

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA  
MESTRADO ACADÊMICO “SAÚDE E ENVELHECIMENTO”

PRISCILLA BIANCA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS RESPOSTAS  
DE VEIAS MESENTÉRICAS À ANGIOTENSINA II EM RATOS  
HIPERTENSOS 2R1C**

MARÍLIA  
2018

Priscilla Bianca de Oliveira

Influência do exercício físico sobre as respostas de veias mesentéricas à  
Angiotensina II em ratos hipertensos 2R1C

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em "Saúde e Envelhecimento" da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies.

Marília

2018

Priscilla Bianca de Oliveira

Influência do exercício físico sobre as respostas de veias mesentéricas à Angiotensina II em ratos hipertensos 2R1C

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em "Saúde e Envelhecimento" da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Banca examinadora:



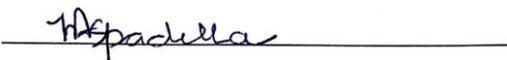
Prof. Dr. Aghaldo Bruno Chies

Faculdade de Medicina de Marília



Profa. Dra. Maricelma da Silva Soares de Souza

Universidade de Marília



Profa. Dra. Maria Angélica Spadella Santos

Faculdade de Medicina de Marília

Data da aprovação: 15/03/2018

Ao meu irmão Yan Kauê Santos Ferreira

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela possibilidade de chegar até aqui.

À minha mãe Cristina por me apoiar em todos os momentos, inclusive suprindo a carência dos meus filhos durante minha ausência. Sem você mãezinha linda nada disso seria possível.

Aos meus filhos Alexandre e Sophia que são fonte de felicidade e energia. Um dia, espero que entendam quando não pude estar presente devido ao trabalho e estudo. Tudo que faço é por vocês.

Ao meu pai Milton por ser minha inspiração e meu exemplo de inteligência. Sei que está feliz e orgulhoso de mim.

Ao meu irmão Yan por me ensinar responsabilidade, humildade, honestidade e amor ao próximo e à vida. Por me mostrar que sempre vale a pena lutar pelos nossos ideais, por ter sido meu ombro amigo e amado tanto a mim e aos meus filhos. Eu nunca vou te esquecer!

À toda minha família, em especial meus tios e primos, obrigada por vibrarem a cada pequena conquista ao longo da minha trajetória.

Ao meu amor Paulo Fernandes do Nascimento, pois quando eu não tinha mais forças para continuar, você chegou na minha vida me impulsionando, motivando e apoiando. O seu amor me acalenta em todos os momentos de dificuldade.

Aos amigos queridos que sempre me apoiaram e ajudaram efetivamente. Alisson, Gabriela, Letícia, Michelly, Célia. Vocês são muito especiais, obrigada por tudo.

À minha amiga Priscila Ramos de Oliveira por praticamente me carregar no colo no momento mais difícil da minha vida. Obrigada, você é a irmã que eu não tive.

Ao meu orientador Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies, por me inspirar e por acreditar e depositar sua confiança em meu trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

## RESUMO

Exercício promove redistribuição circulatória, um mecanismo que envolve controle preciso das respostas de angiotensina II (Ang II) no leito venoso. Sabe-se que o exercício mobiliza mecanismos relacionados ao óxido nítrico (NO), prostanoídes e endotelina-1 (ET-1) para modular efeitos vasomotores de Ang II em leitos vasculares do animal em movimento. Buscamos conhecer os mecanismos que modulam as respostas de veias mesentéricas à Ang II em ratos 2R1C mantidos no repouso ou submetidos a exercício, também avaliar o estresse oxidativo no plasma desses animais submetidos aos diferentes protocolos de exercício. Utilizamos ratos Wistar machos que tornaram-se hipertensos após receberem implantação de grampo na artéria renal esquerda. Em seguida, foram distribuídos nos grupos: sedentário estudados no repouso (SR), sedentário estudados após sessão de exercício (SE), treinado estudados no repouso (TR), treinados estudados após sessão de exercício (TE). O treinamento deu-se em esteira, 1 hora por dia, 5 dias / semana durante, 10 semanas. No final deste protocolo, animais foram mortos para a retirada de anéis da veia mesentérica, órgãos e coleta de sangue para obtenção do plasma. Os anéis foram desafiados por Ang II em banho de órgãos na ausência ou presença de indometacina, L-NAME e BQ123, inibidores de ciclooxigenase (COX), óxido nítrico sintase (NOS) e receptor A de endotelina (ETA) respectivamente, isoladamente ou em associação. Contrações foram registradas e expressas como curvas concentração-resposta. Preparações não tratadas ou na presença de L-NAME ou L-NAME+indometacina não mostraram diferença de resposta à Ang II entre grupos. Na presença de indometacina, houve um aumento significativo de resposta máxima (Emáx) bem como pD<sub>2</sub> à Ang II apenas em preparações de animais SE comparado aos demais grupos. Dados obtidos não mostraram diferenças significativas entre os grupos nas análises de estresse oxidativo. Prostanóides parecem modular respostas Ang II nas veias mesentéricas de animais sedentários durante uma única sessão de exercício.

Palavras-chave: Angiotensina II. Exercício. Estresse oxidativo. Hipertensão.

## ABSTRACT

Exercise promotes circulatory redistribution, a mechanism that involves precise control of Ang II responses in the venous bed. It is known that exercise mobilizes mechanisms related to NO, prostanoids and ET-1 to modulate vasomotor effects of Ang II in vascular beds of the moving animal. Objectives: To know the mechanisms that modulate the responses of mesenteric veins to Ang II in 2R1C rats kept at rest or submitted to exercise, also to evaluate the oxidative stress in the plasma of these animals submitted to different exercise protocols. Methods: Male Wistar rats became hypertensive after receiving staple implantation in the left renal artery. They were then divided into the following groups: sedentary studied at rest (SR), sedentary studied after exercise (SE), trained at rest (TR), trained after exercise session (ET). Training was given on a treadmill, 1 hour per day, 5 days / week for, 10 weeks. At the end of this protocol, animals were killed for the removal of rings from the mesenteric vein, organs and blood collection to obtain plasma. The rings were challenged by Ang II in organ baths in the absence or presence of indomethacin, L-NAME and BQ123, cyclooxygenase (COX) inhibitors, nitric oxide synthase (NOS) and endothelin receptor A (ETA) respectively, alone or in association. Contractions were recorded and expressed as concentration-response curves. Results: Untreated preparations or in the presence of L-NAME or L-NAME + indomethacin showed no difference in response to Ang II between groups. In the presence of indomethacin, there was a significant increase in maximum response ( $E_{max}$ ) ( $p < 0,02$ ) as well as  $pD_2$  ( $p < 0,04$ ) to Ang II only in preparations of SE animals compared to the other groups. Data obtained did not show significant differences between the groups in the FRAP and FOX analyzes. Conclusion: Prostanoids seem to modulate Ang II responses in the mesenteric veins of sedentary animals during a single exercise session.

Key-words: Angiotensin II. Exercise. Oxidative stress. Hypertension.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Massa úmida do coração (g)/ massa corporal (Kg).....	26
Figura 2-	Massa úmida adrenais (g)/ massas corporal (Kg).....	27
Figura 3-	Massas úmida rins(g)/ massas corporal (Kg).....	27
Figura 4-	Pressões arteriais sistólicas basal (anterior à cirurgia) e aferidas semanalmente durante 12 semanas consecutivas (pós-cirurgia) nos grupos sedentário e treinado.....	28
Figura 5-	Curvas de angiotensina II em preparações de veias mesentéricas, não tratadas (A) ou tratadas com Indometacina (B; INDO $10^{-5}$ M) ou L- NAME (C; L-NAME; $10^{-4}$ M), bem como L-N/ Indometacina (D; L-NAME/ Indometacina), em animais 2R1C sedentários e treinados estudados no repouso (SR e TR respectivamente) ou após uma sessão de exercício (SE e TE, respectivamente)...	30
Figura 6-	Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações de veias mesentéricas em animais 2R1C sedentários e treinados estudados no repouso (SR e TR, respectivamente) ou após uma sessão de exercício (SE e TE, respectivamente), tratadas com BQ 123/ Indometacina (BQ $10^{-6}$ M + INDO $10^{-5}$ M).....	31

## LISTA DE TABELA

Tabela 1- Valores de pD <sub>2</sub> para Ang II, determinados em veias mesentéricas de animais 2R1C.....	32
Tabela 2- Valores plasmáticos (μM/L) de FOX e FRAP, em animais 2R1C sedentários e treinados estudados no repouso ou após uma sessão de exercício.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	dois rins um clip
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
AT <sub>1</sub>	receptor 1 de angiotensina
AT <sub>2</sub>	receptor 2 de angiotensina
BHT	hidroxitolueno butilado
BQ 123	antagonista do receptor A de endotelina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX	Cicloxigenase
COX <sub>1</sub>	isoforma 1 da cicloxigenase
COX <sub>2</sub>	isoforma 2 da cicloxigenase
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
EC <sub>50</sub>	A concentração do composto para qual 50% do efeito é observado
E <sub>máx</sub>	resposta máxima
E.P.M	erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	endotelina-1
ET <sub>A</sub>	receptor A de endotelina
ET <sub>B</sub>	receptor B de endotelina
Famema	Faculdade de Medicina de Marília
Fe <sup>2+</sup>	íon ferroso ou ferro II
Fe <sup>3+</sup>	íon férrico ou ferro III
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	cloreto férrico hexahidratado
FOX	ferrous oxidation in xylenol orange
FRAP	ferric reducing antioxidant power
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
INDO	indometacina
L-NAME	nitro-L-arginine methyl ester
NADPH	nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub>	oxigênio
pD <sub>2</sub>	logaritmo negativo da EC <sub>50</sub>
PKC	proteína quinase C

SE	animais do grupo sedentário exercício
SR	animais do grupo sedentário repouso
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TE	animais do grupo treinado exercício
TPTZ	2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine
TR	animais do grupo treinado repouso

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	Redistribuição circulatória induzida pelo exercício físico e seus mecanismos.....	14
1.2	As veias e a redistribuição circulatória.....	15
13.	Modulação das respostas de veias à Ang II em animais hipertensos.....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	Geral.....	19
2.2	Específicos.....	19
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1	Animais.....	20
3.2	Modelo de hipertensão 2R1C.....	20
3.3	Protocolo de distribuição dos animais nos grupos experimentais.....	21
3.4	Protocolo de Treinamento.....	22
3.5	Estudo funcional de reatividade vascular.....	22
3.6	Quantificação da peroxidação lipídica.....	23
3.7	Avaliação da capacidade antioxidante do plasma.....	24
3.8	Delineamento Experimental.....	24
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	Massas úmidas corporais.....	26
4.2	Pressões Arteriais Sistólicas.....	28
4.3	Reatividade Vascular à Angiotensina II.....	29
4.4	Análise da peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes não enzimáticas.....	32
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Redistribuição circulatória induzida pelo exercício físico e seus mecanismos

A prática regular de exercício físico promove efeitos benéficos ao organismo e previne doenças que acometem o sistema cardiovascular. Durante o exercício há aumento da exigência metabólica, principalmente na musculatura cardíaca e esquelética envolvida no movimento.<sup>1</sup> Para atender a esta exigência metabólica aumentada, ocorre um fenômeno conhecido como redistribuição circulatória, ou seja, o fluxo sanguíneo é distribuído de forma desigual. Assim, durante o exercício, ocorre um aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética em movimento, bem como para diafragma e coração, em paralelo há diminuição do aporte sanguíneo em órgãos e tecidos não ativos nestas condições.<sup>2-4</sup> A magnitude da redistribuição circulatória varia de acordo com a intensidade do exercício praticado e da fibra muscular envolvida.<sup>2</sup>

A redistribuição circulatória induzida pelo exercício é um fenômeno complexo, que envolve diversos mecanismos e muitos mediadores, tanto sistêmicos quanto produzidos localmente. Com efeito, neste fenômeno, além do sistema nervoso autônomo simpático, há o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). De fato, foi observado que nos animais submetidos à exercício ocorre aumento na expressão de angiotensinogênio, bem como da angiotensina II (Ang II) no tecido renal, levando à vasoconstrição e à consequente diminuição do fluxo sanguíneo renal, contribuindo para que esse sangue seja redistribuído para músculos envolvidos no movimento.<sup>5</sup> Cabe ressaltar que a Ang II pode atuar independentemente ou em associação com o sistema nervoso autônomo simpático na promoção da redistribuição circulatória induzida pelo exercício.<sup>6</sup> É interessante considerar também, que dependendo do leito vascular, a Ang II também pode ter suas ações vasomotoras moduladas por mecanismos endoteliais relacionados ao óxido nítrico (NO), prostanóides, endotelina-1 (ET-1), dentre outros.<sup>7,8</sup>

Durante o exercício, as modificações circulatórias que ocorrem levam ao aumento do cisalhamento exercido pelo fluxo sanguíneo sobre a camada endotelial tanto de artérias quanto de veias.<sup>9,10</sup> Isto leva a uma maior produção endotelial de NO<sup>11-13</sup> e/ou prostanóides.<sup>14,15</sup> Neste sentido, tanto o exercício agudo quanto o treinamento, podem aumentar a liberação endotelial de NO e/ou prostanóides que, por sua vez, antagonizam as ações vasoconstritoras da Ang II.<sup>16,17</sup> Foi observado também, que as adaptações endoteliais

decorrentes de exposições repetidas ao exercício aeróbico são predominantemente observadas em territórios vasculares presentes em musculaturas recrutadas para a realização do mesmo, como os leitos que nutrem músculos ricos em fibras glicolítico-oxidativas de contração rápida.<sup>18</sup> Assim, a liberação destas substâncias vasodilatadoras a partir do endotélio parece ser parte de um importante mecanismo de atenuação do tônus vascular em leitos onde a vasodilatação promove benefício ao organismo durante o exercício.

A redistribuição circulatória induzida pelo exercício não envolve apenas os mecanismos locais promotores de vasodilatação. A produção local de ET-1 também parece ser importante na redistribuição sanguínea induzida pelo exercício.<sup>19,20</sup> O exercício parece induzir aumento da expressão gênica de prepro ET em rins, mas não em pulmões de ratos.<sup>21</sup> Com efeito, é possível inferir que o papel da ET-1 seja o de promover vasoconstrição em territórios vasculares a partir dos quais o sangue é mobilizado durante o exercício para nutrir os músculos envolvidos no movimento. Corroboram esta hipótese, alguns estudos que demonstram uma elevada produção de ET-1 em leitos vasculares onde o fluxo sanguíneo é reduzido durante o exercício físico.<sup>19-23</sup> Para que isso ocorra, a intensidade do cisalhamento produzido durante o exercício, bem como a sua duração, resulta em diferentes graus de produção local de ET-1.

Nesse sentido, foi demonstrado que o cisalhamento leve aumenta enquanto o cisalhamento intenso suprime a secreção de ET-1 em cultura de células endoteliais obtidas de glomérulos e de veias umbilicais de seres humanos.<sup>24,25</sup> Cabe ressaltar, por fim, que a ET-1 produzida localmente também modula ações vasculares da Ang II. Isto porque já foi descrito que a Ang II pode liberar ET-1 de células endoteliais de aorta de rato e de carótida bovina por meio de um mecanismo que envolve proteína quinase C (PKC).<sup>26,27</sup>

Assim, com base nas informações apresentadas, é possível inferir que as ações do SRRA podem influenciar e, ao mesmo tempo, ser influenciadas por mecanismos endoteliais e/ou subendoteliais que regulam o tônus vascular durante o exercício. Com isso, a ação coordenada entre esses diversos mecanismos vasomotores pode dirigir o fluxo sanguíneo para os leitos vasculares diretamente envolvidos no exercício.

## **1.2 As veias e a redistribuição circulatória**

Aproximadamente 70% do volume de sangue total dos mamíferos é armazenado

no leito venoso durante o repouso.<sup>28</sup> Contudo, na redistribuição circulatória induzida pelo exercício, grande parte deste volume sanguíneo que está presente nos leitos venosos dos membros inferiores e da região abdominal precisa ser deslocado para o coração.<sup>29</sup> Há no entanto, um conflito de opiniões acerca do papel da venoconstrição ativa neste deslocamento de sangue a partir do território venoso. Alguns autores defendem que a venoconstrição ativa é necessária à manutenção/aumento do volume diastólico final durante exercício físico.<sup>30</sup> Hainsworth e Drinkhill<sup>31</sup>, por outro lado, afirmam que as evidências do envolvimento da venoconstrição ativa no retorno venoso são frágeis, pois durante o exercício ocorre um aumento na atividade simpática que não contrai apenas veias, mas também arteríolas. Com efeito, isso pode reduzir o fluxo de sangue para as veias, resultando em uma menor distensão venosa e, conseqüentemente, uma diminuição passiva do volume venoso. Ainda de acordo com estes autores, é muito difícil distinguir reduções ativas e passivas do volume sanguíneo no leito venoso. Esta discordância acirra-se, sobretudo quando a discussão foca leitos venosos presentes em territórios musculocutâneos, pois tem sido proposto que uma venoconstrição neste território poderia levar a um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e assim prejudicar, ao invés de facilitar, o retorno venoso durante o exercício.<sup>32</sup> Todavia, estes autores concordam em um ponto: a venoconstrição ativa pode exercer algum papel na mobilização de sangue a partir da região esplâncnica durante o exercício.

Por conta deste conflito existente na literatura, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido nos últimos anos estudos que focam as adaptações que o exercício agudo e/ou repetido promove nos mecanismos locais que modulam os efeitos das catecolaminas e da AngII. Estas adaptações são bastante conhecidas no leito arterial, mas precariamente descritas no leito venoso. Em um dos nossos primeiros estudos que enfocou esta temática, foi observado que o treinamento físico promove adaptações na veia porta que permitem respostas à Ang II mais intensas sempre que os animais são ressubmetidos a uma condição de exercício. Neste estudo foi proposto também que, nos animais treinados, mediadores vasodilatadores (NO e prostanóides vasodilatadores) exercem maior influência sobre as respostas da veia porta à Ang II durante o repouso, enquanto que mediadores vasoconstritores (prostanóides vasoconstritores e ET-1) passam a exercer mais influência durante/logo após o exercício. Por fim, uma interessante observação foi feita neste estudo: a reatividade da veia cava a Ang II não é modificada pelo exercício físico, o que sugere um fenômeno território específico.<sup>16</sup> Assumindo que as adaptações induzidas pelo exercício sobre os mecanismos locais que modulam as respostas das veias à Ang II ocorrem de forma leito-

específicas, decidimos explorar outros leitos venosos, com papéis distintos na redistribuição circulatória. Detivemo-nos primeiramente a estudar a influência do exercício físico agudo e repetido sobre os mecanismos que regulam as respostas à Ang II em veias femorais, uma vez que estas drenam a maior parte do volume sanguíneo proveniente do território sanguíneo do trem posterior (musculocutâneo). Neste estudo, observamos que a Ang II promove uma ação contrátil bastante discreta em veias femorais, resultado de uma ação moduladora exercida pelo NO. Contudo, após o bloqueio da síntese de NO, estas respostas à Ang II elevam-se nos animais sedentários mantidos em repouso, mas permanecem atenuadas nos animais submetidos ao exercício agudo ou ao treinamento por 10 semanas. Concluiu-se que prostanóides vasodilatadores, bem como outros mecanismos vasodilatadores acionados pela ativação de receptores B de endotelina (ET<sub>B</sub>), passam a atuar em paralelo ao NO visando garantir a modulação do tônus deste leito venoso durante e logo após o exercício.<sup>17</sup> Possivelmente, esta modulação exercida por mecanismos locais sobre as respostas da veia femoral à Ang II tem a finalidade de evitar o aumento descontrolado da resistência ao fluxo sanguíneo centrípeto.

Na busca por aprofundar esta investigação, nosso grupo de pesquisa desenvolveu recentemente um projeto cujo objetivo foi "descrever as alterações de resposta da veia mesentérica à Ang II induzidas tanto pelo exercício agudo quanto pelo treinamento". Vale recordar que, como mencionado anteriormente, apenas na região esplâncnica existe consenso de que a venoconstrição ativa pode participar da mobilização de sangue durante o exercício físico, contribuindo assim para retorno venoso. Neste estudo observou-se que NO e prostanóides atuam sinergicamente na modulação das respostas de veias mesentéricas à Ang II. O NO parece exercer papel preponderante na modulação das respostas da veia mesentérica à Ang II em animais sedentários. Todavia, os prostanóides passam a assumir um papel mais destacado na modulação destas respostas após o treinamento dos animais.<sup>33</sup>

### **1.3 Modulação das respostas de veias à Ang II em animais hipertensos**

Uma vez estabelecido que tanto a exposição aguda quanto repetida ao exercício promove modificações nos mecanismos locais que modulam as respostas das veias à Ang II, interessou-nos investigar estas adaptações em animais hipertensos 2R1C. A opção por este modelo de hipertensão deu-se, sobretudo pelo fato deste modelo envolver uma ativação do SRAA.<sup>34</sup> Neste sentido, tem sido sugerido que os níveis circulantes de Ang II permanecem

elevados até quatro semanas após a implantação do clip (fase aguda) e, a partir deste período, começa a retornar aos níveis normais.<sup>35,36</sup> Outros estudos, contudo, sugerem que os níveis circulantes de Ang II voltam ao normal antes da quarta semana e que a Ang II tecidual passa a assumir papel central na manutenção da pressão arterial elevada quando os níveis circulantes da Ang II retornam ao normal.<sup>37</sup> Além disso, provavelmente pela ação da Ang II sobre o complexo enzimático NADPH oxidase, ocorre intensa formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais 2R1C, culminando em um alto nível de estresse oxidativo.<sup>38,34</sup> O aumento das EROs no endotélio vascular acaba por diminuir a biodisponibilidade de NO, o que pode prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio.<sup>39,40</sup> As EROS podem ainda regular a expressão/atividade das fosfolipases A2 com resultante produção de prostanóides.<sup>41</sup>

O primeiro destes estudos, que objetivou compreender as modificações induzidas pelo exercício sobre os mecanismos que regulam as respostas à Ang II no leito venoso de animais 2R1C, foi realizado em veia femoral (dados obtidos estão em fase de envio à publicação). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que, assim como ocorre nos animais normotensos, o NO ainda mantém reduzidas as respostas de veia femoral à Ang II nos ratos 2R1C. Além disso, também nos animais 2R1C, tanto exercício agudo quanto o treinamento mobiliza mecanismos relacionados com prostanóides a cooperar com o NO na tarefa de modular as respostas à Ang II. Algumas particularidades desta modulação foram melhor descritas nos animais 2R1C. Foi verificado que o exercício agudo faz isto provavelmente através de uma modificação funcional, caracterizada por um aumento da eficácia na via de sinalização  $\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_2 \rightarrow \text{COX} \rightarrow \text{prostanóides vasodilatadores}$ . Por outro lado, nos animais treinados, esta mobilização de prostanóides parece envolver aumento na presença local da COX-1 e COX-2. Além disso, observou-se que a cooperação entre NO e prostanóides vasodilatadores "oculta" as ações de mecanismos moduladores locais relacionados à ET-1 sobre as respostas das veias femorais à Ang II. De fato, somente na ausência de NO e prostanóides é possível observar que a ET-1 liberada localmente pela ação da Ang II em veias femorais de animais 2R1C potencializa (agindo em receptores  $\text{ET}_A$ ) as respostas contráteis induzidas pela Ang II nos animais sedentários expostos pela primeira vez ao exercício. Por outro lado, nos animais treinados, esta ET-1 liberada parece ativar mecanismos locais não relacionados com o NO ou prostanóides (através dos receptores  $\text{ET}_B$ ) para modular as respostas de Ang II em veia femoral quando estes animais são reexpostos ao exercício.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estudar as respostas das veias mesentéricas de ratos hipertensos 2R1C à Ang II, bem como as possíveis respostas sobre as mesmas.

### 2.2 Específicos

- Conhecer o padrão das respostas à Ang II em veias mesentéricas de ratos 2R1C sedentários e treinados, tanto no repouso quanto imediatamente após uma sessão de exercício;
- Investigar os mecanismos locais (relacionados ao NO, prostanóides e ET-1) envolvidos na modulação destas respostas à Ang II, bem como a influência do exercício agudo e/ou treinamento físico sobre os mesmos;
- Avaliar o grau de estresse oxidativo no plasma destes animais, sedentários e treinados, tanto no repouso quanto imediatamente após uma sessão de exercício;
- Estabelecer relações entre eventuais modificações neste grau de estresse oxidativo e modificações de resposta da veia mesentérica à Ang II.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 120 ratos machos *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília (Famema). Durante todo o período de experimento, os animais permaneceram no biotério de apoio, ligado ao laboratório de farmacologia. Esses animais foram mantidos em gaiolas coletivas com capacidade para 5 animais, em ambiente com temperatura controlada (23-25°C) e ciclo claro-escuro de 12h. No início do protocolo experimental, ocasião em que estes animais foram submetidos à cirurgia para a implantação do *clip* na artéria renal, eles pesavam entre 180 e 200g. Projeto aprovado pelo CEUA-Famema- Protocolo 530/16.

#### 3.2 Modelo de hipertensão 2R1C

A hipertensão renovascular 2R1C foi induzida em ratos por meio do modelo descrito por Goldblatt et al.<sup>42</sup>, com algumas adaptações. Resumidamente, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, por via intraperitoneal) e depois foram submetidos a uma laparotomia na linha média. Em seguida, a artéria renal esquerda foi isolada e, nesta, foi instalado um *clip* de prata em formato de U com fenda de 0,25 mm de diâmetro. A pressão arterial sistólica foi medida antes da implantação do *clip* e semanalmente na cauda destes animais por método não invasivo (“tailcuff”). Os ratos foram considerados hipertensos quando a pressão sistólica foi maior que 160 mmHg ou houve um aumento igual ou superior à 20 mmHg em relação a pressão basal.

A cirurgia para a colocação do *clip* foi realizada na 7<sup>a</sup> semana de vida dos animais, que coincide com a fase em que o peso dos mesmos atingiu de 180 a 200g. Cabe ressaltar que o treinamento dos animais teve início 1 semana após a colocação do *clip*, com a fase de adaptação dos animais na esteira (vide adiante). Com isso, os animais puderam se recuperar do procedimento cirúrgico.

### 3.3 Protocolo de distribuição dos animais nos grupos experimentais

Para distribuir os animais nos grupos experimentais de forma aleatória, levando em consideração a capacidade de exercício inata de cada animal, foi utilizada a estratégia proposta por Melo et al.<sup>43</sup> Assim, ratos de 8 semanas de idade foram treinados diariamente por duas semanas (sessões de 10 minutos) para andar na esteira (Movement Technology LX 170) com velocidade de 0,3 a 0,5 Km/h, sem inclinação. Ao final deste período, estes animais foram submetidos a um teste de esforço para a capacidade individual de corrida na esteira. Neste teste os animais foram colocados em esteira com velocidade de 0,3 Km/h. Em seguida, a cada 3 minutos, a velocidade da esteira foi aumentada em 0,3 Km/h até que o animal apresentasse sinais de exaustão (parar de correr mesmo quando estimulados por leve pressão na cauda). Para cada animal, foi registrado o tempo que conseguiu correr até a exaustão na escala de acréscimo de velocidade acima mencionada (capacidade máxima de exercício). Ao final deste teste de esforço, os animais foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais propostos (vide a seguir), de acordo com a capacidade máxima de exercício de cada um. Assim, os quatro animais mais capazes foram distribuídos nos quatro grupos experimentais (SR, SE, TR e TE), seguindo o mesmo esquema até os menos capazes. Em seguida, também com base nos resultados determinados no teste de esforço, foi calculada a velocidade média de cada grupo.

Grupos experimentais:

1. **Sedentário repouso (SR)** - animais sedentários e mortos no repouso para a coleta de material destinado às análises
2. **Sedentário exercício (SE)** - animais sedentários e mortos (para a coleta de material destinado às análises) após uma sessão de 15 minutos de exercício (tempo de exercício previsto para o primeiro dia de treinamento, com velocidade de 60% da capacidade máxima de exercício média do grupo)
3. **Treinado repouso (TR)** - animais treinados e mortos no repouso para a coleta de material destinado às análises
4. **Treinado exercício (TE)** - animais treinados e mortos (para a coleta de material destinado às análises) imediatamente após uma sessão de 60 minutos de exercício.

### **3.4 Protocolo de Treinamento**

Foi utilizada a metodologia de treinamento descrita em Melo et al.<sup>43</sup>, segundo a qual os grupos treinados iniciaram o programa de treinamento físico a uma velocidade da esteira correspondente a 60% da média das velocidades máximas obtida pelos animais pertencentes a este grupo no teste de esforço. Este programa de treinamento consistiu em sessões diárias de exercício de 1 hora, 5 dias/semana durante 10 semanas. Nas 3 primeiras semanas, o tempo de exercício foi progressivamente aumentado de 20 minutos a 1 hora/dia. Na sexta semana, o teste de esforço foi repetido e a velocidade da esteira foi ajustada de acordo com o ganho do grupo em termos de desempenho. Cabe ressaltar que tanto o teste de esforço quanto o treinamento físico foram realizados na ausência de inclinação da esteira.

O ganho de peso dos animais no decorrer do treinamento também foi mensurado. Além disso, no dia do experimento de reatividade vascular (ao final das 10 semanas de treinamento) foram verificadas a relação peso do coração/peso corporal total e peso das adrenais/massa corporal total. Todos esses parâmetros foram indicativos das repercussões morfológicas do treinamento nos animais estudados. Paralelamente, foi analisada também a capacidade máxima de exercício observada no teste de esforço realizado na sexta semana de treinamento. Este parâmetro poderá indicar indiretamente a efetividade do treinamento neste período de 6 semanas.

### **3.5 Estudo funcional de reatividade vascular**

Ao final do período de treinamento, os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub> e exsanguinados para obtenção de plasma, além da remoção de rins, adrenais e coração para pesagem. Em seguida, sob lupa, segmentos da veia mesentérica foram dissecados dos tecidos adjacentes e removidos para uma placa de Petri recoberta com parafina. Depois, estes segmentos foram seccionados em anéis de 2-3mm e dispostos entre 2 ganchos metal (inseridos no lúmen). Essas preparações foram levadas a seguir para uma cuba de órgão isolado com capacidade para 2 mL, onde foram mantidas imersas em solução de Krebs-Henseleit, pH 7,4, gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e aquecida a 37°C. Nesta cuba, um dos ganchos foi fixado no fundo da cuba e o outro, no transdutor isométrico de força para a detecção de modificações do tônus vascular. Tais modificações de tônus vascular, sob 0,5 g de tensão basal, foram registradas em Powerlab 8/30 data

acquisition system (Australia AD Instruments). Nestas cubas as preparações permaneceram em repouso durante 60 minutos para estabilização. Neste período, bem como, durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 20 minutos.

As preparações foram desafiadas com concentrações cumulativas de Ang II ( $10^{-11}$  -  $10^{-6}$  M - administrada diretamente na cuba), na presença de L-NAME  $10^{-4}$ M e/ou indometacina  $10^{-5}$ M (INDO); respectivos inibidores não seletivos de NOS e COX. Em uma etapa posterior do estudo, estas preparações também foram desafiadas na presença de BQ-123  $10^{-6}$ M (inibidor seletivo de receptor  $ET_A$ ) associado à indometacina. Todos os inibidores foram administrados diretamente ao banho 20 minutos antes do início das curvas concentração-resposta. As respostas vasomotoras obtidas nestas preparações foram expressas graficamente como curvas concentração-resposta. A partir das curvas concentração-resposta, foi obtido o  $E_{máx}$  (efeito desencadeado pela concentração supra máxima do agonista) e do  $pD_2$  (logaritmo negativo da  $EC_{50}$ ). Os valores de  $E_{máx}$  foram calculados através do programa Prisma (GraphPad Software Corporation).

### 3.6 Quantificação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, que indica o grau de estresse oxidativo do meio biológico, foi estimada pela análise do consumo de peróxido – Xylenol Orange (FOX), segundo a técnica descrita originalmente por Jiang et al.<sup>44</sup> e adaptada para plasma e soro por Arab e Steghens.<sup>45</sup> Esta metodologia baseia-se na oxidação de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  na presença de hidroperóxidos lipídicos e formação de complexos de  $Fe^{3+}$  com o xilenol laranja, gerando uma cor característica, a qual pode ser medida espectrofotometricamente em 560 nm. O ensaio foi realizado em um reagente de trabalho (metanol absoluto 81%; xilenol orange 100  $\mu$ mol;  $H_2SO_4$  25 mM; BHT 40 mM; sulfato ferroso 250  $\mu$ mol), no qual foram determinados os hidroperóxidos em amostras de plasma. As amostras foram adicionadas ao reagente de trabalho e foi feita a leitura das mesmas e da curva padrão, em espectrofotômetro leitor de microplacas. A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (0, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu$ M).

### 3.7 Avaliação da capacidade antioxidante do plasma

Esta avaliação foi feita pelo método do *ferric reducing antioxidant Power* (FRAP)<sup>46</sup> cujo princípio é baseado na redução do íon férrico  $Fe^{3+}$  à ferroso  $Fe^{2+}$ . Para isso foram preparadas três soluções: A (Tampão acetato: 300 mM, pH 3,6 e Hcl 40 mM), B (TPTZ - 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine - 10 Mm) e C (cloreto férrico hexahidratado -  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  - 20 mM), formando o reagente de trabalho A + B + C na proporção 10:1:1 (V/V). Para este ensaio, o sangue dos animais foi coletado em heparina e centrifugado a 2500 RPM/10 min./4° C. Em seguida, 0,8 mL do plasma obtido foi adicionado à uma mistura de água deionizada (0,25mL) com o reagente de trabalho (2,4mL). Depois, esta solução foi colocada em microplaca e as absorbâncias (a 593 nm) foram lidas, em paralela a uma curva padrão de sulfato ferroso, por meio de um espectrofotômetro leitor de microplacas.

### 3.8 Delineamento experimental (reatividade vascular/ determinações bioquímicas)

**Etapa 1-** Estudos funcionais em preparações de veias mesentéricas intactas, obtidas dos diferentes grupos experimentais propostos foram desafiadas em cubas de órgãos com Ang II na presença de:

- Salina
- Indometacina  $10^{-5}M$  isoladamente
- L-NAME  $10^{-4}M$  isoladamente
- Indometacina  $10^{-5}M$  + L-NAME  $10^{-4}M$
- Indometacina  $10^{-5}M$  + BQ-123  $10^{-6}M$

**Etapa 2** - Nesta etapa, por meio de determinações bioquímicas, foi investigado o grau de estresse oxidativo, bem como capacidade antioxidante não enzimática no plasma dos animais pertencentes aos grupos experimentais propostos.

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

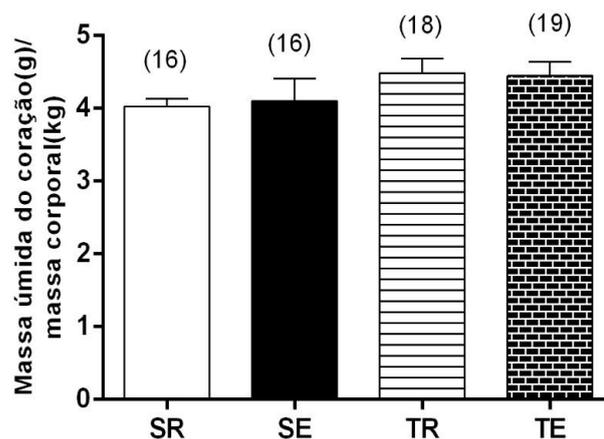
Os dados obtidos foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Comparações entre grupos homocedásticos, que apresentaram dados com distribuição normal foram feitas através análise de variância (ANOVA) de duas vias (treinamento e exposição ao exercício), seguida pelo pós-teste de Bonferroni ou Tukey. Quando a homocedasticidade entre os grupos e/ou a distribuição normal dos dados não foi verificada, aplicou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Diferenças nos valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Massas úmidas corporais

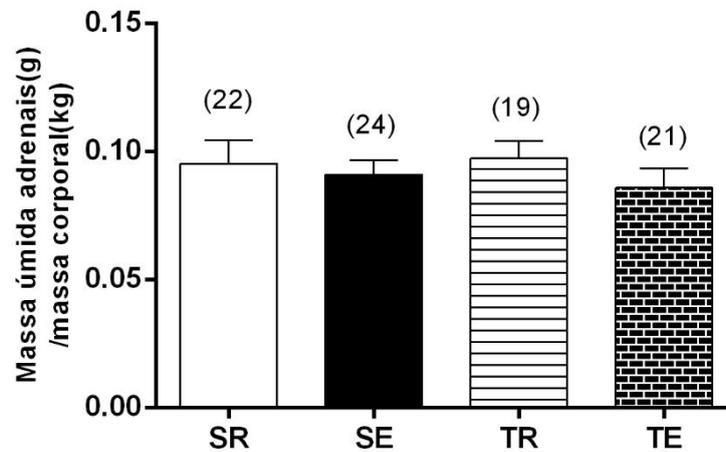
Os dados obtidos mostraram que não houve modificações significativas de massa úmida do coração (Figura 1) ou das adrenais (Figura 2) entre os grupos estudados. Por outro lado, observou-se uma redução significativa da massa úmida dos rins esquerdos (que sofreram obstrução do fluxo sanguíneo pelo *clip*), quando comparado aos rins direitos entre todos os animais (Figura 3).

Figura 1- Massas úmidas do coração (g), normalizadas pelas massas corporais (Kg), determinadas no dia dos experimentos de reatividade vascular



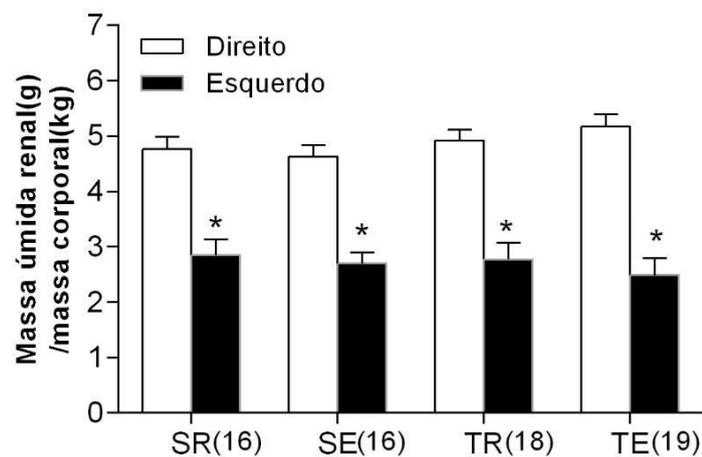
Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Entre parênteses o número de determinações independentes, segundo ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Bonferroni

Figura 2- Massas úmidas adrenais (g), normalizadas pelas massas corporais (Kg), determinadas no dia dos experimentos de reatividade vascular



Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Entre parênteses o número de determinações independentes, segundo ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Bonferroni.

Figura 3- Massas úmidas dos rins (g), normalizadas pelas massas corporais (Kg), determinadas no dia dos experimentos de reatividade vascular

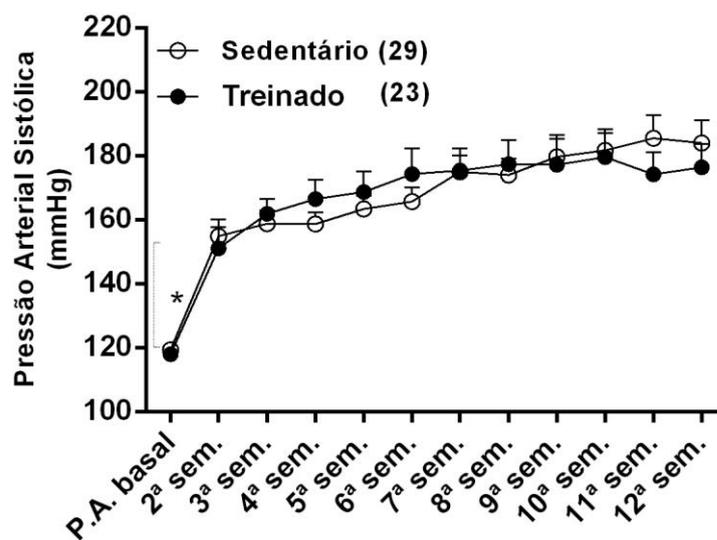


Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Entre parênteses o número de determinações independentes. \* indica diferença significativa dos rins esquerdos comparados aos rins direitos ( $p < 0,05$ ) segundo ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

## 5.2 Pressões Arteriais Sistólicas

Os dados obtidos mostram que a pressão arterial sistólica dos animais estudados elevou-se significativamente nas duas primeiras semanas após a implantação do clip na artéria renal. Esta elevação de pressão arterial sistólica deu-se tanto nos animais sedentários quanto naqueles submetidos a treinamento. Os níveis de pressão arterial sistólica nestes animais mantiveram-se elevados durante todo o período em que se deu o protocolo de treinamento. Cabe ressaltar, no entanto, que não houve diferença significativa de pressão arterial sistólica entre sedentários e treinados ao longo do período de treinamento (Figura 4).

Figura 4- Valores de pressão arterial sistólica determinados em animais sedentários ou submetidos a treinamento ou exercício agudo, antes da cirurgia para a implantação do *clip* (valores basais) e ao longo das 12 semanas do protocolo.

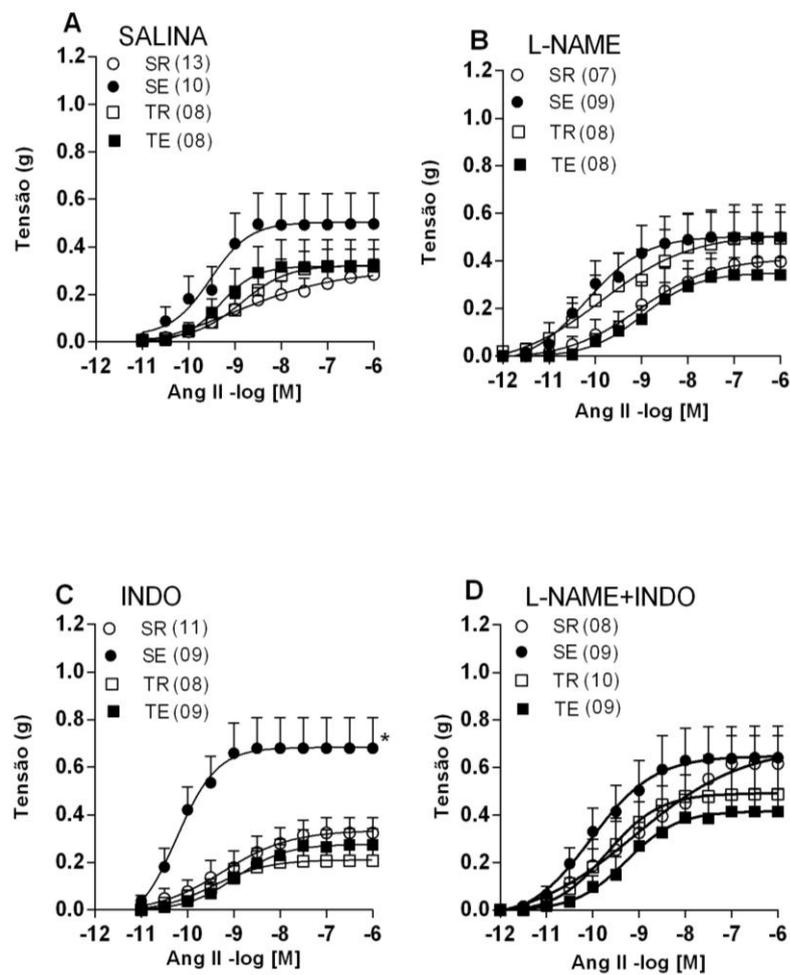


Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Entre parênteses o número de determinações independentes. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores basais (ANOVA de duas vias, seguidas pelo pós- teste de Bonferroni).

### 5.3 Reatividade Vascular à Angiotensina II

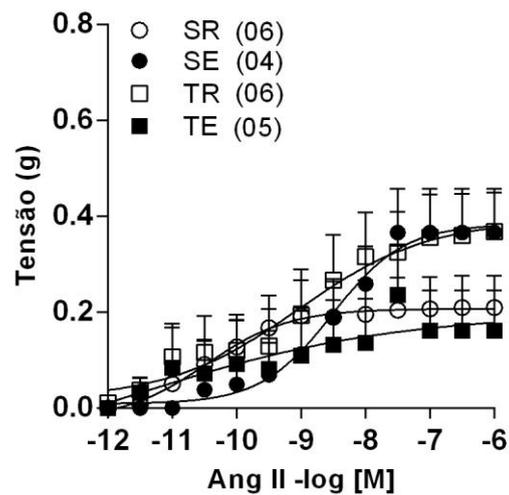
Os valores de  $E_{\max}$  e  $pD_2$  para angiotensina II, obtidos em preparações de veias mesentéricas, não diferiram significativamente entre os grupos estudados sem tratamento prévio (Figura 5A). Na presença do L-NAME, também não se observou diferenças significativas de  $E_{\max}$  ou de  $pD_2$  entre os grupos estudados (Figura 5B). Contudo, na presença da indometacina, observou-se um aumento significativo do  $E_{\max}$  e de  $pD_2$  nas preparações obtidas de animais sedentário exercício, em relação aos animais controles (Figura 5C), (Tabela 1). Cabe ressaltar, que esta modificação de resposta à Ang II ocorreu exclusivamente nestas preparações, que foram obtidas destes animais expostos agudamente ao exercício. Quando o L-NAME foi acrescido à incubação, juntamente com a indometacina, nenhuma diferença de resposta entre os grupos foi observada (Figura 5D). Na verdade, isso ocorreu porque esta incubação possibilitou que as preparações dos animais do grupo sedentário repouso, bem como dos animais do grupo treinado repouso e submetidos a exercício, apresentassem respostas à Ang II de perfil semelhante às observadas nos animais sedentário exercício. Por outro lado, quando o BQ 123 foi acrescido concomitantemente à indometacina, a exposição a qualquer um dos protocolos de exercício utilizados não promoveu modificações de resposta à Ang II.

Figura 5 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações de veias mesentéricas em animais 2R1C sedentários e treinados estudados no repouso (SR e TR, respectivamente) ou após uma sessão de exercício (SE e TE, respectivamente), salina (A), tratadas com L-NAME (B; L-NAME  $10^{-4}$ M), tratadas com Indometacina (C; INDO  $10^{-5}$ M) e L-NAME + INDO (D)



Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). \* indica diferença significativa nos valores de  $E_{m\acute{a}x}$  ( $p < 0,02$ ) do grupo SE em relação aos grupos SR, TR e TE (ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey) Entre parênteses, número de determinações independentes.

Figura 6 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações de veias mesentéricas em animais 2R1C sedentários e treinados estudados no repouso (SR e TR, respectivamente) ou após uma sessão de exercício (SE e TE, respectivamente), tratadas com BQ 123+ INDO (BQ 123  $10^{-6}$ , INDO  $10^{-5}$ M)



Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. Entre parênteses, número de determinações independentes.

Tabela 1 - Valores de pD<sub>2</sub> para Ang II, determinados em veias mesentéricas de animais 2R1C

	SR	pD <sub>2</sub> SE	TR	TE
SALINA	8,81 ± 0,30 (13)	7,42 ± 1,7 (09)	8,85 ± 0,20 (07)	9,23 ± 0,16 (07)
INDOMETACINA	9,07 ± 0,30 (11)	10,02 ± 0,17* (09)	8,77 ± 0,26 (07)	8,68 ± 0,62 (07)
L-NAME	8,73 ± 0,40 (07)	9,80 ± 0,44 (09)	9,06 ± 0,44 (09)	8,55 ± 0,35 (08)
L-NAME+ INDO	9,08 ± 0,27 (08)	9,95 ± 3,07 (08)	9,21 ± 0,33 (08)	8,73 ± 0,24 (09)
BQ 123+ INDO	9,89 ± 0,56 (05)	8,67 ± 0,45 (04)	9,13 ± 0,49 (06)	8,10 ± 0,93 (05)

Valores de pD<sub>2</sub> para Angiotensina II em preparações de veias mesentéricas, não tratadas ou tratadas com L-NAME (10<sup>-4</sup>M), indometacina (INDO; 10<sup>-5</sup>M) isoladamente ou em associação ou BQ 123 associado à indometacina (BQ 123; 10<sup>-6</sup>M), em animais sedentários e treinados estudados no repouso ou estudados após uma sessão de exercício. Valores expressos em média ± erro padrão da média (EPM). Entre parênteses, número de determinações independentes. \* indica diferença significativa (p<0,03) do grupo SE em relação aos demais grupos (ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni)

#### 5.4 Análise da peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes não enzimáticas

Os dados obtidos no plasma dos animais não evidenciaram diferenças significativas nos valores de FOX entre os grupos experimentais estudados. Também não foram evidenciadas diferenças significativas nos valores de FRAP determinados no plasma dos animais pertencentes a estes grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2- Valores de FOX e FRAP

	<b>SR</b>	<b>SE</b>	<b>TR</b>	<b>TE</b>
FOX ( $\mu\text{mol/L}$ )	523,5 $\pm$ 37,9 (09)	486,5 $\pm$ 15,5 (11)	485,5 $\pm$ 38,2 (09)	476,3 $\pm$ 36,3 (10)
FRAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,41 $\pm$ 0,07 (10)	1,46 $\pm$ 0,09 (10)	1,28 $\pm$ 0,04 (09)	1,43 $\pm$ 0,13 (10)

SR e SE indicam animais sedentários estudados no repouso ou após uma sessão única de exercício, respectivamente; TR e TE indicam animais treinados estudados no repouso ou após uma sessão de exercício, respectivamente. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Entre parênteses, número de determinações independentes.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o treinamento ao qual os animais foram submetidos foi de intensidade leve a moderada, conforme já havia sido proposto por Mello et al.<sup>43</sup>, visto que não houve modificações significativas na massa úmida do coração e adrenais. Houve diminuição significativa da massa úmida dos rins esquerdos comparados aos rins direitos de todos os animais estudados, o que atesta a eficácia da cirurgia. De fato, a literatura mostra que a hipertensão renovascular no modelo 2R1C ocasiona a atrofia dos rins esquerdos e hipertrofia dos rins direitos.<sup>47</sup>

No presente estudo observou-se também aumento significativo da pressão arterial sistólica a partir da 2ª semana pós-operatória, elevação esta que se manteve ao longo das doze semanas do protocolo experimental. Esta elevação de pressão arterial comprova a eficácia do modelo 2R1C em induzir hipertensão nos animais estudados. De acordo com Martinez-Maldonado<sup>35</sup>, nos animais 2R1C ocorre aumento da renina circulante a partir da 1ª semana após a implantação do *clip*. Segundo estes autores, a renina circulante converte o angiotensinogênio em angiotensina I que, por sua vez, é convertida a angiotensina II. A elevação da renina circulante nestes animais 2R1C possivelmente promove elevação nos níveis circulantes de angiotensina II, sendo esta a causa apontada para a elevação da pressão arterial sistólica. Contudo, de acordo com estes mesmos autores, os níveis circulantes de renina e angiotensina II tendem a diminuir na medida em que esta hipertensão se cronifica (a partir da 4ª semana). Possivelmente, na fase mais tardia da hipertensão 2R1C, fase esta em que se encontravam os animais do presente estudo, os níveis elevados de pressão arterial são mantidos pelo aumento da angiotensina II tecidual.<sup>37</sup> Neste sentido, existem evidências de que todos os peptídeos do SRAA, bem como as vias de síntese destes peptídeos, podem ser encontrados nos tecidos. Além disso, tem sido proposto que este SRAA tecidual tem um papel preponderante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares.<sup>48,49</sup>

Diversos estudos relatam redução nos níveis de pressão arterial sistólica em ratos hipertensos 2R1C submetidos a um programa de treinamento físico.<sup>50,51</sup> Todavia não observamos diferenças significativas nos níveis de pressão arterial sistólica entre animais sedentários e treinados. Estes dados conflitantes podem estar relacionados à metodologia de medida da pressão arterial na cauda. O procedimento de medida da pressão arterial sistólica por intermédio de manguito de cauda é bastante estressogênico. Assim, reduções da pressão arterial relacionadas ao exercício podem ser mascaradas por alterações de pressão arterial decorrentes do estresse relacionado ao procedimento de medida. Esta limitação metodológica,

contudo, não invalida o presente estudo. Isto porque a pressão arterial sistólica foi aferida nestes animais para se confirmar a efetividade do modelo de hipertensão e, por conta disso, os animais pertencentes a todos os grupos experimentais estudados passaram pelo mesmo procedimento de medida de pressão arterial.

Estudos anteriores mostram os efeitos benéficos do exercício físico na modulação das respostas de diversos leitos venosos à Ang II. Isso se dá por meio da mobilização de mecanismos moduladores locais, fenômeno que assume características muito específicas de acordo com o leito estudado e do tipo de exercício. Nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em compreender essas modulações de resposta à Ang II sobretudo em veias de animais submetidos tanto ao exercício agudo quanto ao treinamento físico. Nesse sentido, já observamos em veias femorais e em mesentéricas de animais normotensos que o exercício físico, sobretudo aquele realizado ao longo do tempo, diariamente, mobiliza prostanóides vasodilatadores à cooperarem com o NO na modulação das respostas à Ang II.<sup>17,33</sup> Essa cooperação, todavia, se dá de forma redundante e, por conta disso, só foi observada em preparações cuja síntese de NO havia sido inibida pelo L-NAME.<sup>52</sup>

Essa interação entre mecanismos locais, que aparentemente é necessária à modulação das respostas do leito venoso mesentérico à Ang II durante o exercício, pode estar modificada nos animais 2R1C. Isso porque o aumento dos níveis teciduais de Ang II pode levar a um aumento do estresse oxidativo local. Assim, a ação da Ang II pode estimular o complexo enzimático NADPH oxidase nos animais 2R1C e, com isso, ocorrer intensa formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Com efeito, isso pode elevar o nível de estresse oxidativo e uma conseqüente redução da biodisponibilidade de NO nesses animais, o que pode prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio.<sup>39,40,53,54</sup> Por conta disso, estudamos também as respostas à Ang II em veias mesentéricas dos animais 2R1C submetidos tanto ao exercício agudo quanto ao treinamento físico. Observamos que nenhum dos protocolos de exercício empregados promoveu modificações de resposta à Ang II em preparações de veias mesentéricas cujos mecanismos moduladores locais não estavam inibidos. Esses dados, semelhantes aos observados em veias femorais e mesentéricas de animais normotensos, sugerem que o modelo de hipertensão empregado não promove drásticas modificações de resposta à Ang II nesse leito venoso.<sup>17,33</sup>

Em preparações cuja síntese do NO havia sido inibida pelo L-NAME, não foram observadas modificações significativas de resposta à Ang II entre os grupos. Por outro lado, quando esses experimentos foram feitos na presença da indometacina, observou-se um aumento de resposta à Ang II nas preparações obtidas de animais sedentário expostos ao

exercício agudo. Com isso os valores tanto de  $E_{máx.}$  quanto de  $pD_2$ , nas preparações obtidas de animais sedentário exercício, foram significativamente maiores em relação aos obtidos nas preparações de animais sedentários que permaneceram em repouso. É importante ressaltar que não houve diferenças significativas de resposta à Ang II em consequência do treinamento, seguido ou não de reexposição a uma sessão de exercício. Esses resultados sugerem que prostanóides vasodilatadores, produzidos localmente, atuam na modulação das respostas à Ang II em veias mesentéricas de animais sedentários submetidos ao exercício agudo.

Vale destacar, no entanto, que na presença simultânea de indometacina e L-NAME as respostas nas preparações à Ang II não diferiram entre os grupos. Isso ocorreu, pois o acréscimo do L-NAME fez com que as resposta à Ang II nas preparações dos animais sedentários mantidos no repouso ou naqueles treinados, estudados no repouso ou após sessão de exercício, fossem de igual magnitude às observadas nos animais submetidos ao exercício agudo. Esses dados reforçam a hipótese de que o exercício agudo tende a elevar as respostas à Ang II apenas nos animais que foram submetidos ao exercício agudo e que a presença dos prostanoides nesses animais é essencial à manutenção da homeostasia. Nos demais grupos de animais, ao que parece, as respostas das veias mesentéricas à Ang II são moduladas principalmente pelo NO.

O papel da prostaciclina, um dos muitos prostanóides, na vasodilatação e na agregação e proliferação plaquetária já foi descrito.<sup>55</sup> Nosso grupo de pesquisa, inclusive, já descreveu as ações dos prostanoides vasodilatadores, em paralelo ao NO, na modulação das respostas à Ang II em veias porta, femorais e mesentéricas de animais normotensos submetidos ao exercício.<sup>16,17,33</sup> Vale destacar que a participação de prostanóides na modulação das respostas de veias mesentéricas de animais normotensos, em cooperação com o NO, ocorreu sobretudo após um período de treinamento.<sup>33</sup>

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os prostanóides vasodilatadores são mobilizados a fim de modular as respostas das veias mesentéricas à Ang II quando os animais 2R1C sedentários são submetidos ao exercício agudo. De fato, o bloqueio da síntese desses prostanóides evidencia um aumento das respostas à Ang II nas preparações desses animais sedentários submetidos ao exercício agudo. Todavia, ainda permanecem pouco compreendidas as razões do aumento das respostas à Ang II nessas preparações, quando a síntese de prostanóides é inibida. Nos estudos realizados em veias femorais e mesentéricas de animais normotensos submetidos a exercício, observamos que as respostas à Ang II são moduladas não apenas por NO e prostanóides vasodilatadores, mas também pela ET-1.<sup>17,33</sup> Mais precisamente, nessas preparações, observamos que prostanóides

vasodilatadores são mobilizados pelo exercício a atuar em conjunto com o NO a fim de modular as ações contráteis da Ang II, que são potencializadas pela ET-1. Com base nessas observações, podemos inferir que a ET-1 potencializa as ações contráteis induzidas pela Ang II nas preparações dos animais sedentários submetidos ao exercício agudo e que a ação dos prostanóides contrabalança esta potencialização. Reforçam essa hipótese os relatos de que a Ang II promove liberação local de ET-1<sup>26,56,57</sup>, bem como os relatos que propõem um papel da ET-1 na redistribuição circulatória induzida pelo exercício.<sup>19,20</sup>

Neste estudo a fim de verificar a participação da ET-1 na modulação das ações da Ang II nas veias mesentéricas dos animais estudados, as preparações foram desafiadas também na presença conjunta do BQ-123 e indometacina. Escolhemos bloquear os receptores ET<sub>A</sub>, pois nas veias femorais e mesentéricas, a potencialização das ações da Ang II exercida pela ET-1 se dá mediante ação nesses receptores.<sup>17-33</sup> Nesta condição, as preparações obtidas dos animais sedentários submetidos ao exercício agudo não diferiram significativamente em relação aos demais grupos experimentais. Com base nesses dados podemos concluir que, nos animais sedentários submetidos ao exercício agudo, as respostas das veias mesentéricas à Ang II são potencializadas pela ET-1 e que isso se dá por meio da ativação dos receptores ET<sub>A</sub>. Amparados nos dados mostrados anteriormente, podemos concluir também que essa potencialização exercida pela ET-1 sobre as respostas à Ang II, nos animais sedentário exercício, é contrabalanceada pelos prostanóides vasodilatadores.

No presente estudo observamos que, em animais 2R1C, essa modulação é mais evidente quando esses são expostos ao exercício agudo. Isso nos faz pensar que essa modulação das respostas da veia mesentérica à Ang II nos animais 2R1C seja parte de um ajuste maior, visando garantir a homeostasia circulatória durante situações estressogênicas, como acontece em uma exposição abrupta e inesperada ao exercício. Talvez, nesses animais 2R1C expostos ao exercício agudo, ocorra uma elevação do estresse oxidativo nos tecidos das veias mesentéricas que, por sua vez, pode aumentar a expressão/atividade das fosfolipases A2 com resultante produção de prostanóides.<sup>41</sup> Nesse sentido, avaliamos também alguns parâmetros que mensuram o balanço redox nesses animais, como os níveis de peroxidação lipídica capacidade total antioxidante do plasma. Os dados obtidos, contudo, não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Com isso, fica enfraquecida a hipótese de um possível desbalanço redox como causa das modificações de resposta à Ang II observadas nas veias mesentéricas dos animais 2R1C submetidos ao exercício agudo. Vale ponderar, no entanto, que a determinação desses parâmetros (FOX e FRAP) no plasma permite uma avaliação do balanço redox sistêmico. Modificações deste balanço em tecidos

específicos, como é o caso das veias mesentéricas, podem não ser detectadas por essas determinações plasmáticas.

Por fim, como já mencionado, a venoconstrição ativa pode exercer algum papel na mobilização de sangue a partir da região esplâncnica durante o exercício.<sup>30,31</sup> Contudo, para que a homeostasia circulatória seja garantida, essa venoconstrição precisa ser modulada a fim de evitar um aumento descontrolado na resistência ao fluxo sanguíneo centrípeto.<sup>32</sup> Nesse sentido, a modulação descrita no presente estudo, que ocorre frente o exercício agudo, aparentemente é parte desse mecanismo homeostático.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados apresentados mostram que, nos animais 2R1C submetidos ao exercício agudo, prostanoídes vasodilatadores são mobilizados a fim de contrabalancear o aumento de resposta à Ang II decorrente de uma interação sinérgica entre Ang II e ET-1. Esse mecanismo, aparentemente, visa evitar um aumento descontrolado na resistência ao fluxo sanguíneo centrípeto na veia mesentérica desses animais.

## REFERÊNCIAS

1. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev.* 2008 Jul;88(3):1009-86.
2. Armstrong RB, Delp MD, Goljan EF, Laughlin MH. Distribution of blood flow in muscles of miniature swine during exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1987 Mar;62(3):1285-98.
3. Musch TI, Friedman DB, Pitetti KH, Haidet GC, Stray-Gundersen J, Mitchell JH, Ordway GA. Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1987 Dec;63(6):2269-77.
4. Norton KI, Delp MD, Duan C, Warren JA, Armstrong RB. Hemodynamic responses during exercise at and above VO<sub>2</sub>max in swine. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Nov;69(5):1587-93.
5. Maeda S, Iemitsu M, Jesmin S, Miyauchi T. Acute exercise causes an enhancement of tissue renin-angiotensin system in the kidney in rats. *Acta Physiol Scand.* 2005 Sep;185(1):79-86.
6. Barrett-O'Keefe Z, Witman MA, McDaniel J, Fjeldstad AS, Trinity JD, Ives SJ, Conklin JD, Reese V, Runnels S, Morgan DE, Sander M, Richardson RS, Wray DW. Angiotensin II potentiates  $\alpha$ -adrenergic vasoconstriction in the elderly. *Clin Sci (Lond).* 2013 Mar;124(6):413-22.
7. Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today.* 2011 Jan;16(1-2):22-34.
8. Loiola RA, Fernandes L, Eichler R, Passaglia RC, Fortes ZB, Carvalho MH. Vascular mechanisms involved in angiotensin II-induced venoconstriction in hypertensive rats. *Peptides.* 2011 Oct;32(10):2116-21.
9. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol* (1985). 2008 Mar;104(3):588-600.
10. Cheng CP, Herfkens RJ, Taylor CA. Inferior vena caval hemodynamics quantified in vivo at rest and during cycling exercise using magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Apr;284(4):H1161-7.
11. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 1):C1371-8.
12. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol.* 1997 May;171(2):205-11. Erratum in: *J Cell Physiol* 1998 Jan;174(1):144.

13. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, Buchwald AB, Channon KM, Hecker M. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res.* 2004 Oct;95(8):841-7.
14. Inoue H, Taba Y, Miwa Y, Yokota C, Miyagi M, Sasaguri T. Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Sep;22(9):1415-20.
15. Di Francesco L, Totani L, Dovizio M, Piccoli A, Di Francesco A, Salvatore T, Pandolfi A, Evangelista V, Dercho RA, Seta F, Patrignani P. Induction of prostacyclin by steady laminar shear stress suppresses tumor necrosis factor-alpha biosynthesis via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Circ Res.* 2009 Feb;104(4):506-13.
16. Chies AB, Rossignoli PS, Daniel EF. Exercise increases the angiotensin II effects in isolated portal vein of trained rats. *Peptides.* 2010 May;31(5):883-8.
17. Chies AB, Rossignoli PS, Baptista RF, Lábio RW, Payão SL. Exercise reduces angiotensin II responses in rat femoral veins. *Peptides.* 2013 Jun;44:47-54.
18. McAllister RM, Jasperse JL, Laughlin MH. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2005 Feb;98(2):753-61.
19. Maeda S, Miyauchi T, Sakane M, Saito M, Maki S, Goto K, Matsuda M. Does endothelin-1 participate in the exercise-induced changes of blood flow distribution of muscles in humans? *J Appl Physiol (1985).* 1997 Apr;82(4):1107-11.
20. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Irukayama-Tomobe Y, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M. Involvement of endogenous endothelin-1 in exercise-induced redistribution of tissue blood flow: an endothelin receptor antagonist reduces the redistribution. *Circulation.* 2002 Oct;106(17):2188-93.
21. Maeda S, Miyauchi T, Kobayashi T, Goto K, Matsuda M. Exercise causes tissue-specific enhancement of endothelin-1 mRNA expression in internal organs. *J Appl Physiol (1985).* 1998 Aug;85(2):425-31.
22. Maeda S, Iemitsu M, Miyauchi T, Goto K. Exercise-induced tissue-specific change in gene expression of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Nov;44 Suppl 1:S336-40.
23. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M. Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Apr;286(4):E609-14.
24. Wang GX, Cai SX, Wang PQ, Ouyang KQ, Wang YL, Xu SR. Shear-induced changes in endothelin-1 secretion of microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2002 Mar;63(2):209-17.

25. Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol*. 1993 Jan;264(1 Pt 2):H150-6.
26. Oriji GK. Angiotensin II-induced ET and PGI<sub>2</sub> release in rat aortic endothelial cells is mediated by PKC. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999 Aug;61(2):113-7.
27. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F. Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Apr;160(1):93-100.
28. Rothe CF. Venous system: physiology of the capacitance vessels. In: Sherpherd JT, Abboud FM, editors. *Handbook of physiology: the cardiovascular system*. Washington (DC): Wiley-Blackwell; 1983. p. 397-452.
29. Flamm SD, Taki J, Moore R, Lewis SF, Keech F, Maltais F, Ahmad M, Callahan R, Dragotakes S, Alpert N, Strauss HW. Redistribution of regional and organ blood volume and effect on cardiac function in relation to upright exercise intensity in healthy human subjects. *Circulation*. 1990 May;81(5):1550-9.
30. Rothe CF. Point: active venoconstriction is/is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Oct;101(4):1262-4; discussion 1265-6, 1270.
31. Hainsworth R, Drinkhill MJ. Counterpoint: active venoconstriction is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Oct;101(4):1264-5; discussion 1265-6, 1270.
32. Rowell LB. *Human cardiovascular control*. New York: Oxford University Press; 1993.
33. Chies AB, Oliveira PB, Rossignoli PS, Baptista RF, Lábio RW, Payão SL. Prostanoids counterbalance the synergism between endothelin-1 and angiotensin II in mesenteric veins of trained rats. *Peptides*. 2017 Feb;88:67-73.
34. Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from Angiotensin-dependent hypertensive mice. *Int J Hypertens*. 2013;2013:305202.
35. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991 May;17(5):707-19.
36. Nakada T, Iijima Y, Kubota Y, Watanabe M, Ishigooka M, Suzuki H. Increased vascular collagen and noncollagenous protein synthesis contributes to sustain chronic phase of two-kidney, one-clip renovascular hypertension. *J Urol*. 1996 Sep;156(3):1180-5.
37. Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*. 1992 Dec;20(6):763-7.
38. Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and

- reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol*. 2010 May;160(1):77-87.
39. Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*. 2004 Apr;109(14):1795-801.
  40. Choi S, Shin HR, Kim SH, Lee MJ, Jun JY, Kim HL, Chung JH, Yeum CH. Effects of oxidative stress on endothelial modulation of contractions in aorta from renal hypertensive rats. *Kidney Res Clin Pract*. 2014 Mar;33(1):19-25.
  41. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol*. 2013 Aug;64(4):409-21.
  42. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934 Feb;59(3):347-79.
  43. Melo RM, Martinho Junior E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003 Oct;42(4):851-7.
  44. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991 Oct;26(10):853-6.
  45. Arab K, Steghens JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem*. 2004 Feb;325(1):158-63.
  46. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.
  47. Oboshi M, Naito Y, Sawada H, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Hirotsu S, Mano T, Tsujino T, Masuyama T. Attenuation of hypertension and renal damage in renovascular hypertensive rats by iron restriction. *Hypertens Res*. 2016 Dec;39(12):832-9.
  48. Simões e Silva AC, Miranda AS, Rocha NP, Teixeira AL. Renin angiotensin system in liver diseases: Friend or foe? *World J Gastroenterol*. 2017 May;23(19):3396-406.
  49. Huber G, Schuster F, Raasch W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2017 Nov;125(Pt A):72-90.
  50. Vêras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1997 Dec;273(6 Pt 2):H2627-31.
  51. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2004 Mar;36(3):533-53.

52. Merkus D, Houweling B, Zarbanoui A, Duncker DJ. Interaction between prostanoids and nitric oxide in regulation of systemic, pulmonary, and coronary vascular tone in exercising swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;286(3):H1114-23.
53. Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Oliveira TG, Boim MA, Campos RR. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. *Am J Hypertens*. 2010 May;23(5):473-80.
54. Campos RR, Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011 Feb;38(2):144-52.
55. Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(3):328-38.
56. Oriji GK, Keiser HR. Cyclosporine A-induced contractions and prostacyclin release are maintained by extracellular calcium in rat aortic rings: role of protein kinase C. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997 Feb;56(2):151-6.
57. Yu AP, Tam BT, Yau WY, Chan KS, Yu SS, Chung TL, Siu PM. Association of endothelin-1 and matrix metalloproteinase-9 with metabolic syndrome in middle-aged and older adults. *Diabetol Metab Syndr*. 2015 Dec;7:111.