

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

---

Dissertação

---

**AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E  
DO CONDICIONAMENTO FÍSICO  
EM RATOS COM HIPERTENSÃO  
RENOVASCULAR 2R1C  
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO  
FÍSICO VOLUNTÁRIO**

*Taynara Carolina Lima*

Ouro Preto

2020



**UFOP**

TAYNARA CAROLINA LIMA

AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E DO  
CONDICIONAMENTO FÍSICO EM RATOS  
COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C  
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO  
VOLUNTÁRIO

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L732a Lima, Taynara Carolina .  
Avaliação cardiovascular e do condicionamento físico em ratos com hipertensão renovascular 2R1C submetidos ao exercício físico voluntário. [manuscrito] / Taynara Carolina Lima. - 2020.  
70 f.: il.: , gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Corridas. 2. Hipertensão renovascular. 3. Aptidão física. 4. Músculos - Metabolismo . 5. Lactato desidrogenase. I. Alzamora, Andréia Carvalho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Taynara Carolina Lima

#### AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E DO CONDICIONAMENTO FÍSICO EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO

Membros da banca

Antonio Jose Natali titulação PhD- Instituição UFV

Andre Talvani Pedrosa da Silva titulação - PhD Instituição UFOP

Andreia Carvalho Alzamora titulação -PhD Instituição UFOP

Versão final

Aprovado em 19 de fevereiro de 2020

De acordo

Professor (a) Orientador (a) Andreia Carvalho Alzamora



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Carvalho Alzamora, PROFESSOR 3 GRAU**, em 03/08/2020, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0071900** e o código CRC **EBB82EE1**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.005473/2020-42

SEI nº 0071900

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, INCT-FAPEMIG-CNPQ, PRONEX-FAPEMIG, PROPP-NUPEB-UFOP.

Tudo bem, até pode ser  
Que os dragões sejam moinhos de vento  
Tudo bem, seja o que for  
Seja por amor às causas perdidas  
Por amor às causas perdidas

(Dom Quixote-Engenheiros do Hawaii)

Dedico este trabalho á tio Nico, ausência sempre presente e desde sempre sentida. Á minha mãe e ao meu irmão por serem a minha base, minha fortaleza e meu amor maior.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço veementemente à Deus, pois só Ele sabe os verdadeiros percursos desta caminhada.

Agradeço imensamente a minha mãe Célia, que nunca mediu esforços para me proporcionar uma boa educação. Do ensino básico, ao ensino superior você me fez lembrar todos os dias o valor do conhecimento. Te vejo, te admiro e te amo imensamente mãe.

Ao meu irmão Igor por toda a cumplicidade, amor, carinho, admiração. Por tornar meus dias mais leves e dividir desde sempre a vida comigo. Graças a Deus por ter você. Te amo muito.

Ao meu pai José Mário e ao meu tio Célio (*in memoriam*). Como eu gostaria que vocês estivessem dividindo comigo este momento... Guardo vocês na memória e no coração para sempre. À minha avó Francisca, pelo carinho, ingenuidade e amor.

À Morgana (minha irmã de alma) e a Cida, que todos os dias me provam que família vai muito além dos laços sanguíneos. MUITÍSSIMO obrigada! Sou mais feliz por ter vocês.

Agradeço às amigadas que construí Gabi, Luizinho, Rodrigo, Marcos, Lucas, Hellen... Os bons permanecem. A minha grande amiga Camillok, que mesmo a distância segue sendo meu porto seguro.

Agradeço às minhas amigas Tâmilis, Dani, Miriã por fazerem os meus dias mais alegres, por compartilharem das derrotas, dos anseios, das conquistas... O sofrimento da Pós-graduação só teve sentido porque vivenciamos unidas. Amo vocês.

#BMresistência

Agradeço, em especial, à Thays por ter compartilhado dos meus melhores e piores momentos, por ter sido parceira, companheira, amiga e confidente. Muito obrigada, você mora em meu coração.

Agradeço à Rapha que deu início a tudo isso! De companheira de trabalho, se tornou uma grande amiga. Depois de 7 anos de amizade, não tem jeito, é para a vida toda. Sorte a minha.

Agradeço a Prof. Dr. Andréia C. Alzamora que foi muito além de orientadora. Eu aprendi a fazer ciência (quem sabe um dia eu seja como você), mas aprendi muito mais sobre a vida. MUITÍSSIMO obrigada, levarei todos os seus ensinamentos para além da vida acadêmica.



Agradeço imensamente a Maria Andrea por me ensinar, corrigir, fortalecer e por me lembrar que a união faz a força. Agradeço também a Claudiane pela amizade, diversão e todo o auxílio. Meninas, muito obrigada mesmo!! Por acreditarem em mim, e me ajudarem a fazer essa pós-graduação acontecer. Levarei vocês para sempre no meu coração.

Agradeço a equipe do Laboratório de Hipertensão, a Rosana, a Vivian, ao Sr. Wilson e a Karina pela amizade, companheirismo, e por deixarem o ambiente de trabalho mais legal.

Agradeço aos laboratórios parceiros, as meninas do CCA, e todos os colegas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Agradeço as políticas de acesso ao ensino superior, e ao ensino de qualidade da UFOP. Em especial aos professores Cristiano, Fábio e Roberth por inspirarem e concretizarem em mim o sonho de ser professora/pesquisadora.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL) pela inestimável formação profissional e pessoal.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos animais de experimentação a minha gratidão e meu eterno respeito.

Obrigada a todos!

## RESUMO

Objetivo do presente estudo foi avaliar o condicionamento físico e o efeito do exercício físico voluntário (ExV) sobre parâmetros cardiovasculares em ratos com hipertensão renovascular dois rins um clipe (2R1C). Ratos Fisher (188±4g, n= 72) após 24 horas das cirurgias (SHAM e 2R1C) foram alocados em gaiolas com roda de corrida voluntária por uma semana (adaptação). A distância percorrida foi analisada e os ratos que aderiram ao ExV foram separados em grupos ExV (SHAM-ExV e 2R1C-ExV) ou sedentários (SHAM-SED e 2R1C-SED). Ao fim de 4 semanas, foi feito o teste de exaustão e mensurado o lactato plasmático. Após 48 horas, os parâmetros cardiovasculares foram avaliados. Ao final das 4 semanas, os ratos 2R1C-ExV apresentaram menor distância percorrida comparados aos SHAM-EXV. Durante o teste de exaustão, o tempo e a velocidade foram superiores nos ratos ExV (SHAM e 2R1C) comparado aos SED (2R1C e SHAM). O lactato plasmático, foi maior nos ratos 2R1C-SED comparado aos ratos SHAM-SED e aos ratos 2R1C-ExV. A expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , UCP-3, MCT-1, AMPK foi maior nos ratos 2R1C-ExV comparado aos ratos SHAM-SED. Além disso, a expressão gênica da SIRT-1 e da UCP-3 foi maior nos 2R1C-ExV comparado aos ratos 2R1C-SED. Adicionalmente, a proteína carbonilada foi maior nos ratos 2R1C-SED em relação aos ratos SHAM-SED. Entretanto, os ratos 2R1C-ExV apresentaram níveis aumentados de SOD comparado aos ratos 2R1C-SED, e de CAT em relação aos ratos SHAM SED. A pressão arterial média (PAM) nos ratos 2R1C-ExV foi menor comparado aos ratos 2R1C-SED e maior comparados aos ratos SHAM-SED. O ExV restaurou a sensibilidade da bradicardia reflexa nos 2R1C-ExV em relação aos 2R1C-SED e foi similar aos SHAM-SED. A injeção (*iv*) de losartan (20mg) e hexametônio (10mg) induziu maior queda na PAM nos 2R1C-SED comparado aos SHAM-SED. A queda da PAM induzida pelo losartan nos ratos 2R1C-ExV foi menor comparados aos ratos 2R1C-SED, enquanto o hexametônio induziu queda similar nos ratos 2R1C-ExV comparado aos ratos SHAM-SED. Nossos dados em conjunto mostram que os ratos 2R1C-ExV apresentaram melhor condicionamento físico e melhora do processo redox no músculo gastrocnêmio. Essa melhora, provavelmente contribuiu para a restauração da atividade simpática e do AT1R da angiotensina II, e conseqüentemente a redução da PAM e melhora da sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos 2R1C-ExV.

**Palavras chaves:** corrida voluntária, hipertensão renovascular, condicionamento físico, metabolismo muscular, lactato.

## **ABSTRACT**

Objective of the present study was to evaluate physical fitness and the effect of voluntary physical exercise (ExV) on cardiovascular parameters in rats with renovascular hypertension two kidneys one clip (2K1C). Fisher rats ( $188 \pm 4g$ ,  $n = 72$ ) 24 hours after surgery (SHAM and 2K1C) were placed in cages with a voluntary running wheel for one week (adaptation). The distance covered was analyzed and the rats that adhered to ExV were separated into groups ExV (SHAM-ExV and 2K1C-ExV) or sedentary (SHAM-SED and 2K1C-SED). After 4 weeks, the exhaustion test was performed and the plasma lactate was measured. After 48 hours, cardiovascular parameters were assessed. At the end of 4 weeks, 2K1C-ExV rats had a shorter distance compared to SHAM-EXV. During the exhaustion test, time and speed were higher in ExV rats (SHAM and 2K1C) compared to SED rats (2K1C and SHAM). Plasma lactate was higher in 2K1C-SED rats compared to SHAM-SED rats and 2K1C-ExV rats. Gene expression of PGC-1 $\alpha$ , UCP-3, MCT-1, AMPK was higher in 2K1C-ExV rats compared to SHAM-SED rats. In addition, the gene expression of SIRT-1 and UCP-3 was higher in 2K1C-ExV compared to 2K1C-SED rats. Additionally, the carbonylated protein was higher in 2K1C-SED rats than in SHAM-SED rats. However, 2K1C-ExV rats showed increased levels of SOD compared to 2K1C-SED rats, and CAT compared to SHAM-SED rats. Mean arterial pressure (MAP) in 2K1C-ExV rats was lower compared to 2K1C-SED rats and higher compared to SHAM-SED rats. ExV restored the sensitivity of reflex bradycardia in 2K1C-ExV compared to 2K1C-SED and was similar to SHAM-SED. The injection (iv) of losartan (20mg) and hexamethonium (10mg) induced a greater decrease in MAP in the 2K1C-SED compared to SHAM-SED. The drop in PAM induced by losartan in 2K1C-ExV rats was less compared to 2K1C-SED rats, while hexamethonium induced a similar drop in 2K1C-ExV rats compared to SHAM-SED rats. Our data together show that the 2K1C-ExV rats showed better physical conditioning and improved redox process in the gastrocnemius muscle. This improvement probably contributed to the restoration of the sympathetic activity and the AT1R of angiotensin II, and consequently the reduction of MAP and improved sensitivity of reflex bradycardia in 2K1C-ExV rats.

**Key words:** voluntary running, renovascular hypertension, physical conditioning, muscle metabolism, lactate.

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Protocolo do teste de exaustão na esteira	29
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática teste sensibilidade barorreflexa	31
<b>Figura 3:</b> Avaliação da distância percorrida	40
<b>Figura 4:</b> Teste de exaustão	42
<b>Figura 5:</b> Avaliação do metabolismo muscular	44
<b>Figura 6:</b> Avaliação do processo redox	47
<b>Figura 7:</b> Avaliação dos processos hemodinâmicos	49
<b>Figura 8:</b> Esquema de possível mecanismo induzido pelo ExV em ratos 2R1C	56

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Sequência de primers	34
<b>Tabela 2:</b> Avaliação dos parâmetros biométricos	38
<b>Tabela 3:</b> Correlações entre parâmetros avaliados durante o ExV	45

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**µg:** micrograma

**2R1C:** dois rins um clipe

**2R1C-ExV:** rato hipertensão 2R1C submetido exercício físico voluntário

**2R1C-SED:** rato hipertensão 2R1C mantido sedentário

**AMPK:** proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

**Ang II:** angiotensina II

**ANOVA:** análise de variância

**AT1R:** receptor da angiotensina II tipo 1

**AT2R:** receptor da angiotensina II tipo 2

**ATP:** adenosina trifosfato

**CAT:** catalase

**CCA:** Centro de Ciência Animal

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementar

**cm:** centímetro

**Cq:** ciclo de quantificação

**CVLM:** bulbo ventrolateral caudal

**dNTPs:** desoxiribonucleotídeos trifosfatados

**E:** eficiência

**ECA:** enzima conversora de angiotensina

**EROS:** espécies reativas de oxigênio

**Ex:** exercício físico

**ExV:** exercício físico voluntário

**F:** forward

**FC:** frequência cardíaca

**g:** grama

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HA:** hipertensão arterial

**Hz:** hertz

**IP:** intervalo de pulso

**iv:** intravenoso

**KCl:** cloreto de potássio

**kg:** quilograma

**LDH:** lactato desidrogenase

**LOD:** lactato oxidase

**m:** metro

**MasR:** receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas

**MCT:** transportadores de monocarboxilato

**mg:** miligrama

**MgCl<sub>2</sub>:** cloreto de magnésio

**min:** minuto

**MIQE:** informações mínimas para publicação de experimentos de PCR

**mL:** mililitro

**MM:** massa molecular

**mm:** milímetro

**mmHg:** milímetros de mercúrio

**ms:** milissegundo

**mV:** megavolt

**n:** número

**NaCl:** cloreto de sódio

**NADPHoxidase:** fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**nm:** nanômetro

**nmol:** nanomol

**NTS:** núcleo do trato solitário

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** ânion superóxido

**°C:** graus celsius

**PA:** pressão arterial

**PAM:** pressão arterial média

**PE:** polietileno

**PGC-1 $\alpha$ :** coativador 1  $\alpha$  receptor ativado por proliferador do peroxissoma

**qRT-PCR:** reação em cadeia da polimerase em tempo real

**R:** reverse

**RGD:** *rat genome database*

**RNA:** ácido ribonucleico

**RVLM:** bulbo ventrolateral rostral

**SBR:** sensibilidade da bradicardia reflexa

**SHAM:** rato controle normotenso submetido à cirurgia fictícia

**SHAM-ExV:** rato controle normotenso submetido exercício físico voluntário

**SHAM-SED:** rato controle normotenso mantido sedentário

**SHR:** rato espontaneamente hipertenso

**SIRT-1:** sirtuína 1

**SNS:** sistema nervoso simpático

**SOD:** superóxido dismutase

**SRA:** sistema renina angiotensina

**TBE:** Tris, borato e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

**Tm:** temperatura de melting

**TRIS-HCl:** tris hidroximetilaminometano cloridrato

**U:** unidade

**UA:** unidade arbitrária

**UCP-3:** proteína desacopladora 3

**UI:** unidade internacional

**VLM:** bulbo ventrolateral



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Objetivo geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Animais .....	27
4.2 Cirurgia para o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C .....	27
4.3 Exercício físico voluntário .....	28
4.4 Dosagem de ácido láctico .....	28
4.4.1 Teste de exaustão em esteira .....	29
4.5 Avaliação do processo redox .....	29
4.6 Confecção das cânulas vasculares .....	30
4.7 Canulação da artéria aorta abdominal e veia femoral .....	30
4.8 Avaliação direta da pressão arterial .....	30
4.9 Avaliação da sensibilidade da bradicardia barorreflexa .....	31
4.10 Avaliação do bloqueio simpático e do receptor AT1 sobre a PAM .....	32
4.11 Avaliação da massa corporal e dos órgãos .....	32
4.12 Análise por expressão gênica qRT-PCR .....	32
4.12.1 Extração de RNA Total .....	32
4.12.2 Síntese de cDNA .....	33
4.12.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) .....	33
4.12.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real .....	34
4.12.5 Cálculo da eficiência dos primers .....	35
4.12.6 Curva de dissociação dos amplicons .....	35
4.12.7 Validação do $\Delta Cq$ .....	36
4.13 Análise estatística .....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1 Parâmetros biométricos de ratos 2R1C submetidos ao ExV .....	38
5.2 Adesão e intermitência: ExV .....	39
5.3 O ExV melhora o condicionamento físico nos 2R1C ratos .....	41
5.4 O ExV aumenta a expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial e do metabolismo muscular .....	43
5.5 Correlação entre lactato e PGC-1 $\alpha$ em marcadores do metabolismo muscular .....	45
5.6 O ExV melhora o processo redox em ratos 2R1C .....	46
5.7 ExV melhora PAM e a sensibilidade da bradicardia reflexa de ratos 2R1C ...	48
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>10 ANEXO</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) (DOEDERLEIN POLITO *et al.*, 2003; LEWINGTON *et al.*, 2002). Por estar associada a alterações metabólicas e morfofuncionais de órgãos-alvo, como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos (LEWINGTON *et al.*, 2002; NEGRAO *et al.*, 1993), esta doença constitui um dos principais fatores de riscos para doenças cardiovasculares, uma vez que é capaz de provocar lesões vasculares e culminar em insuficiências cardíacas, renais e até mesmo em acidentes vasculares (GRASSI *et al.*, 2011).

Níveis sistólicos igual ou superior a 140 mmHg e diastólicos igual ou superior a 90 mmHg, caracterizam um quadro de HA (JAMES *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2014). A homeostase da PA ocorre dentro de uma faixa estreita de variação que é mantida por complexos mecanismos inter-relacionados de controle neural, humoral e local que podem ser em curto e em longo prazo (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2006; FERRARIO *et al.*, 1990). Os barorreceptores regulam em curto prazo a PA (DIBONA, 2013; GUYENET, 2006). Estas são células de estiramento localizadas no seio carotídeo e no arco aórtico, que mantêm o controle reflexo da PA, momento a momento, por meio de projeções de fibras aferentes até o bulbo, no núcleo do trato solitário (NTS). O NTS é a primeira estação de sinais sensoriais originários do sistema periférico. Ele regula a atividade do sistema nervoso autônomo por integrar sinais periféricos com sinais provenientes do diencéfalo e telencéfalo (FELDMAN; ELLENBERGER, 1988). Adicionalmente, projeções neuronais excitatórias do NTS chegam até o bulbo ventrolateral (VLM) caudal (CVLM), região caracterizada como depressora (MCKITRICK; CALARESU, 1997; ROSS *et al.*, 1984).

A redução da PA decorrente do CVLM ocorre devido a uma via neural ascendente de neurônios inibitórios que chegam até a região pressora, VLM rostral (RVLM) (MCKITRICK; CALARESU, 1997; ROSS *et al.*, 1984). Os neurônios do RVLM são simpatoexcitatórios e capazes de estimular neurônios pré-ganglionares simpáticos, os quais causam elevação da frequência cardíaca (FC), da contratilidade do coração e aumento na resistência vascular resultando em elevação da PA (LOEWY; WALLACH; MCKELLAR, 1981).

Quando há um aumento da PA, sinais periféricos oriundos dos barorreceptores projetam-se para neurônios do CVLM, do núcleo ambíguo e do núcleo dorsal do nervo vago. O CVLM via projeções neuronais simpatoinibitórias ascendente, inibe o RVLM diminuindo a atividade simpática (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2006; HAN *et al.*, 1998). Já a estimulação do núcleo ambíguo e o núcleo dorsal do nervo vago ativam o sistema nervoso parassimpático que atua reduzindo a FC e a PA (AICHER *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 1984). Em estados hipertensivos, a sensibilidade do barorreflexo (SBR) diminui e se adapta a um novo “set point” em níveis elevados de PA, que pode contribuir para a manutenção da hipertensão (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2006; KUMADA; TERUI; KUWAKI, 1990).

Acredita-se que a HA possa ocorrer devido à hipertatividade dos neurônios do RVLM e; ou inabilidade do CVLM em contrabalancear o aparente aumento da atividade simpatoexcitatória intrínseca de neurônios localizados no RVLM. (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2006; CARVALHO *et al.*, 2003). Entretanto, o RVLM /CVLM podem ser influenciados pelo sistema renina-angiotensina (SRA), uma vez que, componentes desse sistema podem interagir com o cérebro em regiões desprovidas de barreira hematoencefálica, modulando os neurônios do VLM (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

O SRA está no centro da patogênese, da progressão da HA (HENRIKSEN, 2007; PERKINS; DAVIS, 2008; YIM; YOO, 2008), sendo considerado um mecanismo de controle em longo prazo da PA. Dentre os vários peptídeos que compõem esse sistema, está o hormônio angiotensina II (Ang II). A Ang II é formada por uma cascata de clivagens, na qual o angiotensinogênio produzido no fígado, é clivado pela enzima renina (produzida nos rins) e depois pela enzima conversora da angiotensina (ECA, produzida nos pulmões) formando, finalmente, o octapeptídeo Ang II (NAVAR *et al.*, 1995; SANTOS, ROBSON A.S. *et al.*, 2003). As ações da Ang II e dos diversos peptídeos angiotensinérgicos, são mediadas por receptores localizados na membrana plasmática de suas células alvo, de forma que, a Ang II pode se ligar a dois receptores distintos, receptor da angiotensina II tipo 1 ou 2 (AT1R ou AT2R), que desencadeiam efeitos fisiológicos diferentes (SANTOS, ROBSON A.S. *et al.*, 2003). Adicionalmente, a Ang II, pela ação da ECA2, forma Ang-(1-7), um heptapeptídeo (SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994;

TIPNIS *et al.*, 2000) que atua via receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas (MasR) promovendo vasodilatação, efeitos antitrombóticos, antifibróticos, anti-hipertrofos e anti-hipertensivos (FERRARIO; STRAWN, 2006; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

A hiperatividade do eixo ECA/AngII/AT1R induz vasoconstrição, ativação do sistema nervoso simpático (SNS), prejuízo na função barorreflexa, além de induzir efeitos pró-inflamatórios, profibróticos e pró-oxidantes (ČERVENKA *et al.*, 2002; DOMINICI *et al.*, 2014; FERRARIO; STRAWN, 2006; OLIVEIRA, DJENANE R. *et al.*, 1996). Adicionalmente, a Ang II contribui para o processo redox por induzir disfunção mitocondrial via AT1R (ČERVENKA *et al.*, 2002), por meio da estimulação do complexo enzimático fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPHoxidase), promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DE GASPARO, 2002; RAMALINGAM *et al.*, 2017). O aumento do ROS leva a oxidação de moléculas, com conseqüente perda de suas funções biológicas, prejudicando o metabolismo energético de importantes órgãos como, coração e músculo esquelético (EGAN *et al.*, 2010; EGAN; ZIERATH, 2013; TANABE *et al.*, 2006).

Vários modelos experimentais de hipertensão são utilizados para avaliar a participação do SRA na patogênese da HA, dentre eles, destaca-se o modelo de hipertensão renovascular dois rins um clipe (2R1C). Descrito inicialmente por Goldblatt e colaboradores (1934), este modelo caracteriza-se pela constrição parcial de uma artéria renal, enquanto o rim contralateral permanece intacto (GOLDBLATT *et al.*, 1933). LAZARTIGUES *et al.* (2004) mostraram aumento nos níveis plasmáticos de Ang II a partir da primeira semana da cirurgia 2R1C em camundongos. No entanto, um mês após a cirurgia 2R1C ocorreu uma redução nos níveis plasmáticos de Ang II, enquanto os níveis cerebrais de Ang II permaneceram aumentados. A manutenção dos altos níveis pressóricos é decorrente da ativação do SRA tecidual local, como no coração, rins e cérebro com a prevalência do eixo ECA/AngII/AT1R (KAGIYAMA *et al.*, 2001; LAZARTIGUES *et al.*, 2004; SHARIFI *et al.*, 2003). Adicionalmente, as injúrias aos órgãos-alvo no modelo 2R1C são dependentes do grau da estenose e incluem disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca (de 20 a 50 % de aumento no tamanho do coração) e hipertrofia do rim

contralateral exposto à hipertensão (AKABANE *et al.*, 1985; PINTO; PAUL; GANTEN, 1998).

O tratamento farmacológico para a HA visa reduzir a PA, e em longo prazo, reduzir danos aos órgãos-alvo, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, dentre outros (GIROTTO *et al.*, 2013). Os fármacos atuam por diferentes mecanismos de ação, como o hexametônio, que bloqueia a resposta do gânglio simpático á acetilcolina ou a outros estimulantes ganglionares, gerando uma grande queda na PA (KING; FINK, 2006; SANTA JULIANA; HORN FELDT; OSBORN, 1996). Já o losartan, outro fármaco, atua como um antagonista do receptor AT1R da Ang II, reduzindo a hiperatividade da Ang II (SCHNEIDER; KALK; KLEIN, 1999). Por mecanismos diferentes tanto o hexametônio como o losartan promovem o aumento da atividade do sistema nervoso parassimpático, melhora do estresse oxidativo, da hiperatividade do SNS e conseqüentemente redução da PA (ABDALA *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2017; SANTA JULIANA; HORN FELDT; OSBORN, 1996).

Como tratamento não farmacológico, o exercício físico (Ex) auxilia na prevenção e/ ou tratamento para doenças cardiovasculares como a HA (NEGRÃO; RONDON, 2001; RONDON; BRUM, 2003; URBANA; RONDON; BRUM, 2003)(RONDON; BRUM, 2003; URBANA; RONDON; BRUM, 2003). O Ex favorece o eixo ECA/AngII/AT2R e ECA2/Ang-(1-7)/MasR um eixo contra regulatório do SRA, que inibe a proliferação celular, reduz a aldosterona, a vasopressina plasmática, a atividade do SNS, promove vasodilatação, além da melhora da SBR, e redução da PA (CAREY; SIRAGY, 2003; NEGRÃO; RONDON, 2001; SANTOS, ROBSON A.S. *et al.*, 2003; THOMAS; MENDEL SOHN, 2003). Adicionalmente, o Ex é eficaz em aumentar a função e o metabolismo muscular, contribuindo para a prevenção e melhoria de doenças cardiometabólicas (EGAN; ZIERATH, 2013; SAFDAR *et al.*, 2011), uma vez que, os músculos esqueléticos são considerados o principal órgão do metabolismo, por conterem um grande número de mitocôndrias (EGAN; ZIERATH, 2013; ZURLO *et al.*, 1990).

A energia necessária para a contração muscular pode ser derivada do metabolismo aeróbio e/ou anaeróbio (VOLTARELLI; MELLO; GOBATTO., 2005). Durante o Ex, existe uma zona de transição na qual ocorre a mudança da predominância do metabolismo aeróbio para o anaeróbio, com conseqüente formação de lactato (TEGTBUR, U *et al.*, 2001), devido a maior demanda de oxigênio pelas

células musculares (BROOKS, 1991; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000; WASSERMAN, 1984). Essa zona de transição associada ao equilíbrio entre a produção e a remoção do lactato sanguíneo, é denominada limiar anaeróbico (SOARES *et al.*, 2011; TEGTBUR, UWE; BUSSE; BRAUMANN, 1993; VOLTARELLI; GOBATTO; DE MELLO, 2002a), uma importante ferramenta para a avaliação do condicionamento físico (TEGTBUR, UWE; BUSSE; BRAUMANN, 1993; VOLTARELLI; GOBATTO; DE MELLO, 2002a, b).

A determinação do limiar anaeróbico foi desenvolvido por TEGTBUR *et al* (1993) envolve a realização de exercício supramáximo, por um breve período de tempo, visando à indução da hiperlactacidemia. O teste é feito com o aumento de cargas progressivas até que o animal atinja a exaustão, a qual é determinada quando o animal não responde aos estímulos para dar continuidade ao teste. Ao fim, amostras de sangue são coletadas, e o lactato avaliado (TEGTBUR, UWE; BUSSE; BRAUMANN, 1993; VOLTARELLI; GOBATTO; DE MELLO, 2002a).

A melhora do condicionamento físico esta associada à redução do lactato plasmático devido ao aumento da capacidade oxidativa e da sua taxa de remoção (BROOKS, 1991; MCDERMOTT; BONEN, 1993; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000). Estudos sugerem que essa remoção pode estar associada ao aumento do transporte de lactato através do sarcolema e ao aumento do seu uso, como substrato energético para outros tecidos (GLADDEN, 2000; MCDERMOTT; BONEN, 1993) via transportadores de monocarboxilato (MCT) (SKELTON *et al.*, 1995). Para ser utilizado como substrato para a cadeia transportadora de elétrons, o lactato é convertido em piruvato por meio do complexo enzimático da lactato desidrogenase (LDH) (BROOKS, 1991, 2000). Estudos mostram uma correlação direta entre o lactato plasmático e coativador 1  $\alpha$  receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) no desempenho e na função muscular (SUMMERMATTER *et al.*, 2013), uma vez que o PGC-1 $\alpha$  promove um fenótipo de oxidação do lactato que esta associada com a melhor capacidade de Ex. Entretanto ainda não esta claro na literatura a base fisiológica do metabolismo muscular do lactato na melhoria do condicionamento físico (BROOKS, 1991; PILIS *et al.*, 1993).

Durante o Ex a contração muscular induz um aumento da adenosina trifosfato (ATP) e do fluxo de cálcio que estimula a ativação do PGC-1 $\alpha$  (EGAN *et al.*, 2010). O aumento da expressão PGC-1 $\alpha$  está relacionado a uma maior capacidade de Ex, resistência à fadiga, aumento do metabolismo oxidativo, da massa muscular e da

biogênese mitocondrial (EGAN; ZIERATH, 2013; SAFDAR *et al.*, 2011; YAN, 2009). O PGC-1 $\alpha$  promove uma regulação metabólica no músculo esquelético, que é refletida na função mitocondrial (GREEN *et al.*, 1992; SPINA *et al.*, 1996), na sinalização intracelular (BENZIANE *et al.*, 2008) e nas respostas transcricionais (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003) de importantes genes e moléculas ligados a melhora do condicionamento físico, como a sirtuína 1 (SIRT-1), a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), e a isoforma 3 da proteína desacopladora (UCP-3) (AUWERX; CANTO, 2009; JONES *et al.*, 2003; OLIVEIRA, NARA R.C. *et al.*, 2014). Entretanto, as vias intracelulares envolvidas para a obtenção dessas respostas gênicas induzidas pelo Ex ainda não são totalmente compreendidas.

Apesar de já está bem estabelecido na literatura, que o Ex melhora a HA (BARBOSA *et al.*, 2018; MAIA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2011; ZACARIAS *et al.*, 2017), os seus efeitos são dependentes de fatores como intensidade, distância percorrida, duração do estímulo e a frequência semanal (EGAN *et al.*, 2010). Entretanto, em animais, a programação e o monitoramento desses parâmetros tornam o Ex estressante por não se aproximar do padrão natural de execução, dificultando a sua adesão (GOH; LADIGES, 2015). Nesse contexto o exercício físico voluntário (ExV) tem ganhado atenção, por refletir melhor as condições naturais do animal.

O ExV é uma modalidade não forçada, intermitente e de baixa intensidade, mais semelhante ao padrão de corrida natural (GIRARD *et al.*, 2001). O ExV em ratos pode ser realizado em gaiolas que possuem rodas em seu interior e são consideradas ambientes enriquecidos, por oferecerem novas experiências, estimulando os mecanismos de recompensa (AGUIAR; PINHO, 2007; GIRARD *et al.*, 2001; MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2019a). A frequência, a duração, o tempo de descanso e a intensidade do Ex são definidos pelo próprio animal (DE BONO *et al.*, 2006; GOH; LADIGES, 2015; MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2019a).

A intermitência do ExV consiste em momentos alternados de intenso exercício seguido de uma pausa para recuperação, o que promove uma melhora da aptidão aeróbica (BILLAT *et al.*, 2000; TOMLIN; WENGER, 2001). A capacidade de realizar o máximo desempenho durante o Ex é influenciada pelo período de Ex e o tempo de recuperação. Os intervalos gerados pela intermitência, estimula mecanismos de tamponamento e / ou remoção dos íons H<sup>+</sup>, provenientes do

metabolismo muscular, aumentando o pH diminuindo o lactato (TOMLIN; WENGER, 2001). Quanto mais completos os processos que restauram o metabolismo, maior a capacidade de gerar força ou manter a energia nos intervalos subsequentes (TOMLIN; WENGER, 2001).

No entanto, devido a necessidade de aumentar gradativamente a carga imposta ao animal, um protocolo para avaliar o desempenho físico no ExV, ainda não está bem descrito. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis marcadores do desempenho físico e do metabolismo muscular em ratos submetidos ao ExV, bem como mostrar a efetividade do ExV em induzir benefícios cardiovasculares em ratos com hipertensão renovascular 2R1C, que é caracterizada pela hiperatividade dos componentes do eixo ECA/Ang-II/ AT1R.



## **2 JUSTIFICATIVA**

A HA é altamente prevalente na população adulta, sendo um grave problema de saúde pública. Apesar de sabermos que o Ex induz benefícios para o sistema cardiovascular, a adesão ao Ex não ocorre de forma semelhante entre os indivíduos. A falta de motivação para manter-se fisicamente ativos também pode ser considerada um problema de saúde pública.

Neste contexto, o ExV é o que mais se assemelha ao exercício humano. Por ser de caráter espontâneo e de intensidade autodeterminada, essa modalidade de Ex promove maior adesão. Contudo ainda não existe descrito na literatura protocolos para avaliar a intensidade do Ex e o condicionamento físico nesses animais.

Diante do exposto, a busca por um protocolo de avaliação da intensidade e do desempenho físico em ratos submetidos ao ExV torna-se de extrema necessidade, bem como mostrar a efetividade do ExV. Os resultados do presente estudo podem reforçar a importância do ExV para prevenir e/ ou tratar doenças crônicas como HA.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o desempenho físico e os efeitos cardiovasculares em ratos com hipertensão renovascular 2R1C submetidos ao exercício físico voluntário

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar em ratos normotensos (SHAM) e com hipertensão renovascular (2R1C) sedentários e submetidos ao exercício físico voluntário por 4 semanas:

- 1- Distância percorrida: em intervalos do dia, por semana e ao fim de 4 semanas de ExV;
- 2- Parâmetros biométricos: coração, rins e músculo esquelético;
- 3- Parâmetros hemodinâmicos por: avaliação direta da pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade da bradicardia reflexa. Avaliação indireta do sistema nervoso simpático e dos níveis de angiotensina II.
- 4- Marcadores de desempenho físico e metabolismo muscular por: teste de exaustão, lactato plasmático e expressão gênica de PGC1- $\alpha$ , SIRT-1, AMPK, MCT-1, LDH, UCP-3.
- 5- Processo redox no músculo esquelético por: atividade das enzimas SOD e CAT e concentração de proteína carbonilada.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Fisher (n=72) com 8 semanas de idade pesando  $188\pm 4$ g. Os animais permaneceram em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração comercial para roedores. Cada gaiola continha uma roda de corrida voluntária (Lafayette Instrument, modelo 86070A) que podia ser acessada livremente pelo animal. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro/ escuro de 12 h, 21° C e umidade relativa do ar de  $\pm 55\%$  no Centro de ciência animal da UFOP (CCA/UFOP). Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e às dietas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Ouro Preto nº do protocolo 2014/21.

### **4.2 Cirurgia para o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C**

A hipertensão renovascular 2R1C foi realizada conforme o método descrito por GOLDBLATT *et al.*, (1933). Após jejum de aproximadamente 8 horas, com livre acesso a água e sob anestesia produzida pela mistura de quetamina e xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg, intraperitoneal, respectivamente), os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, e submetidos à tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool iodado 2%. Em seguida foi feita uma laparotomia mediana de 4 a 6 cm abaixo do processo xifóide para visualização e isolamento da artéria renal esquerda. Foram colocados retratores bilateralmente na incisão cirúrgica e as alças intestinais foram retraídas. Em seguida, a artéria renal esquerda foi isolada com o auxílio de pinças e cotonetes. Um clipe de prata (contendo 5% de liga de cobre e com ótimo grau de dureza) apresentando 8 mm de comprimento e 2 mm de largura, em forma de U foi colocado em torno da artéria renal. O grau de constrição interna do clipe foi previamente fixado a 0,20 mm através do uso de um calibrador. O valor de constrição da artéria renal de 0,20 mm foi definido através de experimentos preliminares em que foi observado um índice de PAM > 130 mmHg, após 28 dias da cirurgia.

Outros animais foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM), que consistiu na realização de todos os procedimentos acima, exceto a colocação do clipe de prata em torno da artéria renal. Estes animais foram utilizados como controle.

Em todos os animais o abdômen foi suturado com pontos contínuos, envolvendo a camada muscular e pontos separados na pele. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, uma dose única de antibiótico (0,01mL/ 100 g de peso corporal pentabiótico veterinário/ Fort DODGE) foi administrada em todos os animais para evitar infecções pós-cirúrgicas.

#### **4.3 Exercício físico voluntário**

Após 24 horas da cirurgia para implantação do clipe ou cirurgia fictícia, os ratos foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida. As gaiolas continham uma roda de corrida voluntária (Lafayette Instrument, modelo 86070A) a qual podiam acessar livremente por um período de adaptação igual a uma semana. Ao fim de uma semana de ExV, a distância percorrida pelos ratos foi registrado. Alguns animais não aderiram ao Ex e por isso foram retirados do experimento. Os que permaneceram foram divididos aleatoriamente em grupos sedentários e exercitados, formando 4 grupos: SHAM-SED, SHAM-ExV, 2R1C-SED, 2R1C-ExV. Os animais sedentários, foram acondicionados em gaiolas individuais por mais 4 semanas, com livre acesso a água e comida, porém sem acesso à roda de corrida voluntária. Já os animais exercitados, permaneceram em gaiolas com livre acesso a roda, também por mais 4 semanas. A distância percorrida pelos ratos foi calculada pelo número de voltas da roda, e registrada por um sensor acoplado ao computador. O número de voltas e a distância percorrida foram armazenados no software do fabricante das gaiolas voluntária.

#### **4.4 Dosagem de ácido láctico**

Com a intenção de avaliar a intensidade de exercício foi realizado o teste do lactato nos ratos 2R1C e SHAM, logo após o teste de exaustão, pelo método de tiras teste e analisador Accutrend Lactate (Roche), conforme instruções do fabricante e estudo prévio de nosso laboratório (SOARES *et al.*, 2011). O teste se baseia na aplicação da amostra de sangue na zona reativa da tira. O sangue passa através de uma rede protetora até uma camada de vidro, onde os eritrócitos ficam retidos, de modo que, apenas o plasma sanguíneo penetre na zona de detecção. O lactato é determinado através de um fotômetro de reflexão pela reação colorimétrica do medidor lactato-oxidase (LOD) a um comprimento de onda de 657 nm:

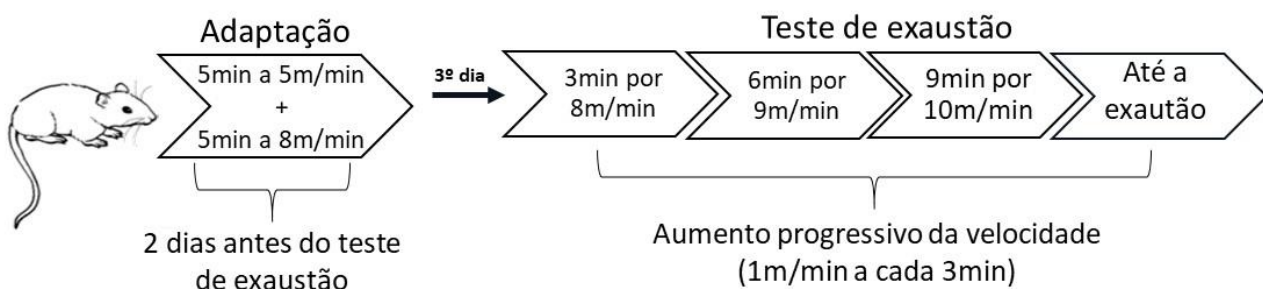
## LOD

L- Lactato + mediador forma I  $\rightarrow$  piruvato + mediador reduzido I

Mediador reduzido + 2,18 fosfomolibdato  $\rightarrow$  azul de molibdênio +mediador forma II

### 4.4.1 Teste de exaustão em esteira

Ao fim das 4 semanas de ExV e SED, os ratos foram submetidos ao protocolo de teste de exaustão em esteira (EP - 132 - INSIGHT) por protocolo adaptado (LACERDA *et al.*, 2006). Dois dias antes do teste de exaustão, os ratos passaram por uma adaptação de 10 minutos, (5 primeiros min a 5m/min, e os 5 min restantes a 8m/min). Durante o teste de exaustão a velocidade foi aumentada 1m/min progressivamente a cada 3 min, até a exaustão. Ao fim, coletou-se o sangue pela ordenha da cauda, para avaliação da concentração do lactato sanguíneo.



**Figura 1:** Protocolo do teste de exaustão em esteira

### 4.5 Avaliação do processo redox

Amostras do músculo gastrocnêmio (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4 °C. A atividade da enzima SOD foi avaliada indiretamente com um leitor ELISA a 570 nm, com base na capacidade dessa enzima para eliminar o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), diminuindo a redução do MTT ([3- (4,5- e convertendo ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), reduzindo a taxa de auto-oxidação do pirogalol (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os resultados foram expressos em U / mg de proteína, em que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do MTT. A atividade da enzima CAT foi determinada com base em sua capacidade de converter peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular (AEBI,

1984). Os resultados foram expressos em U / mg de proteína, na qual uma unidade de CAT O conteúdo de proteína carbonilada foi determinado de acordo com o método de LEVINE *et al.*, (1994). Os dados foram expressos em nmol / mg de proteína.

#### **4.6 Confeção das cânulas vasculares**

Na confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno (PE) - 10 de 4 cm para cânula arterial e de 2 cm para a cânula de veia, soldados a tubos PE -50 de 15 cm. Antes da canulação, o interior das cânulas foi preenchido com solução fisiológica heparinizada de cloreto de sódio (NaCl, 0,9%) e a extremidade PE-50 de cada cânula foi obstruída com pino de metal.

#### **4.7 Avaliação direta da pressão arterial**

##### **4.7.1 Canulação da artéria aorta abdominal e veia femoral**

Vinte quatro horas após as 4 semanas de ExV ou SED, os ratos foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Foi realizada uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vâsculo-nervoso femoral. Artérias e veia femorais foram dissecadas e expostas. As cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas. A seguir foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico. As extremidades das cânulas foram dirigidas ao dorso do animal e exteriorizadas na região interescapular, através de um trocater, permitindo livre movimentação. Ao final, foram suturados no local da incisão. Após a cirurgia, os ratos foram acondicionados em gaiolas individuais, por 48 horas, para sua recuperação, com livre acesso a água e ração, sob condições ideais de temperatura, níveis de ruído e luminosidade.

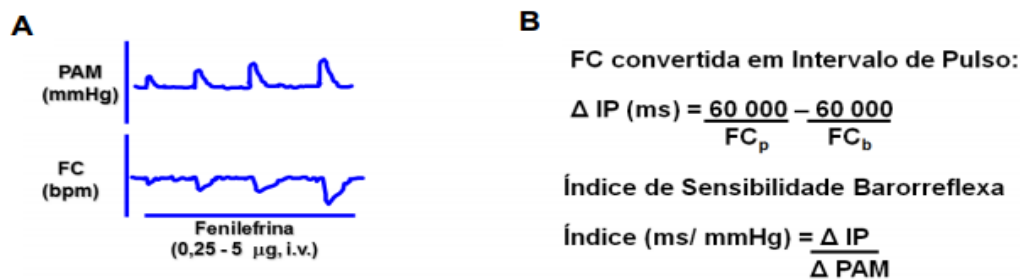
##### **4.7.2 Aferição direta da pressão arterial**

Finalizada às 48 horas de recuperação da cirurgia para implantação das cânulas, 0,1 mL de uma solução de heparina em salina isotônica (1000 UI/mL) foi injetada na cânula arterial (pela extremidade do PE50 exteriorizada) para evitar a formação de coágulos durante o registro.

Os dados da PAM foram monitorados pelo transdutor de pressão e pré-amplificados por um pré-amplificador (BridgeAmp). Os dados analógicos foram convertidos a variáveis discretas por um conversor analógico para digital (ADInstruments Pty Ltd, Austrália) e registrados pelo software LabChar 7 for Windows e estocados em arquivos individuais para cada animal. A amplitude (resolução espacial) da janela de digitalização foi configurada para 20 mV e os dados foram digitalizadas com resolução temporal de 1ms (1000 Hz).

#### 4.8 Avaliação da sensibilidade da bradicardia barorreflexa

Posteriormente a avaliação da PAM foi avaliada a SBR relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações da PAM, os ratos foram submetidos a injeções (em bolus) endovenosas (0,1 ml) de doses crescentes de fenilefrina que variavam de 0,5 a 50,0 µg (Sigma Chemical Co.,USA) de maneira a se obter respectivamente respostas pressoras de aproximadamente 10, 20, 30, 40 mmHg (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2006b). Um intervalo mínimo de um minuto foi mantido entre as injeções, para permitir que a PAM e FC retornassem aos valores basais. Os picos das mudanças na FC ocorreram durante os primeiros 5-10 segundos e corresponderam à máxima alteração na PAM produzidas pela fórmula:  $60.000/FC$  (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática do teste de sensibilidade da bradicardia reflexa (SBR) através de injeções em doses crescentes de fenilefrina (painel A) e fórmulas de conversão da FC em intervalo de pulso (IP, ms) e do índice de sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg) (painel B). PAM;  $FC_p$  de pico;  $FC_b$  basal; delta de variação ( $\Delta$ ).

#### **4.9 Avaliação do bloqueio simpático e do receptor AT1 sobre a PAM**

O bloqueador ganglionar simpático, Cloreto de hexametônio (Sigma Chemical Co., USA), foi preparado em solução de (20 mg/kg iv) (SÁ *et al.*, 2017) e antagonista do receptor AT1 da Ang II, Losartan (10 mg/kg iv) (ABDALA *et al.*, 2012). Estas soluções foram alíquotadas em microtubos e permaneceram congeladas até o momento do uso no freezer -20°C. Em dois grupos diferentes de ratos, após 10 minutos de estabilização, a PAM e a FC foram avaliadas antes e 5 minutos após a injeção (iv) do Losartan, 20mg e do Hexametônio, 10mg.

#### **4.10 Avaliação da massa corporal e dos órgãos**

A massa corporal dos ratos foi mensurada inicialmente na primeira cirurgia (SHAM ou 2R1C), e antes das avaliações cardiovasculares diretas. Após o término das avaliações cardiovasculares, os ratos foram anestesiados e eutanasiados e posteriormente os rins (direito e esquerdo), coração e músculo gastrocnêmico foram retirados e pesados após secagem rápida com papel filtro (peso úmido). Foi calculada a relação entre o peso úmido dos órgãos e o peso corporal do rato (g/100g peso do rato).

#### **4.11 Análise por expressão gênica qRT-PCR**

##### **4.11.1 Extração de RNA Total**

O ácido ribonucleico (RNA) total do músculo gastrocnêmio foi extraído utilizando o kit SV Total Isolation System (Promega™, Madison WI) seguindo a recomendação do fabricante. Resumidamente, aproximadamente 100 mg de músculo foram homogeneizados em 1ml de Trizol® Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA) com auxílio de um homogenizador do tipo Politron (Homogenizador Ultra 80, em 3 pulsos de 30 segundos com intervalo de 30 segundos no gelo. Depois de incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 500 µl de clorofórmio (Sigma, ST. Louis, MO) e as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto com auxílio de um vórtex, seguido de uma incubação de 25 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000×g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf e foi adicionado 75 µl de etanol 95% (Sigma), preparado com água livre de RNAses para precipitar os ácidos nucleicos e transferida para a coluna de ligação que acompanha o



kit. Em seguida, o RNA foi purificado com o kit SV Total Isolation System (Promega<sup>TM</sup>) conforme instrução do fabricante. O controle de qualidade do RNA foi realizado a partir da quantificação e avaliação do grau de pureza do mesmo pelo aparelho Nanovoue<sup>®</sup> (GE) seguida da análise das preparações em gel de agarose (1,2%) Tris, borato e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TBE)/Formamida. A densidade óptica (quantificação) do RNA extraído foi mensurada no comprimento de onda a 260 nm, enquanto a relação entre os comprimentos de onda 260/280 foi indicativa de pureza e a relação 260/230 indicativa de contaminação. As razões acima de 1,8 foram aceitas como adequadas para quantificação da expressão gênica (MANCHESTER, 1996; FLEIGE *et al.*, 2006; BECKER *et al.*, 2010).

#### **4.11.2 Síntese de cDNA**

O ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 µL de tampão 10× (500 mM de cloreto de potássio (KCl), 100 mM de tris hidroximetilaminometano cloridrato (Tris-HCl), 25 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) em pH 8,3, 0,8 µL da mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 100 mM, 2 µL de *primers* randômicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa *MultiScribe* (50 U/µL). A reação foi realizada nas seguintes condições, 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C no termociclador (*Biocycler*, modelo MJ96+, cidade e país). As amostras de cDNA foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

#### **4.11.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de mRNA depositadas no banco de dados *Rat Genome Database (RGD)*, disponível em <http://rgd.mcw.edu>) e posteriormente idealizados pelo *NCBI/ Primer-BLAST* (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), conforme a Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequências de primers de genes selecionados para qRT-PCR.

Gene	Nº (RGDID)	Primer sequence (5'-3')
<i>PGC-1<math>\alpha</math></i>	NM_031347.1	F: 5'-ATGGCTTGGGACATGTGCAG-3' R: 5'-CAAAGAGGCTGGTCCTCACC-3'
<i>SIRT-1</i>	NM_001372090.1	F: 5'-AGGGAACCTCTGCCTCATCT-3' R: 5'-TGGCATACTCGCCACCTAAC-3'
<i>UCP-3</i>	NM_013167.2	F: 5'-CATCAGGATTCTGGCAGGCT-3' R: 5'-CTCCAGTTCACAGGCGTATC-3'
<i>AMPK</i>	NM_023991.1	F: 5'-GAAGATCGGACACTACGTGCT-3' R: 5'-CTGCCACTTTATGGCCTGTC-3'
<i>LDH</i>	NM_017025.1	F: 5'-CCTCAGCGTCCCATGTATCC-3' R: 5'-TTCTGGATTCCCCAGAGGGT-3'
<i>MCT-1</i>	NM_012716.2	F: 5'-ACGCGGGAGTCTTTGGATTT-3' R: 5'-CAGCACTGGAGAACCTCTGG-3'
<i>HPRT-1</i>	NM_013556.2	F: 5'-GTCAAGCAGTACAGCCCCAA-3' R: 5'-GGCCTGTATCCAACACTTCG-3'

Primers usados (*Forward and Reverse*)

#### 4.11.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada pelo reagente *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços. Para a análise, foram pipetados 2  $\mu$ L de cDNA diluído 5 $\times$  em água livre de DNase, 3  $\mu$ L dos primers (na concentração de 2,5  $\mu$ M) e 5  $\mu$ L de *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), totalizando um volume final de reação de 10  $\mu$ L.

Os ensaios foram realizados em triplicata técnica para todos os genes avaliados, com o gene de referência (*HPRT-1*) presente em todas as placas. A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7500 Applied Biosystems: 95° C por 10 min (ativação da polimerase), 40 ciclos de 95° C por 15 segundos (desnaturação) e 60° C por 1 minuto (anelamento dos primers e

extensão) A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os valores de baseline foram ajustados para 3-15 ciclos e o threshold foi fixado em 0,2. Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica através do ciclo de quantificação Cq comparativo ou  $2^{-\Delta Cq}$  que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi normalizada pelo gene de referência (*HPRT-1*) ( $\Delta Cq = Cq$  do gene alvo –  $Cq$  do gene de referência) e os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considerou a quantidade do alvo, normalizado ( $2^{-\Delta Cq}$ ).

#### 4.11.5 Cálculo da eficiência dos primers

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene de referência foram construídas curvas padrões para cada amplicon. As curvas padrões foram estabelecidas com cinco diluições seriadas (diluição 4x) a partir de um pool de cDNA das amostras. A curva padrão foi gerada em um gráfico de regressão linear semi-log do valor de Cq (eixo Y) em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X).

O valor do slope gerado pela curva padrão foi utilizado para estimar a eficiência de amplificação. Uma reação com 100% de eficiência apresentaria um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ( $\log_2 10 = 3,3219$ ); assim, o amplicon dobraria em quantidade durante a fase exponencial.

A estimativa da eficiência (E) foi calculada pela fórmula:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Desse modo, os primers foram considerados adequados para avaliar a expressão gênica quando apresentaram eficiência de reação entre 80 e 120%.

#### 4.11.6 Curva de dissociação dos amplicons

Foi realizada a análise da curva de dissociação dos amplicons, conforme guia de informações mínimas para publicação de experimentos de PCR (MIQE) (BUSTIN, 2009), para identificar a formação de produtos inespecíficos no final de cada corrida, possivelmente gerados a partir de excesso de primers ou falha no desenho dos mesmos.

Ao final dos 40 ciclos da qRT-PCR, a temperatura foi elevada gradualmente de 60 à 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada grau Celsius. Na medida em que os amplicons desnaturaram, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR<sup>®</sup> Green foi reduzido e a temperatura em que metade do produto da PCR estava dissociada medida. O gráfico resultante permitiu verificar se houve um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>), específicas e dependentes do tamanho do fragmento e do conteúdo de guanina-citosina (%GC). O T<sub>m</sub> desejado foi em torno de 80°C.

#### 4.11.7 Validação do $\Delta Cq$

Para determinar se as reações de amplificação apresentavam a mesma eficiência, foi observada a maneira em que o  $\Delta Cq$  (Cq alvo – Cq referência) variava com a diluição da amostra (pool de cDNA do músculo gastrocnêmio). A avaliação das eficiências relativas da amplificação do alvo e da amplificação do gene de referência foi alcançada pela corrida de curvas padrões para cada amplicon utilizando a mesma amostra. A amostra no experimento de validação expressava ambos os genes alvo e gene de referência. Os valores de Cq gerados a partir dos pontos de massa da curva padrão equivalente (alvo em comparação a referência) foram usados no cálculo do  $\Delta Cq$ . Os valores foram colocados em gráfico em comparação ao log de entrada para criar uma regressão linear semi-log. O slope da regressão linear semi-log foi utilizado como critério geral para o experimento de validação, cujo valor absoluto foi menor ou igual a -1.

Foi avaliada a variação do  $\Delta Cq$  (Cq alvo – Cq referência) em cada diluição da amostra para verificar se as reações de amplificação apresentavam a mesma eficiência. Para avaliar a eficiência relativa da amplificação dos genes alvo e de referência foram geradas curvas padrões para cada amplicon da mesma amostra. Os valores de Cq gerados a partir dos pontos de massa da curva padrão equivalente (alvo em comparação a referência) foram usados no cálculo do  $\Delta Cq$ .

A partir dos valores obtidos foi gerado um gráfico em comparação ao log de entrada para criar uma regressão linear semi-log. O slope da regressão linear semi-log foi utilizado como critério geral para o experimento de validação, cujo valor absoluto foi menor ou igual a -1.

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo software *GraphPad Prism 6* for Windows, (Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos com médias  $\pm$  SEM. Análises entre dois grupos foram realizadas pelo teste “*t de Student*” não pareado. A normalidade dos dados foi testada pelo teste *kolmogorov smirnov*. A análise de alguns parâmetros foi realizada utilizando o teste estatístico (ANOVA two-way, seguido do pós-teste Bonferroni). Análises de correlação foram realizadas a partir do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman. O critério para significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros biométricos de ratos 2R1C submetidos ao ExV

Como mostrado na tabela 2, os ratos 2R1C-SED e 2R1C-ExV apresentaram aumento da massa do coração e do rim direito e redução do rim esquerdo comparado aos ratos SHAM-SED. Não foi observada diferença estatística entre os demais parâmetros.

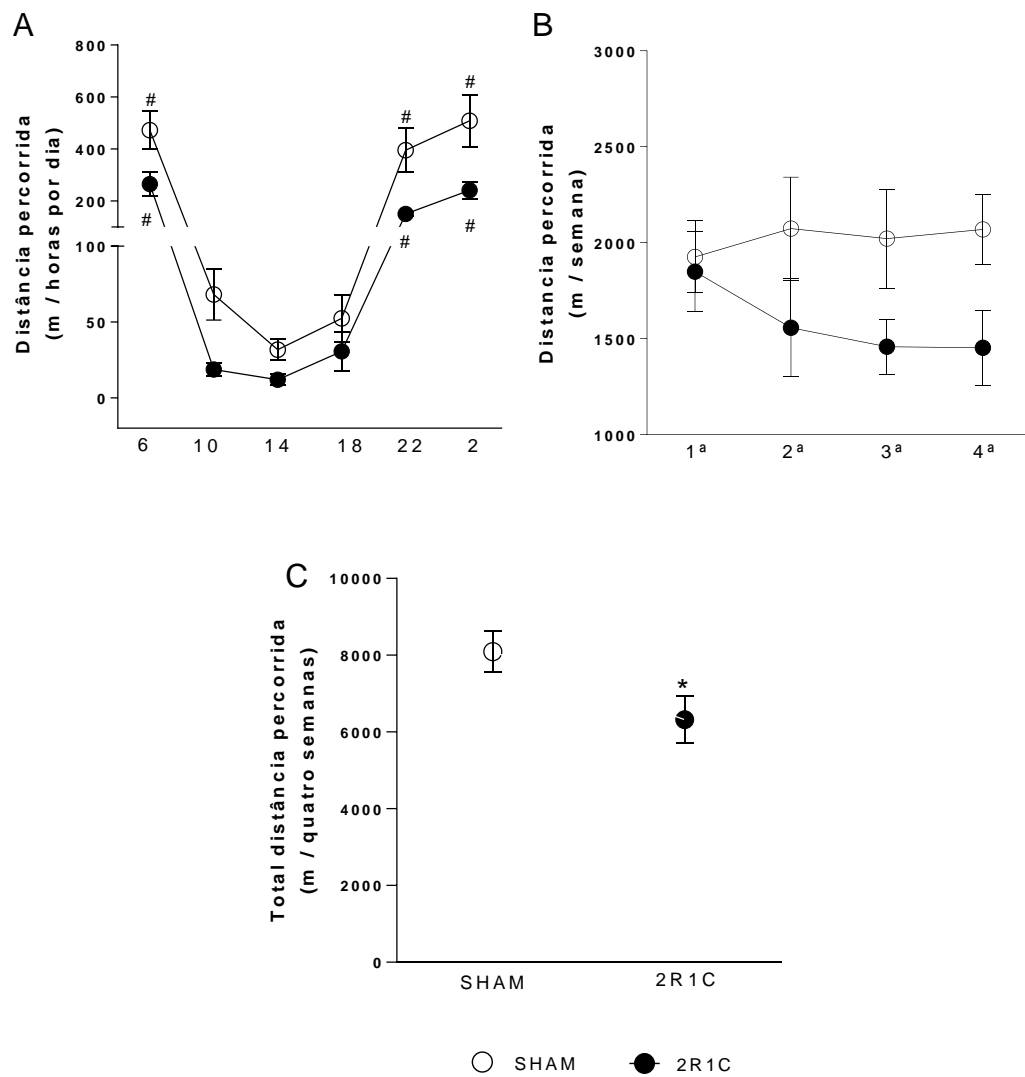
**Tabela 2: Parâmetros biométricos de 2R1C submetidos ao ExV**

	Grupos experimentais			
	SHAM		2R1C	
	SED	ExV	SED	ExV
Massa corporal (g)	287 ± 4,9	289 ± 5,5	283 ± 4,5	279 ± 6,7
Rim esquerdo (g/100g)	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,24 ± 0,3	0,27 ± 0,02*
Rim direito (g/100g)	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,46 ± 0,01*	0,48 ± 0,01*
Coração (g/100g)	0,32 ± 0,005	0,32 ± 0,009	0,37 ± 0,01*	0,38 ± 0,01*
Músculo gastrocnêmio (g)	0,40 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01
n	8-18	8-18	8-18	8-18

Mensuração da massa corporal (g), do peso relativo (g/ 100g de peso do rato) em ratos normotensos (SHAM, n=18) e hipertensos (2R1C, n=18) submetidos ao exercício voluntário (ExV). \*p <0,05 comparado aos ratos SHAM-ExV (ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média. Número (n)

## **5.2 Adesão e intermitência: ExV**

Na primeira semana (adaptação), 76% dos ratos ( $n = 72$ ) aderiram ao ExV, sendo que os ratos 2R1C-ExV e SHAM-ExV percorreram distâncias semelhantes durante o período de adaptação. Os ratos 2R1C-ExV e SHAM-ExV, ao longo do dia, mostraram preferência às 6, 22 e 14 horas, no entanto, percorreram distâncias semelhantes em todas as horas e semanas avaliadas (Figura 3A; 3B). Por outro lado, a distância total percorrida no final das 4 semanas de ExV foi menor em ratos 2R1C-ExV em comparação com ratos SHAM-ExV (Figura 3C).



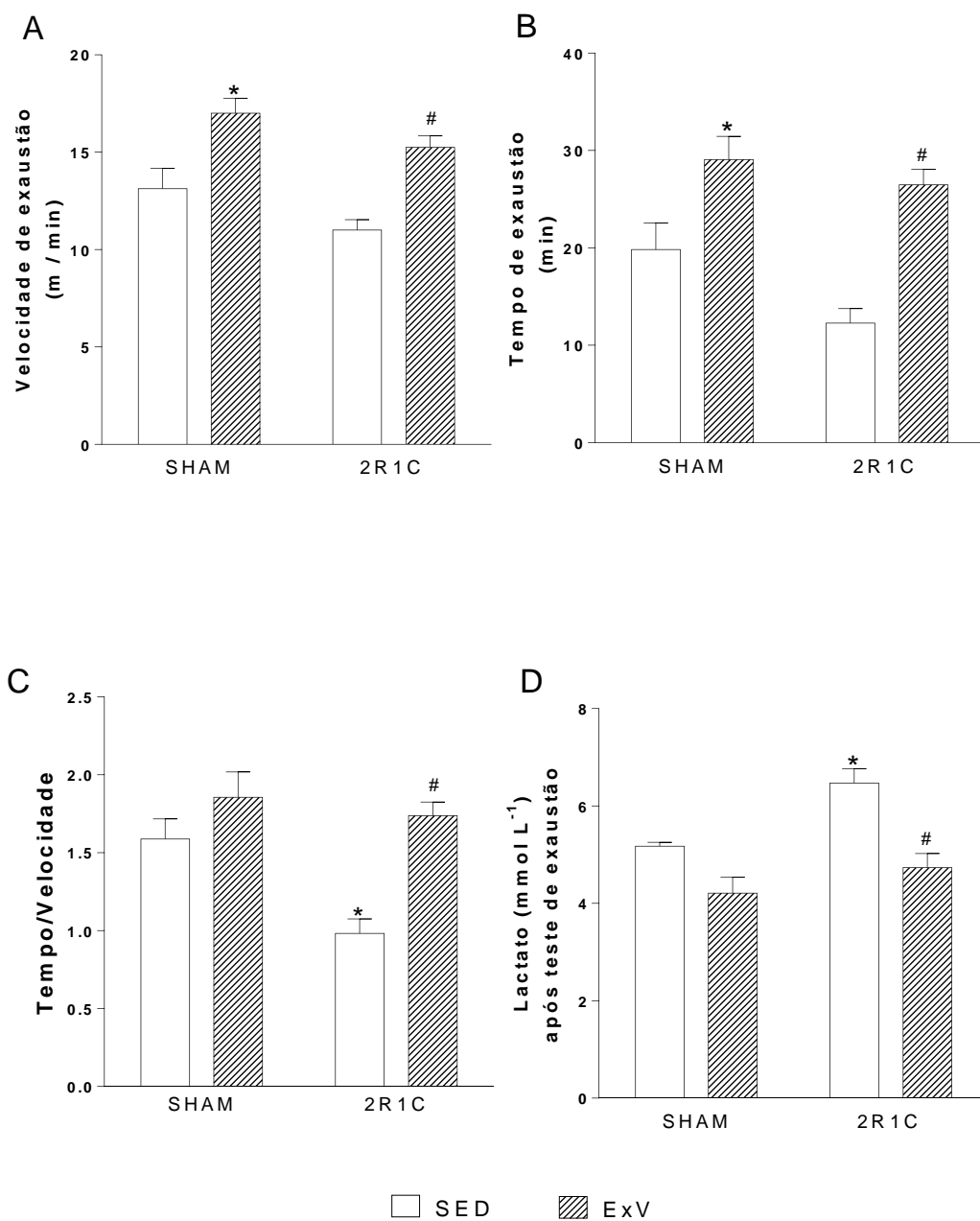
**Figura 3:** Avaliação da distância percorrida (m) por intervalos do dia (painel A), distância percorrida (m) em semanas (painel B) e distância total percorrida após 4 semanas (painel C) em ratos normotensos (SHAM, n=18) e hipertensos (2R1C, n=18) submetidos ao exercício voluntário (ExV). \*p < 0,05 comparado aos ratos SHAM-ExV. #p < 0,05 comparado aos ratos 2R1C-ExV às 6, 22 e 2 horas (ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média.



### **5.3 O ExV melhora o condicionamento físico nos 2R1C ratos**

Durante o teste de exaustão, a velocidade (Figura 4A) e o tempo (Figura 4B) dos ratos 2R1C-ExV (15m/min por 26min; n=8, respectivamente) e os ratos SHAM-ExV (17m/min por 29min; n=8, respectivamente) foram similares entre si, porém superiores em relação aos seus respectivos controles 2R1C-SED (11m/min por 12min; n=8) e SHAM-SED (13m/min por 20min; n=8). E ainda, a relação entre o tempo e a velocidade durante o teste de exaustão (Figura 4C) foi menor nos ratos 2R1C-SED comparado aos SHAM-SED, e maior nos ratos 2R1C-ExV comparado aos 2R1C-SED.

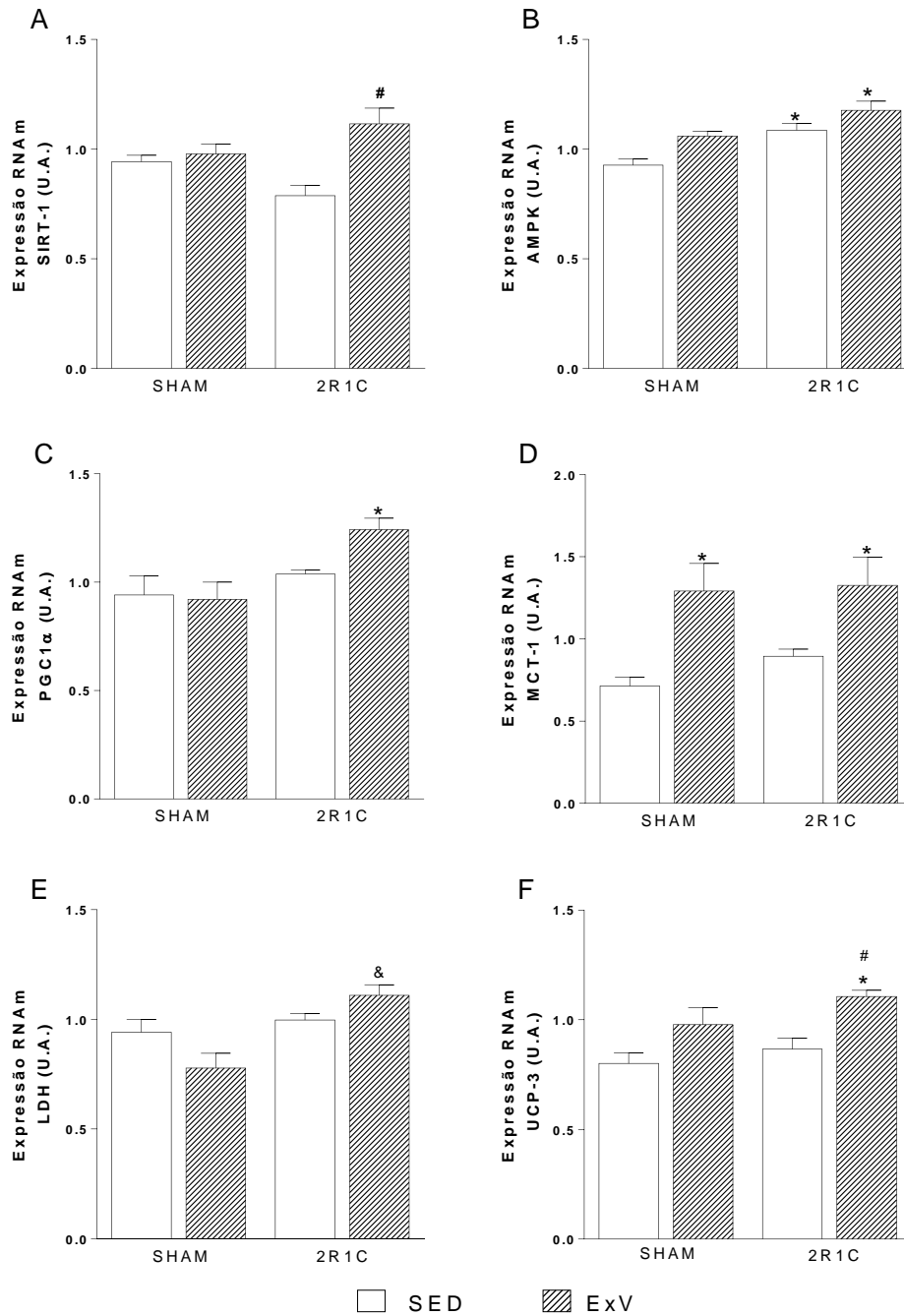
Ao fim do teste de exaustão a concentração de lactato plasmático dos ratos 2R1C-SED ( $6,4 \pm 0,2$  mmol/L; n=8) foi maior comparado aos ratos SHAM-SED ( $5,1 \pm 0,08$  mmol/L; n=8), enquanto os ratos 2R1C-ExV ( $4,7 \pm 0,2$  mmol/L; n=8) apresentaram redução na concentração do lactato plasmático comparado aos ratos 2R1C-SED e similar aos ratos SHAM-SED (Figura 4D).



**Figura 4:** Avaliação da velocidade (m/min; painel A), tempo (min; painel B), relação entre tempo e velocidade (painel C), e concentração de lactato plasmático ao fim do teste de exaustão (nmol L<sup>-1</sup>; painel D) em ratos normotensos (SHAM) e hipertensos (2R1C) mantidos sedentários (SED, n=8) ou submetidos ao exercício voluntário (ExV, n=8). \*p <0,05 comparado aos ratos SHAM-SED e #p <0,05 comparado aos ratos 2R1C-SED (ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média.

#### **5.4 O ExV aumenta a expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial e do metabolismo muscular**

Os ratos 2R1C-ExV apresentaram maior expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , UCP-3, MCT-1, AMPK ( $1,24\pm 0,05$ ;  $1,10\pm 0,02$ ;  $1,32\pm 0,01$  e  $1,17\pm 0,04$  U.A. n=4-8, Figura 5A, 5C, 5D e 5F respectivamente) comparado aos ratos SHAM-SED ( $0,94\pm 0,08$ ;  $0,80\pm 0,04$ ;  $0,71\pm 0,05$  e  $0,92\pm 0,02$  U.A.; n=4-8, respectivamente). A expressão gênica da SIRT-1 e da UCP-3 foi maior nos ratos 2R1C-ExV ( $1,22\pm 0,09$  e  $1,10\pm 0,02$  U.A.; n=6-8, respectivamente, Figura 5B, 5C) comparado aos ratos 2R1C-SED ( $0,74\pm 0,4$  e  $0,86\pm 0,05$  U.A.; n=6-8; respectivamente). A expressão gênica do LDH foi maior nos ratos 2R1C-ExV comparado aos SHAM-ExV.



**Figura 5:** Avaliação da expressão gênica (UA) da sirtuina-1 (SIRT-1, painel A), proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK, painel B), coativador do receptor 1  $\alpha$  ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 $\alpha$ , painel C), transportador de monocarboxilato 1 (MCT-1, painel D), lactato desidrogenase (LDH, painel E), proteína desacoplada 3 (UCP-3; painel F) em ratos normotensos (SHAM, n=4-8) e hipertensos (2R1C, n=3-8) mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao exercício voluntário (ExV) após 4 semanas. \*p<0,05 comparado aos ratos SHAM-SED; #p <0,05 comparado aos ratos 2R1C-SED e &p<0,05 comparado aos ratos SHAM-ExV (ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.5 Correlação entre lactato e PGC-1 $\alpha$ e marcadores do metabolismo muscular

Os ratos 2R1C-ExV apresentaram correlação negativa entre os níveis de lactato e a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  e uma correlação positiva com a expressão do gene MCT-1 (tabela 3). E ainda mostraram correlação positiva entre a expressão gênica de PGC-1  $\alpha$  com a expressão gênica de SIRT-1, AMPK, UCP-3 (tabela 3).

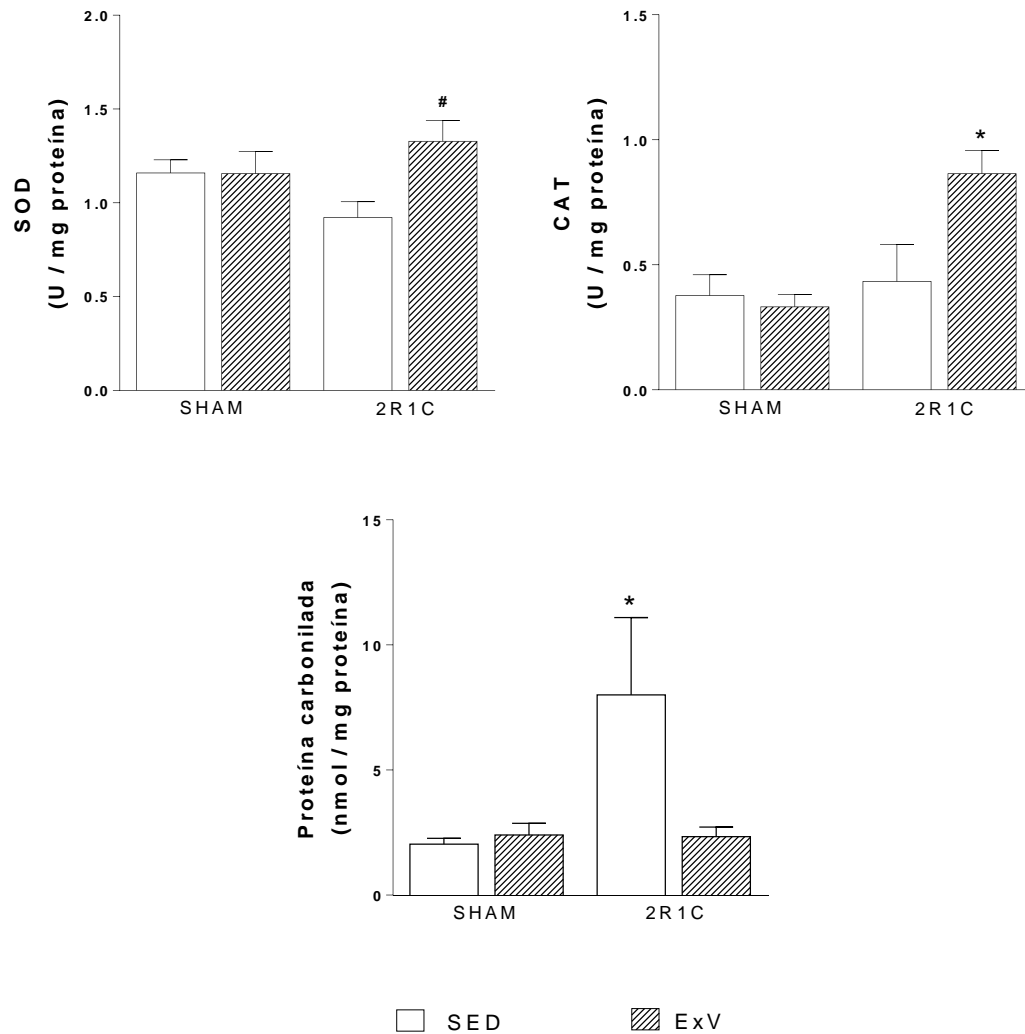
**Tabela 3:** Correlação entre lactato e PGC-1 $\alpha$  em marcadores do metabolismo muscular

Coeficientes	Lactato		PGC-1 $\alpha$		
	PGC-1 $\alpha$	MCT-1	SIRT-1	AMPK	UCP-3
P	-0.9275	0.9501	0.9570	0.9743	0.8495
R <sup>2</sup>	0.8602	0.9027	0.9158	0.9492	0.7216
n	5	5	5	4	5

Coativador do receptor 1 $\alpha$  ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 $\alpha$ ), transportador de monocarboxilato 1 (MCT-1), sirtuina-1 (SIRT-1), proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), proteína desacoplada 3 (UCP-3), número (n). Correlação de Pearson, p<0,05

## 5.6 O ExV melhora o processo redox em ratos 2R1C

Os animais 2R1C-ExV apresentaram maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD,  $1,32 \pm 0,1$ ; U/mg de proteína, n=6;) comparado aos animais 2R1C-SED ( $0,92 \pm 0,1$  U/mg de proteína, n=6; Figura 6A), e da enzima catalase (CAT,  $0,86 \pm 0,09$  U/mg de proteína, n=3-4; Figura 6B) em relação aos animais SHAM-SED ( $0,37 \pm 0,08$  U/mg de proteína, n=4). Já o produto do processo redox, proteína carbonilada, foi maior nos animais 2R1C-SED ( $2,8 \pm 1$  nmol/mg de proteína; n=6) comparado aos ratos SHAM-SED ( $0,71 \pm 0,09$  nmol/mg de proteína; n=8), enquanto a concentração de proteína carbonilada nos ratos 2R1C-ExV ( $0,85 \pm 0,1$  nmol/mg de proteína; n=7) foi similar aos ratos SHAM-SED (Figura 6C).

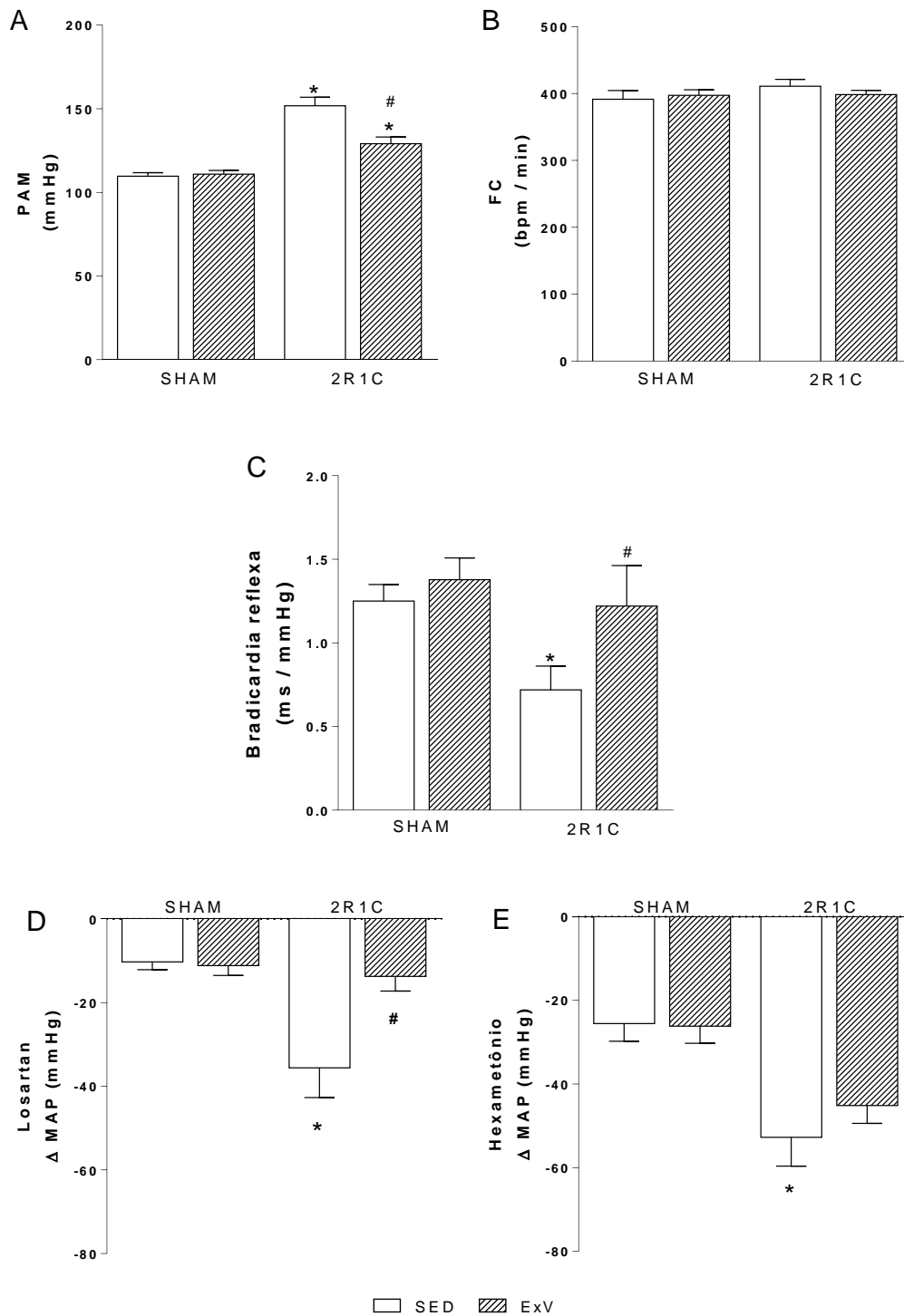


**Figura 6:** Avaliação das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, U/mg; Painel A) e catalase (CAT, U/mg; Painel B), conteúdo de proteína carboniladas (nmol/mg, Painel C) em ratos normotensos (SHAM, n=4-7) e hipertensos (2R1C, n=4-6) mantidos sedentários (SED) ou submetidos a exercício voluntário (ExV) após 4 semanas. \*p < 0,05 comparado aos ratos SHAM-SED; #p < 0,05 comparado aos ratos 2R1C-SED (ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média.

### **5.7 ExV melhora PAM e a sensibilidade da bradicardia reflexa de ratos 2R1C**

A PAM nos ratos 2R1C-SED ( $152 \pm 5$  mmHg;  $n=18$ ) foi maior comparado aos ratos SHAM-SED ( $110,8 \pm 2$  mmHg;  $n=18$ ). Já os animais 2R1C submetidos ao ExV ( $130 \pm 4$  mmHg;  $n=18$ ) apresentaram PAM menor em relação aos 2R1C-SED e maior em relação aos ratos SHAM-SED (Figura 7A). A FC (batimentos/min) foi similar entre todos os grupos experimentais (Figura 7B). Os animais 2R1C-SED ( $0,71 \pm 0,14$  ms/mmHg;  $n=10$ ) apresentaram menor sensibilidade da bradicardia reflexa comparado aos ratos SHAM-SED ( $1,25 \pm 0,06$  ms/mmHg;  $n=10$ ) e os animais 2R1C-ExV ( $1,20 \pm 0,24$  ms/mmHg;  $n=10$ ) apresentaram maior sensibilidade da bradicardia reflexa comparados aos ratos 2R1C-SED e similar aos ratos SHAM-SED (Figura 7C). A contribuição simpática e os níveis de Ang II para manutenção da PAM foi quantificada pela determinação da redução da PA em resposta ao bloqueio ganglionar produzido pelo hexametônio (10mg; Figura 7E) e losartan (20mg; Figura 7D) por a injeção endovenosa, que induziu maior queda na variação da PAM nos ratos 2R1C-SED ( $-36 \pm 7$  e  $-53 \pm 7$  mmHg;  $n=4-9$ , respectivamente) comparado aos ratos SHAM-SED ( $-10 \pm 2$  e  $-26 \pm 4$  mmHg;  $n=4-9$ , respectivamente). A queda da PAM induzida pelo losartan nos ratos 2R1C-ExV ( $-14 \pm 3$  mmHg;  $n=4$ ) foi menor comparado aos ratos 2R1C-SED, enquanto o hexametônio induziu queda similar da PAM nos ratos 2R1C-ExV ( $-45 \pm 4$  mmHg;  $n=9$ ) comparado os ratos SHAM-SED. Não houve diferença entre a variação da FC após as injeções de losartan e hexametônio entre os grupos experimentais.





**Figura 7:** Avaliação da pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca (FC, bpm, painel B), bradicardia reflexa (ms/mmHg, painel C). Variação ( $\Delta$ ) da PAM após injeção intravenosa de losartan (10 mg/kg; painel D) e hexametônio (10 mg/kg; painel E) em ratos normotensos (SHAM, n=5-18) e hipertensos (2K1C, n=5-18) mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao exercício voluntário (ExV) após 4 semanas. \*p <0,05 comparado aos ratos SHAM-SED; #p <0,05 comparado aos ratos 2R1C-SED (ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que ratos com hipertensão renovascular 2R1C submetidos ao ExV apresentaram adaptações fisiológicas benéficas como melhora do metabolismo basal e do processo redox no músculo gastrocnêmio. Além disso, o ExV induziu redução da atividade simpática e dos níveis de angiotensina II via AT1R e, conseqüentemente, contribuiu para a redução da PAM e melhora da SBR em ratos hipertensos 2R1C. Em conjunto, essas adaptações ao ExV promoveram melhora no condicionamento físico e da função cardiovascular nos ratos 2R1C.

Na hipertensão renovascular 2R1C ocorre aumento dos níveis plasmáticos e teciduais de Ang II (ČERVENKA *et al.*, 2002; LAZARTIGUES; FENG; LAVOIE, 2007; PADIA; CAREY, 2013), da atividade simpática (ESLER; LAMBERT; SCHLAICH, 2010; GUAN *et al.*, 1992; GUYENET, 2006) e da produção de ROS (MAJZUNOVA *et al.*, 2013; NISHI *et al.*, 2010; PATEL, 2016). Trabalhos de nosso laboratório (DE CASTRO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2015) e de outros grupos (CARVALHO *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2011; NISHI *et al.*, 2010) mostraram que ratos 2R1C-SED apresentaram maior reatividade a Ang II, aumento do processo redox e redução de moléculas antioxidantes na área central do controle cardiovascular, RVLM, e em órgãos alvos da função cardiovascular, o coração e rins. De fato, no presente estudo, os ratos 2R1C-SED apresentaram prejuízo no metabolismo basal evidenciado pelo aumento do lactato sanguíneo, da atividade simpática e da Ang II via AT1R, evidenciado pelo efeito do hexametonio e do losartan, respectivamente, com conseqüente aumento da PAM e diminuição da sensibilidade da bradicardia reflexa. Além disso, houve aumento do processo redox, mostrado pelo aumento de proteína carbonilada e redução da expressão da AMPK, sem alteração na atividade das enzimas CAT e SOD, e na expressão gênica da SIRT-1, PGC-1 $\alpha$ , MCT-1, LDH, UCP-3 no músculo gastrocnêmio. Esses dados, em conjunto, sugerem piora do condicionamento físico e da função cardiovascular dos ratos 2R1C.

Estudos mostraram que o EX de natação diminui o lactato sanguíneo (BARBOSA *et al.*, 2018; MENZIES *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2011), restaura o equilíbrio oxidativo e a atividade dos componentes do SRA em áreas centrais e tecidos periféricos em ratos 2R1C exercitados (MAIA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2015; ZACARIAS *et al.*, 2017).

Apesar dos benefícios do EX forçado, essa modalidade causa maior nível de estresse ao animal, dificultando a adesão e mantendo os indivíduos sedentários e propensos às doenças associadas a esta condição (KELLY; POMP, 2013). Por outro lado, o ExV se destaca por não gerar estresse no animal (GOH; LADIGES, 2015; MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2019b) principalmente por ser uma atividade natural de roedores (DE BONO *et al.*, 2006; GIRARD *et al.*, 2001; MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2019b). No presente estudo, alguns ratos (24%) não aderiram ao ExV e foram retirados do experimento para garantir que todos os ratos, mesmo os mantidos sedentários, possuíssem a mesma “pré-disposição ou aderência” ao ExV. Dados da literatura mostraram que características hereditárias podem ocasionar em diferentes fenótipos que resultam em maior ou menor capacidade intrínseca para o EX (DE BONO *et al.*, 2006; KOCH; BRITTON, 2001). A capacidade intrínseca para a atividade ou EX é definida em função do desempenho alcançado sem treino prévio, sendo determinada por diversos fatores genéticos: morfológicos e fisiológicos que interagem entre si e naturalmente predis põem indivíduos e animais não treinados a um maior ou menor desempenho em determinada modalidade (LUCCA, 2013). Neste contexto, nosso protocolo de ExV foi desenvolvido para a investigação dos mecanismos associados à adesão espontânea ao estilo de vida ativo.

Adicionalmente, tanto os ratos normotensos (SHAM-ExV) quanto os ratos hipertensos (2R1C-ExV) exercitados, apresentaram intermitência na realização do ExV, correndo mais no período escuro. Nossos dados corroboram com dados da literatura em que camundongos corriam no ciclo escuro por períodos de 5 minutos consecutivos, intercalados por períodos de pausa (EIKELBOOM; MILLS, 1988). Essa intermitência ajuda a aumentar o condicionamento físico por diminuir a fadiga muscular e melhorar o metabolismo, eliminando os metabólitos durante os intervalos de recuperação (BILLAT *et al.*, 2000; TOMLIN; WENGER, 2001). Contudo, os ratos 2R1C-ExV apresentaram menor distância total percorrida ao final de 4 semanas comparados aos ratos SHAM-ExV, sugerindo prejuízo na função metabólica decorrente da hipertensão renovascular que provavelmente influenciou na piora do desempenho físico. De fato, estudos da literatura mostram que ratos SHR e Sprague-Dawley 2R1C apresentaram menor distância percorrida na realização do ExV (HAYASHI *et al.*, 2000; KINGWELL *et al.*, 1998; ROSSI; CHEN; MALISZEWSKA-SCISLO, 2013) comparados a ratos normotensos. Nossos dados

sugerem que os ratos 2R1C-ExV apresentam uma menor distância total percorrida comparados aos ratos SHAM-ExV devido ao prejuízo do metabolismo basal que não supri a demanda energética do exercício físico associada á disfunção cardiovascular.

Na tentativa de confirmar se os ratos 2R1C apresentam prejuízo no condicionamento físico utilizamos a corrida em esteira, por se aproximar da modalidade de EX de corrida, e por possibilitar o aumento gradual de velocidade. De fato, durante o teste de exaustão, os ratos ExV (SHAM e 2R1C) atingiram maior velocidade e demoraram mais tempo para atingirem a exaustão em relação aos ratos SED (SHAM e 2R1C). Esses dados estão de acordo com estudos da literatura (FERNANDES *et al.*, 2012; GEORGIEVA *et al.*, 2017; MERCÊS *et al.*, 2019) em que ratos normotensos Wistar e SHR submetidos ao teste de exaustão em esteira, atingiram maior velocidade, tempo e distância percorrida em relação aos animais sedentários, tolerando maior realização do esforço físico e uma melhora no condicionamento físico. Adicionalmente os ratos 2R1C-SED apresentaram menor tempo de exaustão comparado ao SHAM-SED, esse prejuízo no condicionamento físico pode ser devido à fadiga muscular decorrente do aumento do lactato sanguíneo.

O condicionamento físico pode ser avaliado pela concentração plasmática de lactato. No presente estudo mostramos que os ratos 2R1C-SED apresentaram altos níveis de lactato, mas que o ExV foi eficiente em reduzir o lactato plasmático nos ratos 2R1C-ExV. Estudos com ratos 2R1C mostraram que, durante o EX, a taxa de produção de lactato é menor do que a taxa de remoção, permitindo que o EX seja realizado por um período maior de tempo (PANVELOSKI-COSTA *et al.*, 2012). E ainda estudos anteriores de nosso laboratório mostraram (BARBOSA *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2011), que o EX de natação sem carga em ratos 2R1C diminuiu as concentrações de lactato, devido as mudanças fisiológicas benéficas causadas pelo EX. De fato, o aumento do lactato prejudica a angiogênese, levando à diminuição da capacidade oxidativa, sugerindo que na hipertensão renovascular 2R1C há comprometimento na relação entre a produção e a remoção de lactato (SEIFISKISHAHR; SIAHKOHIAN; NAKHOSTIN-ROOHI, 2008; SOARES *et al.*, 2011; VOLTARELLI; GOBATTO; DE MELLO, 2002b).

Nossos dados mostram que nos ratos 2R1C-ExV os baixos níveis de lactato foram correlacionados ao aumento da expressão gênica do PGC-1 $\alpha$  ( $r=-0.9275$ ) que promoveu o aumento da expressão gênica do MCT-1 ( $=0.9501$ ), aumentando assim,

a captação de lactato sanguíneo para ser utilizado no metabolismo muscular. Esses dados estão de acordo com YOSHIDA *et al.*, (2004) que mostraram em camundongos normotensos um aumento da expressão do MCT-1 e diminuição do lactato após 6 semanas de corrida voluntária. Além disso, SUMMERMATTER *et al.*, (2013) mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam PGC-1 $\alpha$  submetidos ao exercício agudo em esteira por 26 minutos apresentaram maior expressão do receptor MCT-1 e da enzima LDH. Nesse estudo os ratos SHAM-ExV apresentaram aumento do MCT-1 sem alteração na expressão gênica do LDH sugerindo que o lactato está sendo usado como um substrato energético muscular, suprindo o metabolismo sem a necessidade de aumentar a demanda metabólica via PGC-1 $\alpha$  devido a baixa intensidade da ExV. No entanto, nos ratos 2R1C-ExV a expressão gênica do LDH foi maior comparado ao SHAM-ExV, provavelmente devido a melhora metabólica nos ratos 2R1C-ExV. O PGC-1 $\alpha$  regula a homeostase do lactato pelo aumento da expressão gênica do MCT-1 e do LDH metabolizando o lactato a piruvato que é direcionada ao metabolismo mitocondrial (MATSUKAWA *et al.*, 2017; SUMMERMATTER *et al.*, 2013).

As alterações que o PGC-1 $\alpha$  induz são mediadas, na maioria das vezes, por AMPK, que fosforila genes como SIRT-1 e UCP-3 na regulação de importantes vias metabólicas no músculo esquelético (AKIMOTO *et al.*, 2005; JØRGENSEN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2014). Nossos dados mostram que o aumento na expressão gênica do PGC-1 $\alpha$  foi correlacionado com a expressão gênica de UCP-3 ( $r=0.8495$ ), de AMPK ( $r=0.9743$ ) e de SIRT-1 ( $r=0.9570$ ), sugerindo que esses genes possam ser considerados como marcadores do condicionamento físico nos animais 2R1C-ExV. Nossos dados estão de acordo com estudos que mostraram que o EX forçado em esteira induziu aumento na expressão gênica da UCP-3 (KIM *et al.*, 2014; SCHRAUWEN *et al.*, 2002) e SIRT-1 no músculo esquelético de ratos machos Sprague-Dawley (BAYOD *et al.*, 2012; OLIVEIRA, NARA R.C. *et al.*, 2014). Nossa hipótese é que a contração muscular estimula a SIRT-1 que ativa AMPK que fosforila PGC-1 $\alpha$  favorecendo a biogênese mitocondrial promovendo aumento da expressão gênica do LDH que forma substrato para quebra do lactato em piruvato estimulando aumento do metabolismo mitocondrial via UCP-3 (CHANG, HUNG-CHUN, GUARENTE, 2005; IKEDA *et al.*, 2006; MATSUKAWA *et al.*, 2017; SUMMERMATTER *et al.*, 2013; YOSHIDA *et al.*, 2004).

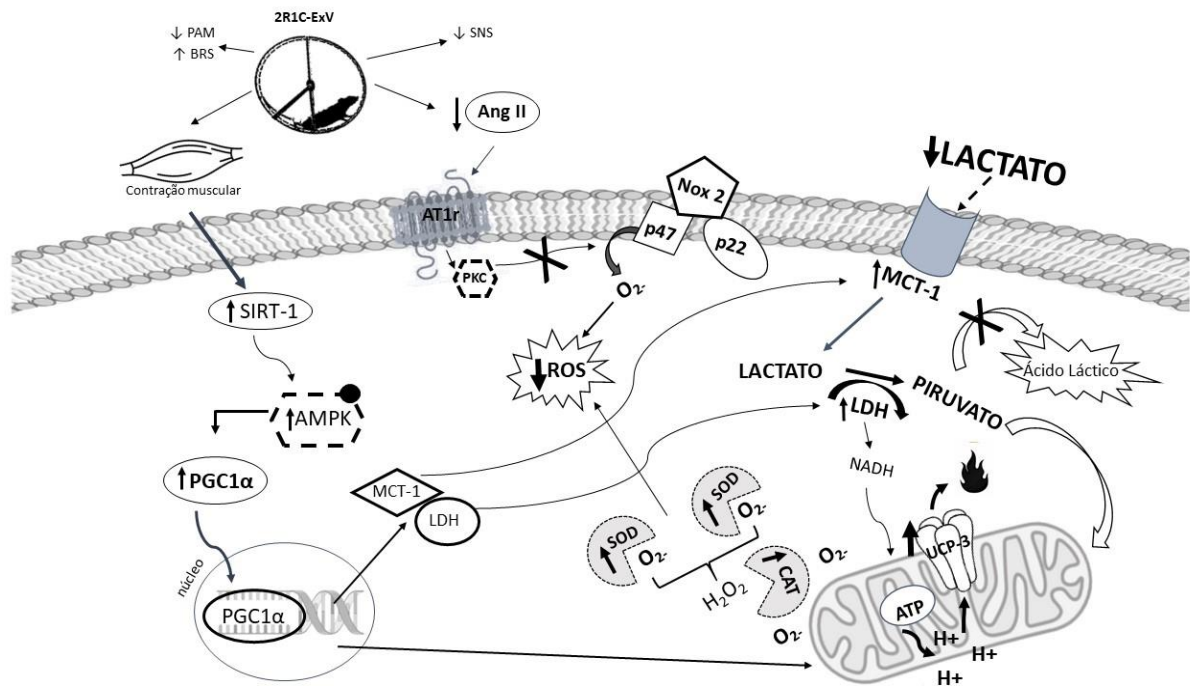
As mitocôndrias são as principais produtoras de ROS e no músculo a UCP-3 regula o gasto energético por meio da termogênese. O Ex de baixa intensidade estimula as respostas adaptativas às defesas antioxidantes, mantendo o equilíbrio redox muscular (PARKER; MCGUCKIN; LEICHT, 2014; ZUO *et al.*, 2015). Estudos sugerem que a SIRT-1 protege do (HE *et al.*, 2016) estresse oxidativo, induzindo a expressão de CAT e SOD (SALMINEN; KAARNIRANTA; KAUPPINEN, 2013; SINGH *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2016) e que a redução de ROS melhora o condicionamento físico e aumenta a força muscular (REID *et al.*, 1992; YFANTI *et al.*, 2012). Como já mencionado no presente estudo os ratos 2R1C-ExV apresentaram redução nos níveis de lactato sanguíneo e aumento da expressão gênica de SIRT-1, de PGC1- $\alpha$  que provavelmente contribuiu para o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no músculo gastrocnêmio, sugerindo que o ExV estimulou a biogênese mitocondrial e minimizou o dano oxidativo decorrente da hipertensão renovascular 2R1C.

Estudos em ratos Sprague-Dawley 2R1C e SHR submetidos à corrida voluntária por 6, 8 ou 12 semanas apresentaram redução na PA, nos níveis plasmáticos de renina (HAYASHI *et al.*, 2000; KINNEY LAPIER *et al.*, 2001) e de Ang II (WALDMAN *et al.*, 2017), diminuição do tônus vasomotor simpático e melhora na bradicardia reflexa (ROSSI *et al.* 2013). No presente estudo, a corrida voluntária reduziu a PAM e restaurou a sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos 2R1C-ExV, provavelmente devido à redução nos níveis de Ang II e da atividade simpática evidenciado, respectivamente, pela administração do antagonista do receptor AT1, losartan e do bloqueador ganglionar, hexametônio. Essa melhora dos parâmetros hemodinâmicos pode estar associada a característica intermitente do ExV que durante o intervalo melhora a bradicardia de repouso que esta correlacionada ao aumento do tônus vagal (MEDEIROS *et al.*, 2004)

De acordo com MAIA *et al.*, 2015, alterações estruturais e funcionais no coração e rins, estão envolvidas na hiperatividade do SNS e SRA contribuindo para HA. O modelo de hipertensão 2R1C utilizado no presente estudo foi eficiente, como mostrado pela redução do peso do rim clipado dos ratos 2R1C (ExV e SED) e pelo aumento do peso do rim não clipado. A redução do rim clipado ocorre devido a redução do fluxo sanguíneo induzido pelo clipe, enquanto a hipertrofia do rim contralateral indica uma hiperfunção compensatória (MAIA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2015; ZACARIAS *et al.*, 2017).

A hipertrofia cardíaca pode ocorrer como uma resposta adaptativa fisiológica ao EX ou patológica (doenças valvulares, hipertensão ou obesidade) ou ao aumento do trabalho cardíaco (HUNTER; CHIEN, 1999; SCHEUER *et al.*, 1982). Em nosso trabalho, os animais 2R1C-ExV apresentaram uma maior hipertrofia cardíaca sugerindo uma hipertrofia excêntrica pelo melhor condicionamento físico desses animais. Já os ratos 2R1C-SED também apresentaram hipertrofia cardíaca provavelmente de caráter concêntrica devido à piora do condicionamento físico. ALLEN *et al* (2001) mostraram que camundongos submetidos ao ExV apresentaram hipertrofia cardíaca fisiológica. E em estudos anteriores de nosso laboratório (MAIA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2011) mostraram que ratos 2R1C-SED tiveram uma hipertrofia concêntrica, por apresentarem aumento na parede ventricular em relação a sua luz ventricular.

Diante do exposto, propomos (Figura8) que a regulação positiva do PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético melhora o desempenho durante o exercício. A resposta adaptativa ao ExV induz regulação positiva do PGC-1 $\alpha$ , via estímulo de SIRT-1 e AMPK. O PGC-1 $\alpha$  é translocado para núcleo e estimula a transcrição do MCT-1, receptor de lactato, e da enzima LDH, que converte o lactato em piruvato. O piruvato formado, é utilizado como substrato energético na mitocôndria, que aumenta os componentes da cadeia respiratória como a UCP-3, e conseqüentemente estimula a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Além disso, a resposta adaptativa ao ExV induz melhora da SBR, da PAM, do SNS e os níveis de Ang II promovendo a melhora do condicionamento físico.



**Figura 8:** Proposta de mecanismo induzido pelo ExV na melhora do metabolismo muscular. O ExV melhora o metabolismo muscular. A regulação positiva do PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético melhora o desempenho durante o exercício. O aumento do metabolismo do lactato em resposta à regulação positiva da PGC-1 $\alpha$ , melhorou o condicionamento físico, reduziu a fadiga, os níveis de Ang II, e o processo redox. Essa regulação positiva do PGC-1 $\alpha$  é modulada pelo aumento da SIRT-1 decorrente da contração muscular, que estimula a AMPK, fazendo o PGC-1 $\alpha$  ser translocado para o núcleo promovendo a biogênese mitocondrial e a transcrição de genes envolvidos no metabolismo do lactato como o MCT-1, transportador de lactato e a enzima LDH, que converte lactato a piruvato. O piruvato formado é utilizado como substrato energético na mitocôndria, aumentando os componentes da cadeia respiratória como a UCP-3, além das enzimas antioxidantes SOD e CAT. A diminuição da AngII, o bom uso dos substratos energéticos, associado ao aumento de enzimas antioxidantes melhorou o processo redox. Exercício voluntário (ExV); Sirtuína 1 (SIRT-1); Proteína quinase ativada por AMP (AMPK); Coativador do receptor 1 $\alpha$  pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ); transportador de monocarboxilato 1 (MCT-1); lactato desidrogenase complexo (LDH); proteína desacoplada 3 (UCP-3); catalase (CAT); superóxido dismutase (SOD); espécies reativas de oxigênio (ERO); angiotensina II (Ang II); Receptor Ang tipo 1 (AT1r); proteína cinase C (PKC); NADPH oxidase 2 (NOX 2). X = inibição da via; ↓ = redução, ↑ = aumento; PKC = proteína cinase C.



## **8 CONCLUSÃO**

Em conjunto nossos dados mostraram que os ratos 2R1C-ExV apresentaram melhor condicionamento físico avaliado pelo teste de exaustão, melhora do metabolismo energético e do processo redox no músculo gastrocnêmio. Essa melhora no metabolismo, provavelmente, restaurou a atividade simpática e os níveis de angiotensina II via AT1R e, conseqüentemente, contribuiu para a redução da PAM e melhora da sensibilidade à bradicardia reflexa em ratos com hipertensão 2R1C.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, Ana P. *et al.* Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Physiology*, 2012.
- AEBI, Hugo. [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 1984.
- AGUIAR, Aderbal S.; PINHO, Ricardo A. Effects of physical exercise over the redox brain state. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2007.
- AICHER, Sue A. *et al.* Nucleus tractus solitarius efferent terminals synapse on neurons in the caudal ventrolateral medulla that project to the rostral ventrolateral medulla. *Brain Research*, 1995.
- AKABANE, Satoshi *et al.* Alterations in renal Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase activity and [<sup>3</sup>H] Ouabain Binding in Goldblatt Hypertensive Rabbits. . [S.l: s.n.]. , 1985
- AKIMOTO, Takayuki *et al.* Exercise stimulates Pgc-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2005.
- ALLEN, David L. *et al.* Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of Applied Physiology*, v. 90, n. 5, p. 1900–1908, 2001.
- ALZAMORA, Andréia C.; SANTOS, Robson A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria J. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2006a.
- ALZAMORA, Andréia C.; SANTOS, Robson A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria J. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 290, n. 4, p. 1027–1034, 2006b.
- AUWERX, Johan; CANTO, Carles. PGC-1  $\alpha$  , SIRT1 and AMPK , an energy sensing network that controls energy expenditure ´ and Johan Auwerx. 2009.
- BARBOSA, Maria Andrea *et al.* Physical training improves thermogenesis and insulin pathway, and induces remodeling in white and brown adipose tissues. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 74, n. 3, p. 441–454, 2018.
- BAYOD, S. *et al.* Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Experimental Gerontology*, v. 47, n. 12, p. 925–935, 2012.

- BECKER, Thomas *et al.* FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*, 2010.
- BENZIANE, Boubacar *et al.* Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 295, n. 6, 2008.
- BILLAT, V *et al.* Effect of a prior intermittent run at  $vVO(2max)$  on oxygen kinetics during an all-out severe run in humans. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. [S.l: s.n.]. , 2000
- BROOKS, George A. Current concepts in lactate exchange. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1991.
- BROOKS, George A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. 2000, [S.l: s.n.], 2000.
- BUSTIN, Julián. [Atypical antipsychotics and CATIE-AD. Is this a turning point?]. *Vertex (Buenos Aires, Argentina)*, 2009.
- CAREY, Robert M.; SIRAGY, Helmy M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*. [S.l: s.n.]. , 2003
- CARVALHO, Taís Helena F. *et al.* Role of Endogenous Angiotensin II on Glutamatergic Actions in the Rostral Ventrolateral Medulla in Goldblatt Hypertensive Rats. *Hypertension*, v. 42, n. 4, p. 707–712, 2003.
- ČERVENKA, Luděk *et al.* Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*, 2002.
- CHANG, HUNG-CHUN, GUARENTE, Leonard. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2005.
- CHEN, Ai Dong *et al.* Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *Experimental Physiology*, 2011.
- DE BONO, J. P. *et al.* Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 290, n. 4, p. 926–934, 2006.
- DE CASTRO, Uberdan Guilherme Mendes *et al.* Nitric oxide at the CVLM is involved in the attenuation of the reflex bradycardia in renovascular hypertensive rats. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 26, n. 2, p. 118–125, 2012.
- DE GASPARO, Marc. *Angiotensin II and nitric oxide interaction. Heart Failure*

Reviews. [S.l: s.n.], 2002

DIBONA, Gerald F. Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension*, 2013.

DOEDERLEIN POLITO, Marcos *et al.* Hypotensive effects of resistance exercises performed at different intensities and same work volumes. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2003.

DOMINICI, Fernando P. *et al.* Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). *Clinical Science*. [S.l: s.n.], 2014

EGAN, Brendan *et al.* Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 588, n. 10, p. 1779–1790, 2010.

EGAN, Brendan; ZIERATH, Juleen R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013.

EIKELBOOM, Roelof; MILLS, Rebecca. A microanalysis of wheel running in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 1988.

ESLER, Murray; LAMBERT, Elisabeth; SCHLAICH, Markus. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *Journal of Applied Physiology*, 2010.

FELDMAN, J L; ELLENBERGER, H H. Central Coordination of Respiratory and Cardiovascular Control in Mammals. *Annual Review of Physiology*, 1988.

FERRARIO, Carlos M. *et al.* Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*, 1990.

FERRARIO, Carlos M.; STRAWN, William B. *Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease*. *American Journal of Cardiology*. [S.l: s.n.], 2006

FLEIGE, Simone *et al.* Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 2006.

GEORGIEVA, Katerina N. *et al.* Effect of Training at Lactate Threshold Intensity on Maximal Time to Exhaustion, Depression and Anxiety Behaviour of Spontaneously Hypertensive Rats after Kainate-Induced Status Epilepticus. *Folia medica*, v. 59, n. 1, p. 91–97, 2017.

- GIRARD, I. *et al.* Selection for high voluntary wheel-running increases speed and intermittency in house mice (*Mus domesticus*). *Journal of Experimental Biology*, v. 204, n. 24, p. 4311–4320, 2001.
- GIROTTO, Edmarlon *et al.* Adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico e fatores associados na atenção primária da hipertensão arterial. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 18, n. 6, p. 1763–1772, 2013.
- GLADDEN, L. Bruce. The role of skeletal muscle in lactate exchange during exercise: Introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 32, n. 4, p. 753–755, 2000.
- GOH, Jorming; LADIGES, Warren. Voluntary Wheel Running in Mice. *Current protocols in mouse biology*, v. 5, n. 4, p. 283–290, 2015.
- GOLDBLATT, B Y Harry *et al.* The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Studies on experimental hypertension*, 1933.
- GRASSI, Guido *et al.* Blood pressure control and cardiovascular risk profile in hypertensive patients from central and eastern European countries: Results of the BP-CARE study. *European Heart Journal*, 2011.
- GREEN, H. J. *et al.* Metabolic adaptations to training precede changes in muscle mitochondrial capacity. *Journal of Applied Physiology*, v. 72, n. 2, p. 484–491, 1992.
- GUAN, Shangbo *et al.* Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*, 1992.
- GUYENET, Patrice G. *The sympathetic control of blood pressure. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.]. , 2006
- HAN, Yvonne M.Y. *et al.* Spontaneous activity and barosensitivity of the barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats induced by transection of aortic depressor nerves. *Brain Research*, 1998.
- HAYASHI, Atsumi *et al.* of Voluntary Rats and Running System Normotensive Exercise on Blood Pressure Hypertensive Rats and in Spontaneously Summary The effect of a voluntary running exercise on blood pressure and renin-angiotensin system (RAS) was studied in male spontaneousl. p. 165–170, 2000.
- HE, Feng *et al.* Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. NOV, p. 1–10, 2016.
- HENRIKSEN, Erik J. *Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and*

- Comparative Physiology*. [S.l: s.n.], 2007
- HUNTER, John J.; CHIEN, Kenneth R. *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. *New England Journal of Medicine*. [S.l: s.n.], 1999
- IKEDA, S. *et al.* Muscle type-specific response of PGC-1 $\alpha$  and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle. *Acta Physiologica*, v. 188, n. 3–4, p. 217–223, 2006.
- JAMES, Paul A. *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 - Journal of the American Medical Association*. [S.l: s.n.], 2014
- JONES, Terry E. *et al.* Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 284, n. 1 47-1, p. 96–101, 2003.
- JØRGENSEN, Sebastian B. *et al.* Effects of  $\alpha$ -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB Journal*, 2005.
- KAGIYAMA, Shuntaro *et al.* Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. 2001, [S.l: s.n.], 2001.
- KELLY, Scott A.; POMP, Daniel. *Genetic determinants of voluntary exercise*. *Trends in Genetics*. [S.l: s.n.], 2013
- KIM, Kihoon *et al.* Effect of exercise intensity on unfolded protein response in skeletal muscle of rat. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 18, n. 3, p. 211–216, 2014.
- KING, Andrew J.; FINK, Gregory D. Chronic low-dose angiotensin II infusion increases venomotor tone by neurogenic mechanisms. *Hypertension*, v. 48, n. 5, p. 927–933, 2006.
- KINGWELL, Bronwyn A. *et al.* The effects of voluntary running on cardiac mass and aortic compliance in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, v. 16, n. 2, p. 181–185, 1998.
- KINNEY LAPIER, Tanya L. *et al.* Voluntary running improves glucose tolerance and insulin resistance in female spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, v. 14, n. 7 I, p. 708–715, 2001.
- KOCH, Lauren Gerard; BRITTON, Steven L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics*, 2001.

KUMADA, M.; TERUI, N.; KUWAKI, T. *Arterial baroreceptor reflex: Its central and peripheral neural mechanisms. Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.]. , 1990

LACERDA, Ana Cristina R. *et al.* Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neuroscience Letters*, 2006.

LAZARTIGUES, Eric *et al.* Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery. *Circulation Research*, 2004.

LAZARTIGUES, Eric; FENG, Yumei; LAVOIE, Julie. The Two fACEs of the Tissue Renin-Angiotensin Systems: Implication in Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 2007.

LEVINE, Rodney L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1994.

LEWINGTON S, CLARKE R, QIZILBASH N, PETO R, Collins R. Age.pdf. *Lancet*, v. 360, p. 1903–13, 2002.

LOEWY, A. D.; WALLACH, J. H.; MCKELLAR, S. Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Research Reviews*, 1981.

LUCCA, I. L. *Relação entre a atividade física voluntária na roda e a capacidade intrínseca para o exercício na esteira em animais não treinados*. 2013, 74f. Dissertação (Mestrado Ciência do Esporte). Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

MAIA, R. C.A. *et al.* Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 11, p. 1010–1022, 2015.

MAJZUNOVA, Miroslava *et al.* *Redox signaling in pathophysiology of hypertension. Journal of Biomedical Science*. [S.l: s.n.]. , 2013

MANCHESTER, Keith L. Exploring the gene with X-rays. *Trends in Genetics*, v. 12, n. 12, p. 515–518, 1996.

MANZANARES, G.; BRITO-DA-SILVA, G.; GANDRA, P. G. Voluntary wheel running: Patterns and physiological effects in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2019a.

MANZANARES, G.; BRITO-DA-SILVA, G.; GANDRA, P. G. Voluntary wheel running: Patterns and physiological effects in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 52, n. 1, p. 1–9, 2019b.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 1974.

MARTINEZ, Yolanda *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade restores nitric oxide-dependent renal vascular responses in renovascular hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2002.

MATSUKAWA, Toshiya *et al.* Upregulation of skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  through the elevation of cyclic AMP levels by Cyanidin-3-glucoside enhances exercise performance. *Scientific Reports*, v. 7, n. February, p. 1–12, 2017.

MCDERMOTT, J. C.; BONEN, A. Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 147, n. 3, p. 323–327, 1993.

MCKITRICK, D. J.; CALARESU, F. R. Reciprocal connection between nucleus ambiguus and caudal ventrolateral medulla. *Brain Research*, 1997.

MEDEIROS, A. *et al.* Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 12, p. 1909–1917, 2004.

MENZIES, Paul *et al.* Blood lactate clearance during active recovery after an intense running bout depends on the intensity of the active recovery. *Journal of Sports Sciences*, v. 28, n. 9, p. 975–982, 2010.

NAVAR, L. G. *et al.* Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension. 1995, [S.l: s.n.], 1995.

NEGRAO, C. E. *et al.* Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 1993.

NEGRÃO, C E; RONDON, M. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. *Rev Bras Hipertens*, 2001.

NISHI, Erika Emy *et al.* Vitamin C prevents DNA damage induced by renovascular hypertension in multiple organs of Wistar rats. *Human and Experimental Toxicology*, 2010.

OLIVEIRA, Djenane R. *et al.* Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. *Hypertension*, 1996.

OLIVEIRA, Nara R.C. *et al.* Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1  $\alpha$  protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an



- intensity-dependent manner. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, 2014.
- PADIA, Shetal H.; CAREY, Robert M. *AT2 receptors: Beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. [S.l: s.n.]. , 2013
- PANVELOSKI-COSTA, Ana Carolina *et al.* Blood lactate responses to high-intensity intermittent training in rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2012.
- PARKER, Lewan; MCGUCKIN, Teneale A.; LEICHT, Anthony S. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 2014.
- PATEL, Manisha. *Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. Trends in Pharmacological Sciences*. [S.l: s.n.]. , 2016
- PAUL, Martin; MEHR, Ali Poyan; KREUTZ, Reinhold. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.
- PERKINS, Jennifer M.; DAVIS, Stephen N. *The renin-angiotensin-aldosterone system: A pivotal role in insulin sensitivity and glycemic control. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. [S.l: s.n.]. , 2008
- PILEGAARD, Henriette; SALTIN, Bengt; NEUFER, Darrell P. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 546, n. 3, p. 851–858, 2003.
- PILIS, Wiesław *et al.* Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 1993.
- PINTO, Yigal M.; PAUL, Martin; GANTEN, Detlev. *Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering. Cardiovascular Research*. [S.l: s.n.]. , 1998
- RAMALINGAM, Latha *et al.* *The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. [S.l: s.n.]. , 2017
- REID, M. B. *et al.* Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *Journal of Applied Physiology*, 1992.
- RODRIGUEZ, Carlos J. *et al.* Systolic blood pressure levels among adults with hypertension and incident cardiovascular events: The atherosclerosis risk in communities study. *JAMA Internal Medicine*, 2014.
- RONDON, Maria Urbana P Brandão; BRUM, Patricia Chakur. Exercício físico

como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 2003.

ROSS, C. A. *et al.* Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effects of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *Journal of Neuroscience*, 1984.

ROSSI, Noreen F.; CHEN, Haiping; MALISZEWSKA-SCISLO, Maria. Paraventricular nucleus control of blood pressure in two-kidney, one-clip rats: Effects of exercise training and resting blood pressure. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 305, n. 11, p. 1390–1400, 2013.

SÁ, Renato Willian Martins *et al.* Changes in cardiovascular responses to chemoreflex activation of rats recovered from protein restriction are not related to AT1 receptors. *Experimental Physiology*, 2017.

SAFDAR, Adeel *et al.* Exercise Increases Mitochondrial PGC-1  $\alpha$  Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate. v. 286, n. 12, p. 10605–10617, 2011.

SALMINEN, Antero; KAARNIRANTA, Kai; KAUPPINEN, Anu. *Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: Impact on the aging process. International Journal of Molecular Sciences*. [S.l: s.n.], , 2013

SANTAJULIANA, Daniel; HORNFELDT, Barbara J.; OSBORN, John W. Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 35, n. 1, p. 45–54, 1996.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*. [S.l: s.n.], , 1994

SANTOS, Robson A.S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003.

SCHEUER, J. *et al.* Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *Journal of Clinical Investigation*, v. 70, n. 6, p. 1300–1305, 1982.

SCHNEIDER, Arved Winfried; KALK, Johann Friedrich; KLEIN, Christian Peter.

Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology*, 1999.

SCHRAUWEN, Patrick *et al.* Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 282, n. 1 45-1, p. 11–17, 2002.

SEIFI-SKISHAHR, F.; SIAHKOHIAN, M.; NAKHOSTIN-ROOHI, B. Influence of aerobic exercise at high and moderate intensities on lipid peroxidation in untrained men. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, v. 48, n. 4, p. 515–521, 2008.

SHARIFI, Ali M. *et al.* Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacological Research*, 2003.

SINGH, Chandra K. *et al.* The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 28, n. 8, p. 643–661, 2018.

SKELTON, M. S. *et al.* Lactate influx into red blood cells of athletic and nonathletic species. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 268, n. 5 37-5, 1995.

SOARES, E. R. *et al.* Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 6, p. 573–582, 2011.

SOUSA, L. E. *et al.* Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. *Free Radical Research*, v. 49, n. 11, p. 1335–1343, 2015.

SPINA, Robert J. *et al.* Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 80, n. 6, p. 2250–2254, 1996.

SPRIET, Lawrence L.; HOWLETT, Richard A.; HEIGENHAUSER, George J.F. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 32, n. 4, p. 756–763, 2000.

SUMMERMATTER, Serge *et al.* Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor  $\alpha$ - Dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 21, p. 8738–8743, 2013.

TANABE, K. *et al.* Effect of spontaneous exercise on antioxidant capacity in rat muscles determined by electron spin resonance. *Acta Physiologica*, v. 186, n. 2, p.

119–125, 2006.

TEGTBUR, U *et al.* Determining the extent of intensive physical performance in patients with coronary heart disease. *Zeitschrift fur Kardiologie*, 2001.

TEGTBUR, Uwe; BUSSE, Martin W.; BRAUMANN, Klaus M. *Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise*. [S.l: s.n.], 1993

THOMAS, Walter G.; MENDELSON, Frederick A.O. *Angiotensin receptors: Form and function and distribution. International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003

TIPNIS, Sarah R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2000.

TOMLIN, Dona L; WENGER, Howard A. Fitness and Recovery from High Intensity Intermittent Exercise. *Sports Med*, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2001.

URBANA, Maria; RONDON, P Brandão; BRUM, Patricia Chakur. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. v. 10, n. 11, p. 134–139, 2003.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002a.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 11, p. 1389–1394, 2002b.

VOLTARELLI, F. A; MELLO, M. A. R.; GOBATTO., C. A. TRANSIÇÃO METABÓLICA E TESTE DO LACTATO MÍNIMO EM RATOS: NOVA PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO DO ESFORÇO. *Journal of Physical Education*, 2005.

WALDMAN, Brian M. *et al.* Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Integrated Blood Pressure Control*, v. 10, p. 41–51, 2017.

WASSERMAN, K. The anaerobic threshold measurement to evaluate exercise performance. *American Review of Respiratory Disease*, v. 129, n. 2 SUPPL., p. 35–40, 1984.

XUE, Fen *et al.* Nrf2/antioxidant defense pathway is involved in the neuroprotective

- effects of Sirt1 against focal cerebral ischemia in rats after hyperbaric oxygen preconditioning. *Behavioural Brain Research*, v. 309, p. 1–8, 2016.
- YAN, Zhen. Exercise, PGC-1 $\alpha$ , and metabolic adaptation in skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v. 34, n. 3, p. 424–427, 2009.
- YFANTI, Christina *et al.* Role of vitamin C and E supplementation on IL-6 in response to training. *Journal of Applied Physiology*, 2012.
- YIM, Hyung Eun; YOO, Kee Hwan. *Renin-angiotensin system - Considerations for hypertension and kidney. Electrolyte and Blood Pressure*. [S.l: s.n.]. , 2008
- YOSHIDA, Yuko *et al.* Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. *Journal of Applied Physiology*, v. 97, n. 2, p. 527–534, 2004.
- ZACARIAS, Aline Cruz *et al.* Swimming training induces liver adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. *Redox Report*, v. 22, n. 6, p. 515–523, 2017.
- ZUO, L. *et al.* *Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. Acta Physiologica*. [S.l: s.n.]. , 2015
- ZURLO, Francesco *et al.* Skeletal Muscle Metabolism Is a Major Determinant of Resting Energy Expenditure. v. 86, n. November, p. 1423–1427, 1990.



## Fitness is improved by adjustments in muscle intracellular signaling in rats with renovascular hypertension 2K1C undergoing voluntary physical exercise



Taynara Carolina Lima<sup>b</sup>, Maria Andrea Barbosa<sup>b</sup>, Daniela Caldeira Costa<sup>a,b</sup>, Lenice Kappes Becker<sup>b</sup>, Leonardo Máximo Cardoso<sup>a,b,c</sup>, Andréia Carvalho Alzamora<sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas-Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Exercise voluntary running  
Fitness  
Lactate  
PGC1 $\alpha$   
Renovascular hypertension

### ABSTRACT

**Aim:** To evaluate physical fitness and cardiovascular effects in rats with renovascular hypertension, two kidneys, one clip (2K1C) submitted to voluntary exercise (ExV).

**Main methods:** 24 h after surgery (SHAM and 2K1C) rats were submitted to ExV for one week (adaptation). ExV adherent rats were separated into exercise (2K1C-EX and SHAM-EX) or sedentary (2K1C-SED and SHAM-SED) groups. After 4 weeks, exhaustion test, plasma lactate, cardiovascular parameters were evaluated and gastrocnemius muscle was removed for evaluation of gene expression of muscle metabolism markers (PGC1 $\alpha$ , AMPK, SIRT-1, UCP-3, MCP-1; LDH) and of the redox process.

**Key findings:** ExV decreased blood lactate concentration and increased SOD and CAT activity and a SIRT-1 and UCP-3 gene expression in the gastrocnemius muscle of 2K1C-ExV rats compared to 2K1C-SED rats. Gene expressions of PGC1 $\alpha$ , UCP-3, MCT-1, AMPK were higher in 2K1C-ExV rats compared to SHAM-SED rats. Blood pressure in 2K1C-ExV was lower compared to 2K1C-SED and higher in SHAM-SED rats. Reflex bradycardia in 2K1C-EX rats increased compared to 2K1C-SED and was similar to SHAM-SED. The variation in mean blood pressure induced by ganglion blocker hexamethonium and AngII AT1 receptor antagonist, losartan in the 2K1C-ExV rats was smaller compared to the 2K1C-SED rats and it was similar to the SHAM-SED rats.

**Significance:** O ExV induced adaptive responses in 2K1C-ExV rats by decreasing sympathetic and Ang II activities and stimulating intracellular signaling that favors redox balance and reduced blood lactate concentration. These adaptive responses, then, contribute to reduced arterial pressure, improved baroreflex sensitivity and physical fitness of 2K1C rats.

### 1. Introduction

Genetic predisposition, physical inactivity and poor diet contribute to hyperactivity of the Ang-converting enzyme (ACE)/Angiotensin (Ang) II/Ang type 1 receptor (AT1R) axis of the renin angiotensin (RAS) system. This axis is associated with increased oxidative stress, sympathetic activity, metabolic disorders, among others, leading to chronic

nucleus favoring the transcription of genes such as lactate monocarboxylate transporter 1 (MCT-1) and enzyme complex lactate dehydrogenase (LDH), with consequent increase in thermogenesis by uncoupled protein 3 (UCP-3) and lactate metabolism as an energy source for muscle contraction [6–9]. Concomitantly, high metabolism leads to increased levels of Ang II levels, sympathetic activity with generation of reactive oxygen species (ROS), among others [1,4,10]. However, reg-

