol.* 1898;8:223–71.
17. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2001;38(6):1246–9.
18. Hall JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol.* 2003;24(1):27–39.
19. Skrbic R, Igc R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides.* 2009;30(10):1945–50.
20. Ben-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1988;255(1 Pt 1):E70-9.
21. Peart WS. Evolution of renin. *Hypertension.* 1991;18(5 Suppl):III100-108.
22. James MN, Sielecki AR. Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinase penicillopepsin. *Biochemistry.* 1985;24(14):3701–13.
23. Skeggs LT, Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med.* 1956;104(2):193–7.
24. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(4):177–83.
25. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(14):8258–63.
26. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):E1-E9.
27. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(9):1716–22.
28. Turner AJ. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 3):723–7.
29. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 1993;268(33):24543–6.
30. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(33):24539–42.
31. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* 1991;351(6323):233–6.

32. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6323):230–3.
33. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415–72.
34. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(9):1001–15.
35. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 1986;45(5):711–9.
36. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*. 1988;335(6189):437–40.
37. Cheng Q, Leung PS. An update on the islet renin-angiotensin system. *Peptides*. 2011;32(5):1087–95.
38. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1993;87(6):1816–28.
39. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011;32(10):2141–50.
40. Unger T, Paulis L, Sica DA. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin–angiotensin–aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur Heart J*. 2011;32(22):2739–47.
41. Ferreira AJ, Santos R a. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(4):499–507.
42. Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):703–9.
43. Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 2002;39(3):799–802.
44. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000;91(1–3):45–62.
45. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996;27(3 Pt 2):523–8.
46. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(1):388–98.
47. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1997;30(3 Pt 2):535–41.
48. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006;47(3):515–21.
49. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008;86(6):615–21.

50. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest.* 1986;78(1):31–9.
51. Bader M, Ganten D. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med.* 2000;78(3):130–9.
52. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest.* 1986;78(1):31–9.
53. Endo-Mochizuki Y, Mochizuki N, Sawa H, Takada A, Okamoto H, Kawaguchi H, et al. Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts. *Heart Vessels.* 1995;10(6):285–93.
54. Paul M, Wagner D, Metzger R, Ganten D, Lang RE, Suzuki F, et al. Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. *J Hypertens.* 1988;6(3):247–52.
55. Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp MGF, et al. Functional significance of prorenin internalization in the rat heart. *Circ Res.* 2002;90(10):1135–41.
56. Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ, et al. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1995;29(1):57–64.
57. Urata H, Strobel F, Ganten D. Widespread tissue distribution of human chymase. *J Hypertens Suppl.* 1994;12(9):S17–22.
58. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens.* 2000;13(1 Pt 2):31S–8S.
59. Saito K, Gutkind JS, Saavedra JM. Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat hearts. *Am J Physiol.* 1987;253(6 Pt 2):H1618–22.
60. Silva 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.
61. Müller DN, Hilgers KF, Bohlender J, Lippoldt A, Wagner J, Fischli W, et al. Effects of human renin in the vasculature of rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension.* 1995;26(2):272–8.
62. Naftilan AJ. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994;3(2):218–27.
63. Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.* 1989;7(12):933–6.
64. Ekker M, Tronik D, Rougeon F. Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(13):5155–8.
65. Hilgers KF, Kuczera M, Wilhelm MJ, Wiecek A, Ritz E, Ganten D, et al. Angiotensin formation in the isolated rat hindlimb. *J Hypertens.* 1989;7(10):789–98.
66. Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol.* 2008;93(5):528–37.

67. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M, et al. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens.* 2000;2(6):418–24.
68. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RAS, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension.* 2007;50(6):1093–8.
69. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension.* 2008;51(2):574–80.
70. Darby IA, Sernia C. In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res.* 1995;281(2):197–206.
71. Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, et al. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol.* 1988;254(6 Pt 2):F900-906.
72. Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest.* 1990;85(2):417–23.
73. Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest.* 1988;59(6):789–97.
74. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 2):F437-446.
75. Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, da Silveira KD, da Silva DA, Santos SHS, et al. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int.* 2009;75(11):1184–93.
76. Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 2006;168(6):1808–20.
77. Tikellis C, Bialkowski K, Pete J, Sheehy K, Su Q, Johnston C, et al. ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes. *Diabetes.* 2008;57(4):1018–25.
78. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* 2007;171(2):438–51.
79. 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.
80. Sangaleti CT, Crescenzi A, Michelini LC. Endogenous angiotensin and pressure modulate brain angiotensinogen and AT1A mRNA expression. *Hypertension.* 2004;43(2):317–23.
81. Bezerra SM, dos Santos CM, Moreira ED, Krieger EM, Michelini LC. Chronic AT(1) receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):569–75.

82. Michelini LC, Bonagamba LG. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension*. 1990;15(2 Suppl):I45-50.
83. dos Santos CM, Moreira ED, Krieger EM, Michelini LC. Chronic AT1 receptor blockade alters aortic nerve activity in hypertension. *Hypertension*. 1998;31(4):973-7.
84. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res*. 2009;32(7):533-6.
85. Ribeiro FA, Florencio L. Bloqueio farmacológico do sistema renina angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2000;3:293-302.
86. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-9.
87. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(47):17985-90.
88. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*. 2000;101(10):1130-7.
89. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;59(3):251-87.
90. Casarini DE, Carmona AK, Plavnik FL, Zanella MT, Juliano L, Ribeiro AB. Calcium channel blockers as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Hypertension*. 1995;26(6 Pt 2):1145-8.
91. Casarini DE, Plavnik FL, Zanella MT, Marson O, Krieger JE, Hirata IY, et al. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(1):75-85.
92. Marques GDM, Quinto BMR, Plavnik FL, Krieger JE, Marson O, Casarini DE. N-domain angiotensin I-converting enzyme with 80 kDa as a possible genetic marker of hypertension. *Hypertension*. 2003;42(4):693-701.
93. Teixeira AMS, Plavnik FL, Fernandes FB, Marson O, Christofalo DMJ, Ajzen SA, et al. Association of urinary 90 kDa angiotensin-converting enzyme with family history of hypertension and endothelial function in normotensive individuals. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(5):351-6.
94. 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. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0137395.
95. Zucker IH, Schultz HD, Patel KP, Wang W, Gao L. Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(5):H1557-H66.
96. Shimizu M, Tanaka R, Uchida M, Orito K, Shimamura S, Yamane Y. Effect of Angiotensin II Type 1 receptor blocker on cardiac angiotensin-converting enzyme and

- chymase-like activities, and cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *J Vet Med Sci.* 2006;68(3):227–33.
97. Nakamura Y, Ono H, Zhou X, Frohlich ED. Angiotensin type 1 receptor antagonism and ACE inhibition produce similar renoprotection in N(omega)-nitro-L>-arginine methyl ester/spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;37(5):1262–7.
 98. Pu Q, Larouche I, Schiffrin EL. Effect of dual angiotensin converting enzyme/neutral endopeptidase inhibition, angiotensin converting enzyme inhibition, or AT1 antagonism on coronary microvasculature in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2003;16(11 Pt 1):931–7.
 99. Teng J, Fukuda N, Suzuki R, Takagi H, Ikeda Y, Tahira Y, et al. Inhibitory effect of a novel angiotensin II type 1 receptor antagonist RNH-6270 on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: different anti-proliferative effect to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39(2):161–71.
 100. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(8):589–600.
 101. Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today.* 2011;16(1–2):22–34.
 102. Dempsey PJ, McCallum ZT, Kent KM, Cooper T. Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am J Physiol.* 1971;220(2):477–81.
 103. Koch-Weser J. MYOCARDIAL ACTIONS OF ANGIOTENSIN. *Circ Res.* 1964;14:337–44.
 104. Moura D, Pinheiro H, Paiva MQ, Guimarães S. Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels. *J Auton Pharmacol.* 1999;19(6):321–5.
 105. Devereux RB, Pickering TG, Harshfield GA, Kleinert HD, Denby L, Clark L, et al. Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation.* 1983;68(3):470–6.
 106. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12(2):135–42.
 107. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2007;292(1):C82–97.
 108. Yin G, Yan C, Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):780–3.
 109. Sriramula S, Francis J. Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. *PLoS ONE.* 2015;10(9):e0138372.
 110. Rossoni LV, Oliveira RAF, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011;29(12):2349–58.
 111. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation.* 2000;102(16):1874–6.

112. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension*. 1995;25(6):1252–9.
113. Suo M, Hautala N, Földes G, Szokodi I, Tóth M, Leskinen H, et al. Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2002;39(3):803–8.
114. Farag E, Maheshwari K, Morgan J, Sakr Esa WA, Doyle DJ. An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesth Analg*. 2015;120(2):275–92.
115. Cifuentes ME, Rey FE, Carretero OA, Pagano PJ. Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(5):H2234-H40.
116. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(12):2164–71.
117. Kakishita M, Nakamura K, Asanuma M, Morita H, Saito H, Kusano K, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through angiotensin II type 1a receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42 Suppl 1:S67-70.
118. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;302(2):148–58.
119. Agarwal D, Haque M, Sriramula S, Mariappan N, Pariaut R, Francis J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2009;54(6):1393–400.
120. Briones AM, Touyz RM. Moderate exercise decreases inflammation and oxidative stress in hypertension: but what are the mechanisms? *Hypertension*. 2009;54(6):1206–8.
121. Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(1):H111-H5.
122. Echem C, Bomfim GF, Ceravolo GS, Oliveira MA, Santos-Eichler RA, Bechara LR, et al. Anti-toll like receptor 4 (TLR4) therapy diminishes cardiac remodeling regardless of changes in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Int J Cardiol*. 2015;187:243–5.
123. Jia L, Li Y, Xiao C, Du J. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:221–31.
124. Wang Y, Li Y, Wu Y, Jia L, Wang J, Xie B, et al. 5TNF- α and IL-1 β neutralization ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage in male mice. *Endocrinology*. 2014;155(7):2677–87.
125. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):477–92.

126. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004;383(Pt 1):45–51.
127. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14838–43.
128. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(2):H736–742.
129. Loot AE, Roks AJM, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJH, Boomsma F, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation.* 2002;105(13):1548–50.
130. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1560–H6.
131. Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, et al. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regul Pept.* 2012;175(1–3):30–42.
132. Qi Y, Shenoy V, Wong F, Li H, Afzal A, Mocco J, et al. Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1-7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology. *Exp Physiol.* 2011;96(9):863–74.
133. Zhong J, Basu R, Guo D, Chow FL, Byrns S, Schuster M, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation.* 2010;122(7):717–28, 18 p following 728.
134. Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RAS, Katovich MJ, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol.* 2011;96(3):287–94.
135. McCollum LT, Gallagher PE, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. *Peptides.* 2012;34(2):380–8.
136. McKinney CA, Fattah C, Loughrey CM, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin Sci.* 2014;126(12):815–27.
137. Lin L, Liu X, Xu J, Weng L, Ren J, Ge J, et al. Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2016;20(1):48–57.
138. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, et al. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008;103(11):1319–26.
139. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA, et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36:533–53.

140. Barengo NC, Hu G, Kastarinen M, Lakka TA, Pekkarinen H, Nissinen A, et al. Low physical activity as a predictor for antihypertensive drug treatment in 25-64-year-old populations in eastern and south-western Finland. *J Hypertens*. 2005;23(2):293–9.
141. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):464–78.
142. Amaral SL, Silveira NP, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19(5):931–40.
143. 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.
144. 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* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2014 Oct 21];9(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006803/>
145. Melo RM, Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003;42(4):851–7.
146. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. *Hypertension*. 1995;25(5):928–34.
147. Ronchi FA, Andrade MCC, Carmona AK, Krieger JE, Casarini DE. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005;23(10):1869–78.
148. Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008;93(5):589–98.
149. Zamo FS, Barauna VG, Chiavegatto S, Irigoyen MC, Oliveira EM. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2011;89(3–4):93–9.
150. Higa-Taniguchi KT, Felix JVC, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Exp Physiol*. 2009;94(11):1103–13.
151. 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*. 2008;52(3):514–21.
152. Melo RM, Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003;42(4):851–7.
153. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Saucedo E, Henry R, Wagner PD. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H772–H8.

154. Kulikov A, Aguerre S, Berton O, Ramos A, Mormede P, Chaouloff F. Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281(2):775–84.
155. Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res*. 1997;85(1):57–69.
156. Cornelissen VA, Goetschalckx K, Verheyden B, Aubert AE, Arnout J, Persu A, et al. Effect of endurance training on blood pressure regulation, biomarkers and the heart in subjects at a higher age. *Scand J Med Sci Sports*. 2011;21(4):526–34.
157. Vêras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 2):H2627-H31.
158. Negrão CE, Moreira ED, Brum PC, Denadai ML, Krieger EM. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(10):1045–52.
159. Boyett MR. “And the beat goes on.” The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol*. 2009;94(10):1035–49.
160. D’Souza A, Bucchi A, Johnsen AB, Logantha SJRJ, Monfredi O, Yanni J, et al. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat Commun*. 2014;5:3775.
161. Gava NS, Vêras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;26(6 Pt 2):1129–33.
162. Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(2):R537-R45.
163. Michelini LC. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(4):369–76.
164. Clausen JP. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiol Rev*. 1977;57(4):779–815.
165. Folkow B. Comments on “endpoints in hypertension”: peripheral resistance vessels—though mainly on their involvement as “starting-points.” *Blood Press Suppl*. 1997;2:34–8.
166. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159–219.
167. Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension*. 1979;1(5):508–17.
168. Gao L, Wang W, Liu D, Zucker IH. Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure. *Circulation*. 2007;115(24):3095–102.

169. Gu Q, Wang B, Zhang X-F, Ma Y-P, Liu J-D, Wang X-Z. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(5):298–305.
170. Kar S, Gao L, Zucker IH. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol*. 2010;108(4):923–32.
171. Rush JWE, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(1):162–72.
172. Castrop H. A role for AT1 receptor-associated proteins in blood pressure regulation. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;21:43–7.
173. De Mello WC. Intracellular angiotensin II as a regulator of muscle tone in vascular resistance vessels. Pathophysiological implications. *Peptides*. 2016;78:87-90
174. Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(1):1–6.
175. Sheng-Long C, Yan-Xin W, Yi-Yi H, Ming F, Jian-Gui H, Yi-Li C, et al. AVE0991, a Nonpeptide Compound, Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Induction of Heme Oxygenase-1 and Downregulation of p-38 MAPK Phosphorylation. *Int J Hypertens*. 2012;2012:958298.
176. González A, López B, Querejeta R, Díez J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertensive heart disease? *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(12):1585–93.
177. Williams B. Drug discovery in renin-angiotensin system intervention: past and future. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2016 Apr 27;
178. Lo J, Patel VB, Wang Z, Levasseur J, Kaufman S, Penninger JM, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 antagonizes angiotensin II-induced pressor response and NADPH oxidase activation in Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2013;98(1):109–22.
179. Sen S, Sabırlı S, Ozyiğit T, Uresin Y. Aliskiren: review of efficacy and safety data with focus on past and recent clinical trials. *Ther Adv Chronic Dis*. 2013;4(5):232–41.
180. Filho AG, Ferreira AJ, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008;93(5):589–98.
181. Chen Y, Zhang H, Zhang Y, Lu N, Zhang L, Shi L. Exercise intensity-dependent reverse and adverse remodeling of voltage-gated Ca(2+) channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2015;38(10):656–65.
182. Gu Q, Zhao L, Ma Y-P, Liu J-D. Contribution of mitochondrial function to exercise-induced attenuation of renal dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2015;406(1–2):217–25.
183. Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2003;42(4):574–9.
184. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245–313.

185. Santos CM, Pontieri V, Leomil Neto M, Michelini LC. Losartan improves baroreflex control of heart rate of coarcted hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1995;269(3 Pt 2):H812-H8.
186. Campos JC, Gomes KMS, Ferreira JCB. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:107–19.
187. Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2010;7(2):e95–102.
188. Avner BS, Hinken AC, Yuan C, Solaro RJ. H₂O₂ alters rat cardiac sarcomere function and protein phosphorylation through redox signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(3):H723-H30.
189. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, et al. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(2):295–307.
190. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*. 2003;41(5):1096–101.
191. Papinska AM, Soto M, Meeks CJ, Rodgers KE. Long-term administration of angiotensin (1-7) prevents heart and lung dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes (db/db) by reducing oxidative stress, inflammation and pathological remodeling. *Pharmacol Res*. 2016;107:372–80.
192. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(10):1110–20.
193. Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, Giachini FR, Akamine EH, Tostes RC, et al. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci*. 2012;122(11):535–43.
194. Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(2):203–7.
195. Li W-J, Liu Y, Wang J-J, Zhang Y-L, Lai S, Xia Y-L, et al. “Angiotensin II memory” contributes to the development of hypertension and vascular injury via activation of NADPH oxidase. *Life Sci*. 2016;149:18–24.
196. Ulven SM, Foss SS, Skjølsvik AM, Stadheim HK, Myhrstad MC, Rael E, et al. An acute bout of exercise modulate the inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells in healthy young men. *Arch Physiol Biochem*. 2015;121(2):41–9.
197. Mill JG, Vassalo DV. Hipertrofia cardíaca. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001;8(1):63–75.
198. Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009;10(1):15–23.

199. Zheng Q, Chen P, Xu Z, Li F, Yi XP. Expression and redistribution of β -catenin in the cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *J Mol Histol*. 2013;44(5):565–73.
200. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(2):R381-387.
201. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011;58(2):182–9.
202. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(26):14730–5.
203. Silver MA. The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(1):14–21.
204. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, et al. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res*. 2004;94(4):453–61.
205. Kuhn M. Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice. *Peptides*. 2005;26(6):1078–85.
206. Silva ACS, Pinheiro SVB, dos Santos RAS. Peptides and interaction heart-kidney. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2008;15(3):134–43.
207. Carnes CA, Geisbuhler TP, Reiser PJ. Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J Appl Physiol*. 2004;97(1):446–53.
208. Effron MB, Bhatnagar GM, Spurgeon HA, Rúaño-Arroyo G, Lakatta EG. Changes in myosin isoenzymes, ATPase activity, and contraction duration in rat cardiac muscle with aging can be modulated by thyroxine. *Circ Res*. 1987;60(2):238–45.
209. Buttrick P, Malhotra A, Factor S, Greenen D, Leinwand L, Scheuer J. Effect of aging and hypertension on myosin biochemistry and gene expression in the rat heart. *Circ Res*. 1991;68(3):645–52.
210. Raizada V, Pathak D, Blomquist TM, Minser R, Woodfin B. Alterations in cardiac myosin isozymes associated with aging and chronic hypertension: their modulation with nifedipine. *Cardiovasc Res*. 1993;27(10):1869–72.
211. Jugdutt BI, Joljart MJ, Khan MI. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. *Circulation*. 1996;94(1):94–101.
212. Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;93:175–85.
213. Horn MA, Graham HK, Richards MA, Clarke JD, Greensmith DJ, Briston SJ, et al. Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure:

- collagen accumulation in the young and loss in the aged. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(1):82–90.
214. Thomas DP, Zimmerman SD, Hansen TR, Martin DT, McCormick RJ. Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training. *J Appl Physiol.* 2000 Oct;89(4):1462–8.
 215. Besse S, Robert V, Assayag P, Delcayre C, Swynghedauw B. Nonsynchronous changes in myocardial collagen mRNA and protein during aging: effect of DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 2):H2237-2244.
 216. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* 1991;276 (Pt 2):307–13.
 217. Sun L, Jin H, Sun L, Chen S, Huang Y, Liu J, et al. Hydrogen sulfide alleviates myocardial collagen remodeling in association with inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med.* 2014;20:503–15.
 218. Lindsey ML, Goshorn DK, Squires CE, Escobar GP, Hendrick JW, Mingoia JT, et al. Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res.* 2005;66(2):410–9.
 219. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285–342.
 220. Kwak H-B, Kim J, Joshi K, Yeh A, Martinez DA, Lawler JM. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. *FASEB J.* 2011;25(3):1106–17.