

Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Associação ampla UFSCar/UNESP

GUILHERME FLEURY FINA SPERETTA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELA
OBESIDADE: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

**Araraquara
2016**

Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Associação ampla UFSCar/UNESP

GUILHERME FLEURY FINA SPERETTA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELA
OBESIDADE: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Débora Simões de Almeida Colombari

Co-orientadora: Mirian Bassi

Araraquara

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S749a Speretta, Guilherme Fleury Fina
Alterações cardiovasculares induzidas pela
obesidade : envolvimento do sistema renina-
angiotensina no núcleo do trato solitário /
Guilherme Fleury Fina Speretta. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
104 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

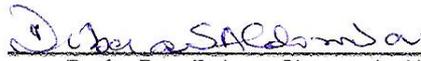
1. Obesidade. 2. Hipertensão. 3. Sistema renina-
angiotensina. 4. Citocinas. 5. Núcleo do trato
solitário. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Guilherme Fleury Fina Speretta, realizada em 01/02/2016:


Profa. Dra. Debora Simoes de Almeida Colombari

UNESP


Profa. Dra. Angelina Zanesco

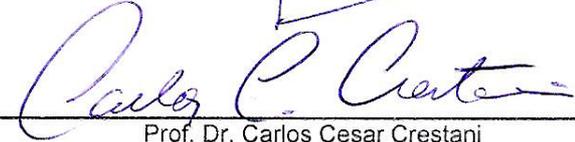
UNESP


Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues

UFSCar


Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

USP


Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais MARIA CHRISTINA FLEURY FINA SPERETTA e ANTONIO CARLOS SPERETTA, pelo amor e suporte incondicional.

À minha esposa CLARIANA RODRIGUES RUY SPERETTA, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu filho RODRIGO RUY SPERETTA, a maior alegria da minha vida e minha grande motivação para seguir em frente.

E aos meus queridos irmãos FERNANDA FLEURY FINA SPERETTA e MARCELO FLEURY FINA SPERETTA, pelo amor, amizade e apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre e em todo momento. E a Nossa Senhora, que sempre me ilumina e intercede por mim.

À minha orientadora Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, pela orientação no doutorado e por todo o conhecimento transmitido durante esses anos.

À minha co-orientadora Mirian Bassi, pelos ensinamentos e discussões acadêmicas, mas principalmente pela amizade e companheirismo ao longo dessa caminhada.

Ao meu compadre, Richard Diego Leite, pela grande amizade e por participar, mesmo a distância, de toda a minha trajetória acadêmica.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelo auxílio e ensinamentos no decorrer desses anos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pelo auxílio em toda a execução do projeto e pela ótima convivência durante esses quatro anos.

Ao Dr. Colin Sumners, do Departamento de Fisiologia e Genômica Funcional da Universidade da Florida, por ter cedido os vetores virais utilizados e pelas discussões dos resultados ao longo da realização da Tese.

Aos amigos e parentes que não participaram diretamente, mas que com certeza contribuíram de alguma maneira nessa trajetória.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP (2013/13118-0) pela concessão das bolsas de doutorado.

RESUMO

Nas últimas décadas a obesidade se tornou uma epidemia mundial. O excesso de tecido adiposo favorece o desenvolvimento de doenças associadas como a hipertensão arterial, apnéia obstrutiva do sono e diabetes tipo II. Dados da literatura mostram que a obesidade ativa o sistema renina-angiotensina (SRA), e aumenta a atividade do sistema nervoso simpático e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, inclusive no sistema nervoso central. Entretanto, as vias e mecanismos neurais envolvidos nessas respostas ainda não estão completamente elucidados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas cardiovasculares e metabólicas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (DH). Estudamos também a possível participação do SRA e do sistema imune no núcleo do trato solitário (NTS) nas alterações cardiovasculares induzidas pela DH. Por fim, testamos se o treinamento de força (TF) realizado em intensidade moderada seria capaz de prevenir as alterações cardiovasculares induzidas pela DH. Para tanto, foram utilizados ratos Holtzman adultos (300 a 320 g) alimentados com DH (3,82 kcal/g e 26,4% de gorduras) ou dieta padrão (DP; 2,25 kcal/g e 5,4% de gorduras) por 6 semanas. Nossos resultados demonstraram maiores níveis de colesterol total, triacilgliceróis, leptina e glicose no sangue e menor sensibilidade à insulina após 6 semanas de DH. Houve um aumento da pressão arterial média (PAM), da modulação simpática da pressão arterial sistólica (PAS), da frequência cardíaca (FC) e do balanço simpatovagal do intervalo de pulso (IP) e menor resposta bradicárdica do barorreflexo em animais alimentados com DH. Após 6 semanas de DH, houve maior expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), maior expressão do receptor AT₁ e da enzima conversora de angiotensina (ECA) e menor expressão dos receptores AT₂ e Mas. Corroborando com a maior expressão de citocinas no NTS, foi demonstrado maior imunoreatividade para GFAP (marcador específico de astrócitos) e maior número de células positivas para Iba-1 (marcador específico para micróglia) no NTS de ratos alimentados com DH. O bloqueio do receptor AT₁ no NTS de animais alimentados com DH promoveu queda na PAM, reduziu a modulação simpática na PAS, reduziu o balanço simpatovagal do IP e restabeleceu a resposta de bradicardia reflexa. A super-expressão de receptores AT₂ no NTS de ratos alimentados com DH reestabeleceu a FC, a sensibilidade do barorreflexo e o balanço simpatovagal do IP, além de uma atenuação parcial na modulação simpática da PAS. Essas respostas foram associadas com o aumento da expressão do RNAm do receptor Mas e a redução na expressão do TNF- α no NTS. Porém, esses efeitos não foram suficientes para atenuar a PAM nos ratos com DH e super-expressão de receptores AT₂ no NTS. Por fim, o TF preveniu as alterações cardiovasculares induzidas pela DH, incluindo o aumento da PAM, da modulação simpática da PAS, da FC, do balanço simpatovagal

do IP, e a redução da sensibilidade do barorreflexo. Essas respostas foram associadas com um aumento na expressão do RNAm de componentes da via protetora do SRA (receptores AT₂ e Mas e ECA2) e da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no NTS. Em conjunto, nossos dados sugerem que a DH promove aumentos na leptina plasmática e na glicemia, com disfunção na sensibilidade à insulina e no perfil lipídico. A DH também promove aumento na pressão arterial associada aos aumentos na modulação simpática na PAS, balanço simpatovagal do IP, FC e disfunção no barorreflexo. O processo neuroinflamatório e um desequilíbrio entre as vias pressora e protetora do SRA no NTS parecem estar envolvidos com o desenvolvimento/manutenção das alterações cardiovasculares encontradas em ratos alimentados com DH. O TF realizado em intensidade moderada parece ser uma importante ferramenta na prevenção das alterações cardiovasculares induzidas pela DH.

Palavras-chave: obesidade, hipertensão, sistema renina-angiotensina, citocinas, núcleo do trato solitário, treinamento de força.

ABSTRACT

In the last decades, obesity has become a worldwide epidemic. Excess of adipose tissue favors the development of associated diseases such as hypertension, obstructive sleep apnea and type II diabetes. Data from the literature have shown that obesity activates the renin-angiotensin system (RAS), increases sympathetic nerve activity and pro-inflammatory cytokines levels, including in the central nervous system. However, the pathways and neural mechanisms involved in these responses are not yet fully elucidated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular and metabolic responses in high-fat diet (HFD) feeding rats. We also study the possible participation of the RAS and the immune system in the nucleus of the solitary tract (NTS) in the obesity-induced cardiovascular changes. Finally, we tested if the resistance training (RT) performed at moderate intensity would be able to prevent obesity-induced cardiovascular changes. To achieve these goals, adult Holtzman rats (300-320 g) were fed with HFD (3.82 kcal/g and 26.4% total fat) or standard chow diet (SD; 2.25 kcal/g and 5.4% total fat) for 6 weeks. We observed higher blood levels of total cholesterol, triglycerides, leptin and glucose and decreased insulin sensitivity after 6 weeks of HFD. There was an increase in mean arterial pressure (MAP), the sympathetic modulation of systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR) and sympathovagal balance of pulse interval (PI), and an impairment in the bradycardic response of the baroreflex in HFD feeding animals. After 6 weeks of HFD, there was an increase in the mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukine-6 (IL-6), an increase in the mRNA expression of the angiotensin converting enzyme (ACE) and AT₁ receptor, and a decrease in the expression of AT₂ and Mas receptors. In agreement with the increased expression of cytokines in the NTS we have demonstrated higher GFAP immunoreactivity (specific marker of astrocytes) and higher number of positive cells for Iba-1 (specific marker for microglia) in the NTS in rats fed with HFD. The blockade of AT₁ receptor in the NTS in animals fed with HFD promoted a decrease in MAP, reduced the sympathetic modulation in SBP, reduced the sympathovagal balance of PI and restored the bradycardic response of the baroreflex. The overexpression of the AT₂ receptors in the NTS in rats fed with HFD reestablished HR, baroreflex sensitivity and sympathovagal balance of PI, and partially attenuated the increase in sympathetic modulation of SBP. These responses were associated with increased Mas receptor mRNA expression and reduction in the TNF- α mRNA expression in the NTS. However, these effects were not sufficient to restore the MAP in HFD feeding rats with AT₂ receptors overexpression in the NTS. Finally, the RT prevented cardiovascular changes induced by HFD, including increases

in MAP, sympathetic modulation of SBP, HR, sympathovagal balance of PI, and reduced baroreflex sensitivity. These responses were associated with increased expression of mRNA for components of protective RAS axis (AT_2 and Mas receptors and ACE2), and the anti-inflammatory cytokine IL-10 as well as the reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL -1 β) in the NTS. Together, our data suggest that HFD promotes increases in plasma levels of glucose and leptin, with dysfunction in insulin sensitivity. HFD also promotes increases in blood pressure associated with increased sympathetic modulation in SBP, sympathovagal balance of PI, HR and baroreflex dysfunction. The neuroinflammatory process and an imbalance between the pressor and protective RAS axis in the NTS seem to be involved with the development/maintenance of the cardiovascular alterations induced by HFD. The TF performed at moderate intensity seems to be an important tool in preventing cardiovascular changes induced by HFD.

Keywords: obesity, hypertension, renin-angiotensin system, cytokines, nucleus of the solitary tract, resistance training.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP, área postrema; cc, canal central; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo do hipoglosso) [Modificado de Ter Horst & Streefland (1994)].....27
- Figura 2.** **A)** Pressão arterial média (PAM), **B)** Frequência cardíaca (FC), e **C)** Sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média \pm erro da média Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 8$)..... 48
- Figura 3.** **A)** Potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 8$)..... 49
- Figura 4.** Expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA), e **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 6$)..... 51
- Figura 5.** Expressão do RNAm no NTS do **A)** fator de necrose tumoral- α (TNF- α), **B)** interleucina-6 (IL-6), e **C)** interleucina-1 β (IL-1 β) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 6$)..... 52
- Figura 6.** **A)** Imunoreatividade para GFAP (vermelho) e Iba-1 (verde) no NTS de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Imagens geradas de magnificação de 10x, barra de escala, 100 μ m. Em destaque, imagens geradas a partir de magnificação de 40x, barra de escala, 30 μ m. **B)** Quantificação da área de coloração positiva ao GFAP/seção (valores de cinza) no NTS, e **C)** Número de células positivas para

Iba-1/seção no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Teste *t* de Student, * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 7$). NTS_i, núcleo do trato solitário intermediário; NTS_c, núcleo do trato solitário comissural; AP, área postrema; CC, canal central; Gr, núcleo grácil; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso.....54

Figura 7. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) pré e após losartan (LOS; 10 μ g/100 nl) bilateralmente no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-pré LOS; $P < 0,05$. DP ($n = 5$) e DH ($n = 6$)..... 57

Figura 8. Alterações na **A)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) pré e após losartan (LOS; 10 μ g/100 nl) bilateralmente no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-pré LOS; $P < 0,05$. DP ($n = 5$) e DH ($n=6$)..... 59

Figura 9. Fotomicrografia de corte coronal do bulbo de um animal representativo do grupo, demonstrando o local das microinjeções bilaterais no NTS intermediário. Barra de escala = 500 μ m. NTS, NTS intermediário; AP, área postrema; CC, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso..... 60

Figura 10. A) Pressão arterial média (PAM) e C) frequência cardíaca (FC) no ciclo claro, e B) PAM e D) FC no ciclo escuro em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Momento da injeção está indicado pela seta. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de basal, # diferente de DP, § diferente de DH-eGFP; $P < 0,05$. DP-eGFP, DH-eGFP e DP-AT₂ ($n = 6$), DH-AT₂ ($n = 6$)..... 64

Figura 11. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 6), DH-eGFP (n = 7), DP-AT₂ (n = 5) e DH-AT₂ (n = 7)66

Figura 12. Alterações na **A)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 6), DH-eGFP (n = 7), DP-AT₂ (n = 5) e DH-AT₂ (n = 7)..... 67

Figura 13. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA) **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; § diferente de DP-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 4), DH-eGFP (n = 5), DP-AT₂ (n = 4) e DH- AT₂ (n = 4).....69

Figura 14. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e **B)** interleucina 6 (IL-6) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 4), DH-eGFP (n = 5), DP-AT₂ (n = 4) e DH- AT₂ (n = 4)..... 70

Figura 15. **A)** Massa corporal, **B)** capacidade de carregamento voluntária máxima (CCVM), e **C)** média do número de escalas por sessão de treinamento de força em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. A barra indica o período de administração da DH. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls (Figuras A e B); Teste *t* de Student (figura C). * diferente dos grupos DP; # Diferente da semana 0; P < 0,05. Em A) (n = 9) em todos os grupos e, em B) e C) (n = 5) em todos os grupos..... 72

Figura 16. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; P < 0,05. Em A) e B) SED-DP e SED-DH (n = 9), TF-DP e TF-DH (n = 7)..... 76

Figura 17. Alterações na **A)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; P < 0,05. SED-DP (n = 9), SED-DH, TF-DP e TF-DH (n = 7)..... 77

Figura 18. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA), e **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; § diferente de SED-DP; P < 0,05. SED-DP, SED-DH e TF-DP (n = 4), TF-DH (n = 5)..... 79

Figura 19. Alterações na expressão do RNAm no NTS de **A)** fator de necrose tumoral- α (TNF- α), **B)** interleucina-6 (IL-6), **C)** interleucina-1 β (IL-1 β), e **D)** interleucina-10 (IL-10)

em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; § diferente de SED-DP; $P < 0,05$. SED-DP, SED-DH e TF-DP (n = 4), TF-DH (n = 5).....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no presente estudo.....	38
Tabela 2. Consumo alimentar, consumo calórico, massa corporal e adiposidade após 6 semanas de dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).....	45
Tabela 3. Parâmetros metabólicos após 6 semanas de dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).....	46
Tabela 4. PAM e FC pré e após a microinjeção bilateral de losartan (LOS) em áreas adjacentes ao NTS em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).....	58
Tabela 5. Adiposidade e parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT ₂ (DP-AT ₂ e DH-AT ₂).....	62
Tabela 6. Adiposidade e medidas plasmáticas em ratos sedentários alimentados com dieta padrão (SED-DP), ratos sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (SED-DH), ratos treinados em força alimentados com dieta padrão (TF-DP), e ratos treinados em força alimentados com dieta hiperlipídica (TF-DH).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- X – Núcleo dorsal motor do vago
- XII- Núcleo do hipoglosso
- Akt – Proteína quinase B
- Ang II – Angiotensina II
- AP – Área postrema
- ARC - Núcleo arqueado do hipotálamo
- AT₁ – receptor de angiotensina tipo 1
- AT₂ – receptor de angiotensina tipo 2
- Bpm – batimentos por minuto
- CC – Canal central
- CCVM – Carga de carregamento voluntária máxima
- cDNA –DNA complementar
- DH – Dieta hiperlipídica
- DP – Dieta padrão
- ECA – Enzima conversora de angiotensina
- ECA2 – Enzima conversora de angiotensina2
- EPI - Epididimal
- FC – Frequência cardíaca
- GLUT4 – Transportador de glicose tipo 4
- HDL - lipoproteína de alta densidade
- HF – Alta frequência
- IL-1 β – Interleucina 1 β
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-10 – Interleucina 10

icv – intracerebroventricular

IP – Intervalo de pulso

ip - intraperitonealmente

iv - intravenosa

LF – baixa frequência

LOS - Losartan

Mas – receptor Mas

MES – Mesentérico

MIF - Fator inibitório de migração de macrófagos

NO – Óxido nítrico

NTS – Núcleo do trato solitário

NTSc - Núcleo do trato solitário comissural

NTSi - Núcleo do trato solitário intermediário

NTSr - Núcleo do trato solitário rostral

OVLT – órgão vascular da lâmina terminal

PAM – Pressão arterial média

PAP – Pressão arterial pulsátil

PAS – Pressão arterial sistólica

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo

RET - retroperitoneal

RNAm – RNA mensageiro

RVL - Área rostroventrolateral do bulbo

SNC – Sistema nervoso central

SOCS3 - Supressor de sinalização de citocinas 3

SRA- Sistema renina-angiotensina

TF – Treinamento de força

TGL – Triacilgliceróis

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TTI – Teste de tolerância à insulina

ua – unidade arbitrária

un – unidade normalizada

VLF – Muito baixa frequência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Interação entre sistema renina-angiotensina e sistema imune no SNC.....	22
1.2 Importância do núcleo do trato solitário no controle cardiovascular.....	25
1.3 Benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular.....	28
1.4 Hipótese do trabalho.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Dietas.....	32
3.3 Implante de cânulas no NTS intermediário.....	32
3.4 Injeção de drogas no NTS intermediário.....	33
3.5 Drogas utilizadas.....	33
3.6 Análise histológica.....	33
3.7 Transferência gênica <i>in vivo</i> no NTS.....	34
3.8 Medidas da pressão arterial e frequência cardíaca.....	34
3.8.1 Medidas agudas.....	34
3.8.2 Medidas crônicas.....	34
3.9 Variabilidade cardiovascular.....	35
3.10 Teste do barorreflexo.....	35
3.11 Treinamento de força.....	36
3.12 Quantificação da expressão gênica no NTS.....	36
3.13 Imuno-histoquímica para astrócitos e micróglia no NTS.....	38
3.14 Teste de tolerância à insulina.....	39
3.15 Medidas plasmáticas.....	40
3.16 Coleta de tecido adiposo.....	40
3.17 Análise estatística.....	40
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS.....	41
4.1 Efeito da dieta hiperlipídica por 6 semanas sobre as variáveis cardiovasculares, parâmetros metabólicos e expressão gênica no NTS.....	41
4.2 Participação da micróglia e de astrócitos no processo inflamatório no NTS.....	41

4.3 Bloqueio do receptor AT ₁ no NTS em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	41
4.4 Super-expressão do receptor AT ₂ no NTS em alimentados com dieta hiperlipídica.....	41
4.5 Efeitos do treinamento de força sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre a massa corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos.....	44
5.2 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre variáveis cardiovasculares.....	47
5.3 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre a expressão do RNAm de citocinas e componentes do SRA no NTS.....	50
5.4 Participação da micróglia e de astrócitos no processo inflamatório no NTS.....	53
5.5 Efeitos do bloqueio do receptor AT ₁ no NTS sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica.....	55
5.6 Microinjeções no NTS intermediário.....	59
5.7 Efeitos da super-expressão de AT ₂ no NTS sobre as alterações na adiposidade, metabolismo e sistema cardiovascular induzidas pela dieta hiperlipídica.....	60
5.7.1 Efeitos da super-expressão de AT ₂ no NTS sobre a massa corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	60
5.7.2 Efeitos da super-expressão de AT ₂ no NTS sobre a PAM, FC e barorreflexo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	62
5.7.3 Efeitos da super-expressão de AT ₂ no NTS sobre expressão do RNAm de componentes do SRA e de citocinas no NTS em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	67
5.8 Efeitos do treinamento de força sobre as alterações na adiposidade, metabolismo e sistema cardiovascular induzidas pela dieta hiperlipídica.....	70
5.8.1 Efeitos do treinamento de força sobre a massa corporal e CCVM em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	70
5.8.2 Efeitos do treinamento de força sobre a adiposidade e alterações metabólicas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	72
5.8.3 Efeitos do treinamento de força sobre a PAM, FC e barorreflexo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	74

5.8.4 Efeitos do treinamento de força sobre a expressão do RNAm de componentes do SRA e de citocinas no NTS de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	77
6. DISCUSSÃO.....	80
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS.....	90
9. APÊNDICE.....	105

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a obesidade tornou-se uma epidemia mundial (Mokdad et al., 2003). Estima-se que aproximadamente 500 milhões de pessoas adultas sejam obesas. Desse total, 205 milhões são homens e 297 milhões são mulheres (Finucane *et al.*, 2011). No Brasil, segundo os últimos dados divulgados pelo IBGE (Ibge, 2014) a incidência de obesidade é de 20,8% da população adulta, e o sobrepeso, por sua vez, atinge mais da metade (56,9%) dos adultos em todas as regiões do país. Apesar de todo o esforço na tentativa de diminuir esses números, a perspectiva para o futuro é de aumento da prevalência de indivíduos com excesso de tecido adiposo (Gregor *et al.*, 2010). O agravante é que a epidemia da obesidade, além de ser uma grande ameaça para a saúde da população, também afeta drasticamente a sustentabilidade financeira dos serviços de saúde, (Long-term pharmacotherapy in the management of obesity. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity, 1996; Cecchini *et al.*, 2015). As consequências econômicas da obesidade e doenças associadas não se limitam aos elevados custos médicos, mas incluem também os custos indiretos ou sociais, tais como: diminuição da qualidade de vida, problemas de ajustes sociais e perda de produtividade (Bahia *et al.*, 2014).

A obesidade é decorrente de uma complexa interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (Heber, 2010). Estudos apontam que mudanças substanciais no estilo de vida do homem nas últimas décadas, incluindo o aumento da ingestão calórica, a redução do gasto energético e o aumento do estresse crônico, contribuem fortemente para o desenvolvimento da obesidade (Kyro *et al.*, 2008; Kokkinos, 2014; Krogh-Madsen *et al.*, 2014). O acúmulo de tecido adiposo, especialmente na região abdominal, promove alterações metabólicas importantes, tais como, a liberação de ácidos graxos livres em excesso na corrente sanguínea, que são estocados de forma ectópica em outros tecidos como músculo esquelético, coração e fígado; e o aumento na síntese e secreção de adipocinas, pró-inflamatórias pelos adipócitos, que resulta em um processo inflamatório crônico de baixa intensidade (Despres *et al.*, 2006). Essas alterações estão diretamente associadas com o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como hipertensão arterial, diabetes tipo II, distúrbios respiratórios, esteatose hepática não alcoólica, aterosclerose e câncer (Despres *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2012).

A correlação positiva entre obesidade e hipertensão é forte, consistente, e confirmada por estudos genéticos e clínicos (Dorresteyn *et al.*, 2012). Estima-se que cada aumento de 10% no índice de massa corporal (calculado pela divisão da massa corporal pela

altura ao quadrado), está associado à elevação da pressão arterial sistólica em 3,9 mmHg (Timpson *et al.*, 2009). No entanto, a circunferência da cintura e a relação cintura-quadril, medidas que inferem a obesidade abdominal, são ainda mais fortemente relacionadas com a hipertensão (Lee *et al.*, 2008). Nesse contexto, dados da literatura têm demonstrado que a fisiopatologia da co-ocorrência de obesidade e hipertensão tem sido foco de inúmeros estudos nos últimos anos (Erdos *et al.*, 2011; De Kloet, Pati, *et al.*, 2013). Estudos pré-clínicos recentes demonstraram que o consumo de dieta hiperlipídica (DH) promoveu aumento da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividade simpática renal em coelhos, e o bloqueio ganglionar autonômico aboliu completamente essas alterações cardiovasculares, sugerindo que a hipertensão induzida pela obesidade têm um forte componente neurogênico (Prior *et al.*, 2010; Armitage *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013).

Vários fatores centrais têm sido descritos como facilitadores da hipertensão derivada da obesidade. Entre eles podemos citar a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), a neuroinflamação, a maior atividade do sistema nervoso simpático, alterações no barorreflexo e o aumento dos níveis de leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo que atua no SNC (Freitas *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2010; Aghamohammadzadeh *et al.*, 2012; Fardin *et al.*, 2012; Putnam *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2015). Além disso, um recente corpo de evidências tem apontado para uma interação entre esses mecanismos (Hilzendeger *et al.*, 2012; Sriramula *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015). Esses achados demonstram a importância do estudo da fisiopatologia das alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade e, principalmente, os mecanismos centrais envolvidos nessas respostas.

1.1 Interação entre sistema renina-angiotensina e sistema imune no SNC

O SRA tem papel importante na regulação cardiovascular (Hodge *et al.*, 1966; Cowley *et al.*, 1972; Niarchos *et al.*, 1979). Classicamente, a angiotensina (Ang) II, um peptídeo de 8 aminoácidos, é considerado o principal efetor desse sistema. A Ang II é formada a partir do angiotensinogênio, uma globulina derivada do fígado, por meio de clivagens proteolíticas pela renina, produzida nos rins e, em seguida, pela enzima conversora de angiotensina (ECA) sintetizada pelas células endoteliais, especialmente nos pulmões. A Ang II atua em uma variedade de tecidos, ativando, predominantemente, seu receptor tipo 1 (AT₁) (De Kloet, Krause, *et al.*, 2013).

A diminuição da pressão de perfusão renal, a redução da concentração do íon sódio que alcança as células da mácula densa, componente tubular do aparelho justaglomerular nos

rins, ou a estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos renais, provocam a liberação de renina com subsequente síntese de Ang II (Hodge *et al.*, 1966; Cowley *et al.*, 1972; Hackenthal *et al.*, 1990). A queda acentuada do volume plasmático, por exemplo, durante uma hemorragia, causa mudanças inversas da concentração da Ang II devido a alterações na taxa de secreção de renina (Hodge *et al.*, 1966), e a estimulação do SRA nessas condições está associada com a secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais (Mulrow *et al.*, 1962). Os efeitos fisiológicos da Ang II também envolvem a vasoconstrição direta e a potencialização das ações do sistema nervoso autônomo simpático (Liang *et al.*, 1978), bem como o aumento da secreção de vasopressina, da sede e do apetite ao sódio (Blair-West *et al.*, 1998; Fitzsimons, 1998).

Todos os componentes do SRA, incluindo precursores e enzimas necessárias para a produção de Ang II, já foram identificados no encéfalo, sugerindo que a Ang II possa agir como neurotransmissor no SNC (Grobe *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2015). Por exemplo, a presença de Ang II no prosencéfalo e no tronco encefálico foi identificada em ratos intactos ou após nefrectomia bilateral indicando que a Ang II pode ser sintetizada no SNC (Ganten *et al.*, 1983). Evidências apontam ainda que, astrócitos secretam angiotensinogênio no espaço intersticial e no líquido extracelular (Deschepper *et al.*, 1986; Stornetta *et al.*, 1988) e que os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) também são capazes de produzir angiotensinogênio (Aronsson *et al.*, 1988). Além disso, estudos demonstraram que a renina (Ganten *et al.*, 1971; Ganten *et al.*, 1983) e a ECA (Saavedra *et al.*, 1982; Correa *et al.*, 1986; Dzau *et al.*, 1986) também são produzidas no SNC.

Um conjunto substancial de resultados sugere que uma hiperatividade do SRA no encéfalo contribui para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares (Steckelings *et al.*, 1992; Blume *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2013). Especificamente, a ativação do receptor AT_1 pela Ang II em órgãos circunventriculares, como o órgão subfornical (SFO), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e área postrema, bem como na região rostroventrolateral do bulbo (RVL) leva ao aumento da pressão arterial (Casto *et al.*, 1984; Hartle *et al.*, 1984; Steckelings *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 2010; De Kloet *et al.*, 2015). Já no núcleo do trato solitário (NTS), a resposta da pressão arterial parece ser dependente da concentração de Ang II microinjetada no NTS; a microinjeção de altas doses aumentam a pressão arterial (Casto *et al.*, 1984) enquanto que baixas doses diminuem essa variável cardiovascular (Tan *et al.*, 2005). No entanto, há um consenso de que a estimulação do receptor AT_1 no NTS reduz a sensibilidade do barorreflexo (Michelini *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999).

Contudo, atualmente já se sabe que o SRA é muito mais complexo e envolve um grande número de componentes que estão relacionados com a manutenção do equilíbrio do

sistema cardiovascular (De Kloet, Krause, *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Por exemplo, a Ang II agindo sobre o receptor de angiotensina subtipo 2 (AT₂) pode opor-se às ações do mesmo peptídeo sobre o receptor AT₁ no sistema cardiovascular (Gallinat *et al.*, 2000; Unger, 2002). Além disso, a Ang (1-7), formada a partir da Ang II pela ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), agindo sobre o receptor Mas também parece ter efeitos antagônicos aos da Ang II sobre o receptor AT₁ (Santos *et al.*, 2013; Bader *et al.*, 2014). Assim, um desequilíbrio entre as vias pressora (Ang II agindo sobre o receptor AT₁) e protetora [Ang II agindo sobre o receptor AT₂ e/ou Ang (1-7) agindo sobre o receptor Mas] do SRA no músculo esquelético, nas artérias renais e em diferentes núcleos no encéfalo relacionados ao controle cardiovascular parecem ser importantes mecanismos envolvidos no desenvolvimento/manutenção de diferentes modelos de hipertensão e de insuficiência cardíaca congestiva (Agarwal *et al.*, 2011; Blanch *et al.*, 2014; Gomes-Santos *et al.*, 2014; De Kloet *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Sumners *et al.*, 2015; Villela *et al.*, 2015).

No caso específico do receptor AT₂, a disponibilidade de um agonista não peptídico específico, o Composto 21 (C21), e de vetores virais que aumentam sua expressão em um tecido alvo específico (Blanch *et al.*, 2014; Sumners *et al.*, 2015) têm permitido uma maior compreensão dos efeitos da estimulação desse receptor na pressão arterial e na regulação da lesão em órgãos terminais induzidos pela hipertensão (Sumners *et al.*, 2015). Nesse contexto, a ativação do receptor AT₂ promove uma leve, porém consistente vasodilatação em diferentes leitos vasculares (Danyel *et al.*, 2013), promove efeitos anti-inflamatórios (Matavelli *et al.*, 2011), além de induzir um forte efeito natriurético (Ali *et al.*, 2015). Contudo, não há um consenso sobre os efeitos anti-hipertensivos da ativação do receptor AT₂. Estudos prévios não encontraram redução na pressão arterial após o tratamento crônico com C21 administrado sistemicamente, em diferentes modelos de hipertensão, tais como, ratos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensão renovascular, ou hipertensão induzida pela inibição da síntese de óxido nítrico (NO) (Matavelli *et al.*, 2011; Paulis *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2012). Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento crônico com o C21 impede o desenvolvimento da hipertensão sensível a sódio em ratos obesos, sendo que uma redução das ações da Ang II no receptor AT₁ nos rins e o aumento nos níveis da ECA2/Ang (1-7) podem desempenhar um importante papel nessa resposta (Ali *et al.*, 2015). Além disso, camundongos nocaute para o receptor AT₂ exibem pressão arterial basal aumentada e maior susceptibilidade para desenvolver a hipertensão DOCA-sal (Ichiki *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 2000), e a super-expressão do receptor AT₂ no núcleo do trato solitário (NTS) atenua o desenvolvimento da hipertensão renovascular (Blanch *et al.*, 2014). Essas respostas divergentes podem estar

relacionadas com as diferentes condições do SRA encontradas em cada modelo de hipertensão (Sumners *et al.*, 2015).

Uma interação entre o sistema imune e o SRA no SNC também tem sido evidenciada em modelos de hipertensão, incluindo a obesidade (Sriramula *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015). O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo parece ser necessário para o desenvolvimento da hipertensão dependente de Ang II (Waki *et al.*, 2008; Brands *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010; Sriramula *et al.*, 2013; Zubcevic *et al.*, 2013). Shi *et al.* (2010) demonstraram que a hipertensão dependente de Ang II está associada com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no PVN e a infusão de minociclina, um antibiótico com ações anti-inflamatórias, atenua o desenvolvimento desse modelo de hipertensão.

Recentemente também foi demonstrado que 3 semanas de DH promoveu uma sensibilização para o desenvolvimento da hipertensão arterial induzida por Ang II em ratos (Xue *et al.*, 2015). Essa resposta foi associada com o aumento na expressão do RNAm de componentes da via pressora do SRA e de citocinas pró-inflamatórias na lâmina terminal (LT), localizada no próencefalo e que contém áreas que desempenham papéis importantes na regulação a longo prazo da pressão arterial, fluido corporal, e homeostase energética, como o SFO, núcleo pré-óptico medial, e OVLN (Xue *et al.*, 2015). Além disso, os autores evidenciaram que a infusão intracerebroventricular (icv) de minociclina ou de pentoxifilina, um inibidor da síntese da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral- α (TNF- α) atenuam o aumento da sensibilização à Ang II induzida pela DH (Xue *et al.*, 2015). Além disso, dados da literatura apontam que a DH promove um processo inflamatório crônico no SNC, aumentando a expressão do receptor AT₁ e da ECA no PVN e no SFO em camundongos (De Kloet *et al.*, 2014). Neste mesmo estudo, foi demonstrado ainda que a deleção do receptor AT₁ no PVN reverte parcialmente a resposta inflamatória no mesmo núcleo em camundongos obesos (De Kloet *et al.*, 2014).

Em conjunto, esses achados indicam uma interação entre o SRA e o sistema imune no SNC em diferentes modelos de hipertensão, incluindo a obesidade.

1.2 Importância do núcleo do trato solitário no controle cardiovascular

O controle rápido da pressão arterial é realizado batimento a batimento, e pequenas variações de pressão são identificadas pelo SNC através dos barorreceptores arteriais, que são terminações nervosas livres localizadas principalmente nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo (Clement *et al.*, 1975; Baskerville *et al.*, 1979). Esses receptores são sensíveis ao

estiramento e respondem com extrema velocidade a qualquer variação da pressão arterial, transmitindo sinais para o SNC a partir dos seios carotídeos através dos pequenos nervos de Hering para os nervos glossofaríngeo no alto do pescoço, e, em seguida, para o SNC. Já os sinais dos barorreceptores dos arcos aórticos são transmitidos através dos nervos vagos, também para o SNC (Ciriello, 1983; Ciriello, Schultz, *et al.*, 1994). A estimulação dos barorreceptores provoca redução da atividade nervosa simpática em diferentes territórios (Blessing *et al.*, 1987; Cravo *et al.*, 1991), vasodilatação na circulação renal, mesentérica e dos membros posteriores (Faber *et al.*, 1983).

O núcleo do trato solitário (NTS) é uma importante área na superfície dorsal do tronco encefálico para a regulação cardiorrespiratória (Colombari *et al.*, 2001; Machado, 2001), pois é o receptor primário de diferentes aferências viscerais, incluindo os barorreceptores arteriais (Torvik, 1956; Cottle, 1964; Palkovits *et al.*, 1977). A lesão eletrolítica no NTS promove vasoconstrição resultando em grande aumento da pressão arterial, provavelmente por desinibição da atividade simpática através da interrupção central da resposta do barorreflexo (Doba *et al.*, 1973; Nathan *et al.*, 1977). Diferentes evidências apontam que o aminoácido L-glutamato é o neurotransmissor envolvido nessas aferências (Talman *et al.*, 1980; Colombari *et al.*, 1994).

O NTS tem projeções excitatórias para diferentes áreas do tronco encefálico envolvidas na regulação cardiovascular, como o núcleo ambíguo, onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo parassimpático, e a região caudoventrolateral do bulbo (CVL) que tem projeções inibitórias para a região rostroventrolateral do bulbo (RVL), onde estão localizados neurônios pré-motores do sistema nervoso autônomo simpático. Além disso, o NTS também tem projeções excitatórias diretas para a RVL que são ativadas principalmente em situações de hipóxia onde ocorre a ativação dos quimiorreceptores periféricos (Guyenet, 2006; Kline *et al.*, 2010).

Como pode ser observado na **Figura 1**, o NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral (NTSr), NTS intermediário (NTSi) e NTS comissural (NTSc). Fortes evidências apontam uma importante participação dos subnúcleos intermediário (NTSi) e comissural (NTSc) do NTS na regulação cardiovascular (Colombari *et al.*, 2001; Machado, 2001; Guyenet, 2006). Ainda que estes núcleos sejam adjacentes, eles apresentam funções distintas nos ajustes dos reflexos cardiovasculares. A lesão eletrolítica do NTSc promove uma redução ou mesmo bloqueio da resposta pressora e bradicárdica induzida pela estimulação do quimiorreflexo (Colombari *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 2013). Por outro lado, a lesão eletrolítica do NTSi promove um bloqueio do barorreflexo (Schreihofner *et al.*, 1999; Schreihofner *et al.*,

2000). Ademais, a lesão do NTS_c não altera a pressão arterial basal (Colombari *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 2013), diferente da lesão do NTS_i que promove hipertensão fulminante (Miura *et al.*, 1972), se não for administrado antagonista de vasopressina e bloqueador ganglionar (Schreihofner *et al.*, 1999). Entretanto, ainda não está claro o papel do NTS na integração das respostas cardiovasculares durante a obesidade.

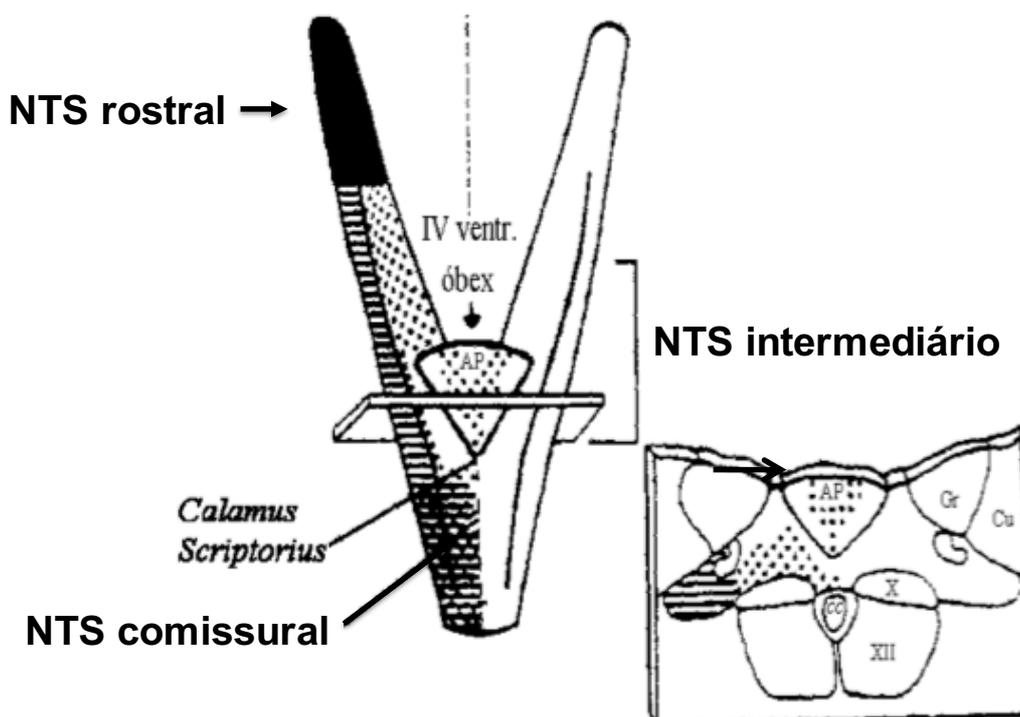


Figura 1. Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP, área postrema; cc, canal central; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo do hipoglosso) [Modificado de Ter Horst & Streefland (1994)].

No NTS há uma grande densidade de receptores AT_1 (Allen *et al.*, 1987; Allen *et al.*, 1988) que, uma vez ativados, promovem atenuação do barorreflexo (Michelini *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999). Nosso laboratório demonstrou que a super-expressão no NTS do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), o qual inibe as ações intracelulares da ativação do receptor AT_1 (Busche *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013), reduz a pressão arterial em ratos SHR (Freiria-Oliveira *et al.*, 2013). Sendo assim, a ativação da via pressora do SRA no NTS parece estar envolvida com o aumento da pressão arterial em situações de hipertensão e com a redução da sensibilidade do barorreflexo.

Recentemente também demonstramos que a super-expressão do receptor AT₂ no NTS atenua a hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C), com redução da modulação simpática na pressão arterial sistólica (PAS), bem como um aumento na sensibilidade do barorreflexo nestes animais. A super-expressão do receptor AT₂ no NTS também aumentou a expressão do RNAm de ECA2 no mesmo núcleo, sugerindo que a Ang (1-7) agindo sobre o receptor Mas também poderia estar envolvida nos efeitos positivos no sistema cardiovascular observado nos animais com hipertensão 2R1C (Blanch *et al.*, 2014). Assim, a ativação da via protetora do SRA no NTS parece ser importante para a prevenção ou tratamento da hipertensão arterial. Contudo, ainda não está claro na literatura se o SRA e o sistema imune no NTS estão envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção das alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade.

1.3 Benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular

Está bem estabelecido que a atividade física e o exercício estão associados com uma probabilidade reduzida de desenvolvimento de doenças metabólicas (Krogh-Madsen *et al.*, 2014; Laye *et al.*, 2015) e distúrbios cardiovasculares, mesmo em indivíduos com risco aumentado, como pacientes obesos (Fagard, 1999; Juraschek *et al.*, 2014). Por outro lado, a inatividade física tem sido associada com o desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas (Krogh-Madsen *et al.*, 2014; Laye *et al.*, 2015) devido à perda de massa muscular esquelética e acúmulo de tecido adiposo visceral, resultando em inflamação crônica de baixa intensidade (Pedersen *et al.*, 2012).

O Colégio Americano de Ciências do Esporte (ACSM) recomenda em seu último posicionamento que, indivíduos realizem exercícios com duração de 150 a 200 minutos por semana gerando um gasto calórico em torno de 1200 a 2000 Kcal por semana para manterem sua massa corporal. Já indivíduos com sobrepeso ou obesidade necessitam aumentar este tempo para 250 a 300 minutos por semana, o que geraria um gasto calórico em torno de 2000 kcal (Donnelly *et al.*, 2009). É importante destacar que o exercício não apenas contribui para o aumento do gasto energético, diminuição da gordura e massa corporal, mas também previne a perda de massa magra, melhora a capacidade cardiorrespiratória e reduz alterações metabólicas relacionados à obesidade, proporcionando um efeito protetor para o sistema cardiovascular (Strasser *et al.*, 2012).

Está bem estabelecido que o exercício aeróbio é uma importante intervenção não farmacológica para reduzir a massa corporal e a adiposidade (Donnelly *et al.*, 2009), bem como prevenir ou tratar distúrbios cardiovasculares em humanos (Pescatello *et al.*, 2004; Kokkinos,

2014). Estudos pré-clínicos também indicam que o exercício de natação é capaz de atenuar os efeitos da DH na adiposidade e no metabolismo (Speretta *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que a hipertensão moderada associada à obesidade diminuiu após o treinamento em esteira realizado em intensidade moderada (Pinheiro *et al.*, 2007) e o desenvolvimento da hipertensão foi atenuado com o mesmo tipo de exercício em SHR (Felix *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2011).

Diferentes mecanismos têm sido identificados para explicar os efeitos protetores do exercício em esteira realizado em intensidade moderada no sistema cardiovascular em animais com distúrbios cardiovasculares. Periféricamente, a redução nos níveis de catecolaminas plasmáticas (Fagard, 1999), melhora na função vascular em decorrência do aumento na expressão proteica de NO-sintase endotelial (Cocks *et al.*, 2013), redução do estresse oxidativo (Liu *et al.*, 2015) e o remodelamento cardíaco (Pinheiro *et al.*, 2007), têm sido descritos. Além disso, o exercício em esteira parece atenuar o desequilíbrio entre as vias pressora e protetora do SRA nas artérias renais e no músculo esquelético, em SHR e ratos com insuficiência cardíaca, respectivamente (Gomes-Santos *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). De maneira interessante, alterações no SRA no SNC também tem sido identificadas como possíveis mecanismos associados ao efeito protetor no sistema cardiovascular induzidos pelo exercício em esteira (Felix *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2011). Foi observado após o treinamento em esteira uma redução na expressão do RNAm e proteica dos componentes da via pressora do SRA, ECA e receptor AT₁, e das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) no PVN e na RVL, bem como o aumento na expressão dos componentes da via protetora do SRA receptores AT₂ e Mas e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) nas mesmas regiões do encéfalo (Agarwal *et al.*, 2011), além da redução da expressão do RNAm de angiotensinogênio no NTS (Felix *et al.*, 2007).

O treinamento de força (TF), por sua vez, ainda é tido como uma modalidade pouco eficiente para modificar significativamente a massa corporal (Donnelly *et al.*, 2009). Assim, os principais efeitos dessa modalidade de exercício talvez sejam a modificação na composição corporal, ou seja, diminuição na quantidade de gordura corporal e aumento na massa muscular (Strasser *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013), e a melhora em parâmetros metabólicos (Speretta *et al.*, 2012). Essas alterações na composição corporal podem ser explicadas a curto prazo, pelo aumento da oxidação de gordura, especialmente após a sessão de exercício e, a longo prazo, pelo aumento da massa muscular, e o conseqüente aumento da taxa metabólica basal, o que resulta em um maior gasto energético diário. Além disso, a melhora dos níveis de força, resistência muscular e coordenação, geralmente, resultam em aumento das atividades diárias, o

que contribui para o aumento do gasto calórico. Todas essas modificações associadas podem levar a diminuição da gordura corporal (Donnelly *et al.*, 2009).

Um crescente corpo de evidências sugere que o TF realizado em alta intensidade parece atenuar o desenvolvimento da hipertensão moderada (Leite *et al.*, 2013) e a expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo mesentérico (Speretta *et al.*, 2012) em ratos alimentados com DH. Esses dados sugerem que o TF também pode ser uma importante ferramenta de intervenção para tratar os efeitos deletérios no metabolismo e no sistema cardiovascular encontrados em animais obesos. Por outro lado, não é de nosso conhecimento que exista na literatura algum estudo que investigou os efeitos do TF realizado em intensidade moderada na pressão arterial, sensibilidade do barorreflexo e variabilidade cardiovascular em animais alimentados com DH. Além disso, os mecanismos centrais envolvidos com os efeitos do TF na prevenção das alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade ainda são pouco compreendidos. Nenhum estudo investigou em ratos alimentados com DH a formação de citocinas pró e anti-inflamatórias ou de componentes do SRA no NTS.

1.4 Hipótese do trabalho

Desta forma, a hipótese do presente estudo foi que a DH pode promover ativação da via pressora e redução da atividade da via protetora do SRA e inflamação crônica no NTS, contribuindo para o aumento da pressão arterial, redução da sensibilidade do barorreflexo e aumento da modulação simpática da PAS e do balanço simpatovagal do intervalo de pulso (IP). Além disso, sugerimos que o TF realizado em intensidade moderada seria capaz de prevenir os distúrbios cardiovasculares induzidas pela DH e que a modulação dessa modalidade de exercício na expressão de citocinas e de componentes do SRA no NTS poderia estar associada a esses efeitos positivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre as variáveis cardiovasculares e o possível envolvimento do sistema renina angiotensina e do sistema imune no NTS.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade do barorreflexo e variabilidade cardiovascular;
- b) Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica na expressão gênica de citocinas e de componentes do SRA no NTS;
- c) Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica na astrogliose e no número de micróglia no NTS;
- d) Verificar a participação do SRA no NTS e sua correlação com as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica;
- e) Verificar se o treinamento de força é capaz de prevenir as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman adultos (300 a 320 g) procedentes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (dois ou três animais por caixa), com livre acesso a ração e água. Permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 7 h às 19:00 h). Os protocolos propostos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão Ética e Uso de Animais (CEUA, processos nº 15/2013 e 20/2013).

3.2 Dietas

Duas dietas foram utilizadas na presente investigação, dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH). A DP composta por ração balanceada da marca Biobase, (Águas Frias, SC, Brasil) contendo: 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura, 5 g de fibras e 200 mg de sódio por 100 g de dieta, conforme fornecido pelo fabricante. A DH, foi preparada com ração Biobase, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1 segundo descrito anteriormente (Estadella *et al.*, 2004; Speretta *et al.*, 2012). Esta DH contém 13 g de proteína, 19 g de gordura, 40 g de carboidrato, 4 g de fibra e 73 mg de sódio por 100 g de dieta, segundo exame bromatológico realizado com amostra da dieta. Todos os componentes desta dieta foram moídos, misturados e oferecidos aos animais em forma de pellets. O valor calórico e o percentual de gorduras das dietas foram respectivamente, 2,25 kcal/g e 5,4% para a DP e 3,82 kcal/g e 26,4% para DH. A massa corporal e a ingestão alimentar foram avaliadas 3 vezes por semana.

3.3 Implante de cânulas no NTS intermediário

Para as cirurgias cerebrais, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de massa corporal; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) administradas intraperitonealmente (ip) e posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Conforme descrito por Colombari *et al.* (1994), o bregma e o lambda foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos ratos e se determinar os pontos de introdução das cânulas-guia de aço inoxidável, a saber: 14,5 mm caudal ao bregma; 0,5 mm lateral ao bregma e 7,0 mm ventral ao osso. Após encontrado os pontos de

introdução das cânulas, foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. As cânulas-guia de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,5 mm e comprimento de 15 mm foram introduzidas bilateralmente no NTS intermediário (NTSi). Ao final da cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs/estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram manipulados diariamente e os experimentos foram iniciados 5-7 dias após a cirurgia cerebral.

3.4 Injeção de fármacos no NTS intermediário

As injeções no NTSi foram feitas utilizando-se seringas Hamilton de 5 µl, conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora. Essa agulha injetora foi introduzida no NTS pelas cânulas-guia previamente fixadas no encéfalo. A agulha injetora (0,3 mm d.i.) era 1,2 mm mais longa que a cânula-guia.

3.5 Fármacos utilizados

Cloridrato de fenilefrina (agonista α 1-adrenérgico; 5 µg/kg; Sigma, USA), nitroprussiato de sódio (doador de NO – agente vasodilatador, 30 µg/kg; Sigma, USA) e losartan (antagonista para receptor AT₁; 10 µg/100 nl; Dupont, USA). As drogas foram diluídas em salina que foi utilizada como veículo. Fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram injetados iv. Losartan foi injetado bilateralmente no NTS em um volume de 100 nl. A dose de losartan foi escolhida baseado em trabalho de Vieira *et al.* (2010).

3.6 Análise histológica

Para os experimentos realizados com injeções de drogas no NTSi, no final dos experimentos os ratos receberam injeções do corante (azul de Evans a 1%) em cada local de injeção no mesmo volume utilizado para a injeção de drogas. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de massa corporal; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e submetidos a uma perfusão com solução de formalina 10%. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um criostato (Leica, CM1850 UV, Wetzlar, Hesse, Alemanha). Os cortes histológicos, montados em lâmina, foram corados pelo método Giemsa e analisados em microscópio óptico (Leica,

DM5500 B, Wetzlar, Hesse, Alemanha) para a confirmação dos sítios de injeções bilaterais no NTS.

3.7 Transferência gênica *in vivo* no NTS

Animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, tal como descrito no item 3.3, e posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Uma craniotomia parcial do osso occipital foi realizada, e a superfície dorsal do bulbo foi exposta. Foram realizadas microinjeções com micropipetas de vidro em 5 locais diferentes ao longo do NTSc e NTSi do vetor viral AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-AT₂. Cada microinjeção consistiu em 150 nL vector/sítio de injeção [eGFP, 1.5×10^{12} cópias genômicas (cg) e AT₂, 3.6×10^{11} cg/ μ l] e foi realizada como se segue: a nível do *calamus scriptorius* e 0,5 mm rostral e 0,4 mm caudal a ele; 0,2-0,5 mm lateral a partir da linha média e 0,4 mm ventral à superfície dorsal do bulbo. Cada injeção foi efetuada ao longo de um período de 1 min. Ao fim da cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório conforme descrito no item 3.3. AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-AT₂ foram construídos como descrito anteriormente (Li, Gao, Matsuura, et al., 2005; Li, Gao, Raizada, et al., 2005) e promovem transdução gênica essencialmente em neurónios de todos os diferentes fenótipos (Zhang et al., 2013). Os vetores virais foram cedidos pelo laboratório do Dr. Colin Sumners, da Universidade da Florida.

3.8 Medidas da pressão arterial e frequência cardíaca

3.8.1 Medidas agudas

No dia anterior ao registro da pressão arterial e frequência cardíaca, os animais foram anestesiados com cetamina + xilazina, conforme descrito anteriormente, e tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50 foram inseridos na aorta abdominal, através da artéria femoral para registro da pressão arterial e na veia cava inferior, através da veia femoral para injeções de drogas iv. No dia seguinte, as cânulas, para registro de pressão arterial foram conectadas a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (ETH-200 CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada e a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) calculadas a partir desse registro. Os registros foram feitos em animais conscientes com livre movimentação.

3.8.2 Medidas crônicas

Os animais foram anestesiados com cetamina + xilazina, conforme descrito anteriormente e receberam o implante de transdutores de telemetria (modelo TA11PAC40; DSI, St.Paul, MN, EUA) na aorta abdominal, como descrito anteriormente (Li *et al.*, 2006; Freiria-Oliveira *et al.*, 2013), para registrar a PAM e a FC. Ao fim da cirurgia, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório conforme descrito no item 3.3.

3.9 Teste do barorreflexo

No dia do experimento, os animais foram conectados ao sistema de registro de pressão arterial e após um período basal de registro, foram feitas injeções intravenosas em bôlus de fenilefrina (5 µg/kg de massa corporal) e de nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de massa corporal) para testar o barorreflexo. Todas as injeções tiveram intervalos de 5 minutos ou até que os parâmetros cardiovasculares voltassem aos níveis basais. As análises das alterações da FC foram feitas a cada 10 mmHg de intervalo de aumento ou queda da PAM, iniciando-se aos (+ ou -) 5 mmHg e finalizando-se aos (+ ou -) 35 mmHg. Os valores foram plotados e uma regressão linear foi usada para cada animal e o slope de cada regressão linear foi usado para calcular as diferenças entre os grupos (Farah *et al.*, 1999; Blanch *et al.*, 2014).

3.10 Variabilidade Cardiovascular

A partir de trechos de pelo menos 15 minutos de registros estáveis, foi realizado o estudo da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) como uma ferramenta para a avaliação da modulação autonômica para o sistema cardiovascular. Séries temporais da PAS (batimento a batimento) e do IP (intervalos entre sucessivos valores da PAS) foram geradas, cujas variabilidades foram avaliadas no domínio da frequência, utilizando o método da transformada rápida de Fourier, conforme descrito anteriormente (Vieira *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2013; Sabino *et al.*, 2013). Para tanto, foi utilizando um software apropriado (CardioSeries, versão 2.3, disponível em <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/>). Cada componente foi caracterizado pela sua amplitude (magnitude), expressa como potência (ordenada), e sua frequência correspondente (abscissa). Espectros de cada segmento foram obtidos e agrupados em um espectro médio resultante para a PAS e IP. Os componentes oscilatórios que foram quantificados nas faixas de baixa frequência [LF (low frequency): 0,20 – 0,75 Hz]. As oscilações de alta frequência [HF (high frequency) 0,75 – 3,0 Hz]. Pela análise da magnitude dos componentes oscilatórios (LF

e HF) da PAS e IP, é possível inferir alterações no controle autonômico do sistema cardiovascular. Componentes de frequência inferior a 0,2 Hz (very low frequency, VLF) não foram considerados para análise (Van De Borne *et al.*, 1997; Billman, 2011). Para avaliar o balanço simpátovagal, a relação LF/HF do IP foi calculado como descrito anteriormente (Montano *et al.*, 1994). LF da PAS é um índice do tônus vasoconstritor simpático, enquanto que LF e HF do IP são o índice de modulação simpática e parassimpática do IP.

3.11 Treinamento de força

Inicialmente, os ratos realizaram duas sessões de adaptação ao protocolo de treinamento, que exige que os animais escalem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m; degrau de 2-cm; inclinação de 80°) com pesos atados em suas caudas, segundo descrito por Hornberger & Farrar (2004). O aparato foi fixado à porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. Após a fixação do aparato à cauda, os animais foram colocados na base da escada e familiarizados com a mesma. Caso necessário um estímulo com os dedos do pesquisador foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram entre cada escalada. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, cinco vezes consecutivas, sem estímulo.

Dois dias após a familiarização, foi realizado o teste de carga de carregamento voluntária máxima (CCVM). A escalada inicial para este teste consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Nas escaladas subsequentes foram adicionados de 10 a 50 g, a cada escalada, até que fosse atingida uma carga com a qual o rato não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi padronizada como o momento em que o animal não conseguiu alcançar o topo da escada. A maior carga carregada em uma escalada completa foi considerada a CCVM. As sessões de treinamento consistiram em 15 a 20 escaladas com 50 a 60% da CCVM do animal, com intervalo de 30 segundos entre cada escalada. O teste CCVM foi realizado a cada duas semanas de treinamento para o ajuste de intensidade (Hornberger *et al.*, 2004; Speretta *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013).

3.12 Quantificação da expressão gênica no NTS

Os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (5% em 100% de O₂), decapitados e os encéfalos rapidamente retirados. Para tanto, o encéfalo foi colocado em uma matriz e dissecado. O NTS foi extraído por microdissecção com a ajuda de um microscópio cirúrgico. O material colhido foi transferido para um tubo livre de RNase e homogeneizado

com 200 µl de solução tampão para a extração do RNA (β -mercaptanol + tampão RLT). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com auxílio de um micromotor e mantido a 4°C. As amostras foram posteriormente centrifugadas por 3 min a 12.000 rpm, e o RNAm foi extraído utilizando-se o RNase kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). As amostras de RNAm foram submetidas a reação de transcriptase reversa em tempo real para transformação de RNAm em cDNA (iScript, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As sequências de cDNA obtidas a partir da reação foram usadas para quantificação através de sondas comerciais para os genes do sistema renina-angiotensina (SRA), a saber: receptor AT₁, receptor AT₂, receptor Mas, enzima conversora de angiotensina (ECA) e enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e as citocinas, a saber: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10). As razões para a escolha desses genes a princípio é a grande relação entre maior ativação do SRA central e hipertensão (Veerasingham *et al.*, 2003) e de citocinas inflamatórias com hipertensão e obesidade (De Kloet, Pati, *et al.*, 2013). As reações com 45 ciclos foram realizadas em um aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A amplificação da sequência alvo foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando existe formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores. Os dados foram expressos utilizando o método Δ CT (descrito abaixo) e normalizado pela quantidade de cDNA da proteína 18s (RNA constitutivo – gene repórter). Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (CT), foi encontrado o Δ CT que é a diferença do valor médio para o gene de interesse e para o RNA 18S (gene repórter). A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços controles da média dos poços tratados, obtendo-se o $\Delta\Delta$ CT. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), conforme descrito anteriormente (Livak *et al.*, 2001), obtendo-se assim valores log que foram comparados entre os grupos.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no presente estudo.

Primer	Sequência
Receptor AT₁	Rn01435427_m1
Receptor AT₂	Rn005660677_s1
Receptor Mas	Rn00562673_s1
ECA	Rn00561094_m1
ECA2	Rn01416293_s1
TNF-α	Rn99999017
IL-6	Rn01410330_m1
IL-1β	Rn99999009_m1
18s	Hs9999901_s1

ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL-6, interleucina-6; IL-1 β , interleucina-1 β ; e IL-10, interleucina-10.

3.13 Imuno-histoquímica para astrócitos e micróglia no NTS

Após perfusão e fixação com paraformaldeído 4%, os bulbos foram cortados (30 μ m) em criostato (Leica, CM1850 UV, Wetzlar, Hesse, Germany) e os cortes foram coletados em placas de cultura de 24 poços contendo PBS 0,1 M. Um em cada 4 cortes do bulbo foram incubados por 15 minutos em uma solução de bloqueio contendo 10% de soro normal de cabra (NGS, Sigma, St.Louis, MO, USA) e Triton-X 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS 0,1 M. Os cortes foram a seguir incubados em anticorpo primário anti-Iba-1 feito em coelho (1:300, Wako Chemicals) que é um marcador específico da micróglia e anti-GFAP feito em camundongo (1:500, Chemicon International, Temecula, CA, USA), um marcador específico para astrócitos, em PBS 0,1 M contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% por 24 horas à 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min) antes de 1 h de incubação em IgG anti-coelho biotilado feito em cabra (1: 500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min) antes de serem incubados com Streptavidina Alexa Fluor 488 conjugado (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e Alexa Fluor 594 anti-camundongo feito em cabra (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA)

contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% em PBS 0,1 M. Depois de novas lavagens em PBS (3×5 min), os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos em ar ambiente e protegidos da luz durante 2 horas antes de serem colocadas lamínulas usando uma solução de montagem que protege a redução da fluorescência (VECTASHIELD®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As seções foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Leica DM5500 B, Wetzlar, Hessen, Alemanha) com o filtro apropriado.

O número de células positivas para Iba-1 ou a área de coloração GFAP foram analisadas utilizando o software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica DM5500 B, Wetzlar, Hessen, Alemanha) e as imagens foram capturadas com ampliação de 20x para todas as seções (cada 120 μ m, tal como definido acima). Usamos a área postrema, o canal central e o óbex como referências anatômicas para definir os níveis rostro-caudais do NTS. Consideramos NTS intermediário (NTSi) as seções que continham a AP, enquanto que o NTS comissural (NTSc) foi determinado do óbex até 500 μ m caudal ao óbex. Para a avaliação do número de micróglia foram realizados z-stacks de 20 μ m (contendo 20 imagens), estas foram contadas bilateralmente à mão a cada 120 μ m em cortes do NTS pareados, representativos dos dois grupos experimentais. Para avaliação da área de GFAP, as imagens foram convertidas em tons de cinza e formatos binários. Os limiares para o equilíbrio entre preto e branco foram ajustados para o mesmo nível nos cortes representativos do NTS e a área de coloração de GFAP foi indicada como valores de cinza/corte. No caso no NTSi, contagens e valores de cinza foram tomadas a partir da média de ambos os lados.

3.14 Teste de tolerância à insulina (TTI)

A sensibilidade à insulina foi medida pelo teste de tolerância à insulina (TTI) e a constante de velocidade de desaparecimento de glicose no plasma (Kitt) foi calculada usando a fórmula de $0,693/\text{meia-vida biológica } (t_{1/2})$. O $t_{1/2}$ da glicemia foi calculada a partir da inclinação da análise dos quadrados mínimos da concentração de glicose no plasma durante a fase linear de declínio (Bonora *et al.*, 1989; Delbin *et al.*, 2012). Os ratos foram submetidos a uma TTI após 8 horas de jejum. A insulina humana recombinante (Novolin R, Novo Nordisk, Montes Claros, MG, Brasil) foi administrada ip numa dose de 2,0 U/kg e amostras de sangue foram coletadas em 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min da veia da cauda e a glicemia foi medida usando tiras de teste padrão (One Touch UltraMini/Johnson & Johnson, Milpitas, CA, EUA). O TTI é expresso como Kitt (%/min), ou seja, a percentagem da redução da concentração de glicose no plasma por minuto (Delbin *et al.*, 2012).

3.15 Medidas plasmáticas

O sangue troncular foi coletado e a seguir, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4-8° C. Foram realizadas as análises de glicemia, triacilgliceróis (TGL), colesterol total, e lipoproteína de alta densidade (HDL). As concentrações séricas de glicose, TGL, colesterol total e HDL foram determinadas por método colorimétrico utilizando kits comerciais (Laborlab, São Paulo, Brasil), com sensibilidade de 0,7 mmol.L-1, 0,14 mmol.L-1 e 0,5 mmol.L-1, respectivamente. Além disso, o plasma foi utilizado para determinação das concentrações plasmáticas de leptina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e insulina (ALPO, Salem, NH, USA), conforme descrito anteriormente (Calixto et al., 2010; Leiria et al., 2012).

3.16 Coleta de tecido adiposo

Os tecidos adiposos retroperitoneal (RET), epididimal (EPI) e mesentérico (MES), foram imediatamente retirados e pesados após a eutanásia dos animais. A coleta de tecido adiposo foi realizada de acordo com as descrições de Cinti (2005).

3.17 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls ou teste *t* de Student foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos e grupos, conforme o indicado. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 Efeito da dieta hiperlipídica por 6 semanas sobre as variáveis cardiovasculares, parâmetros metabólicos e expressão gênica no NTS

Animais foram divididos em dois grupos: um grupo foi alimentado com dieta padrão (DP) e outro com dieta hiperlipídica (DH). Após 6 semanas, foram realizados o TTI e a medida de glicemia, após 8 horas de jejum. Após 48 horas, em animais conscientes e com livre movimentação, a PAM e FC basais, a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade cardiovascular foram avaliadas. Vinte quatro horas após as medidas cardiovasculares e após 12 h de jejum, os animais, foram anestesiados com uma mistura de halotano (5% em 100% de O₂) e decapitados para coleta de sangue e posterior análise de variáveis sanguíneas de colesterol total, HDL, TGL, leptina e insulina. Além disso, os encéfalos foram retirados, imediatamente congelados em gelo seco e armazenados em freezer - 80°C para a quantificação posterior do mRNA dos genes de interesse no NTS. Por fim, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico de todos os animais foram retirados e pesados.

4.2 Participação da micróglia e de astrócitos no processo inflamatório no NTS

Animais foram divididos em dois grupos: um grupo foi alimentado com dieta padrão (DP) e outro com dieta hiperlipídica (DH). Após 6 semanas os animais foram anestesiados com tiopental e perfundidos transcardiacamente com PBS e paraformaldeído 4%. Posteriormente os encéfalos foram cortados (30 µm) para realização de imuno-histoquímica para a marcação de astrócitos e micróglia.

4.3 Bloqueio do receptor AT₁ no NTS em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

De acordo com os dados obtidos nos experimentos anteriores, animais foram divididos em dois grupos: um grupo foi alimentado com dieta padrão (DP) e outro com dieta hiperlipídica (DH). Após 6 semanas, os animais receberam cânula de aço inoxidável bilateral no NTSi. A PAM, FC, a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade cardiovascular foram avaliadas, em animais conscientes e com livre movimentação, antes e após 30 minutos da microjeção bilateral de losartan (10 µg/100 nl) no NTSi.

4.4 Super-expressão do receptor AT₂ no NTS em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

Ratos foram submetidos a cirurgia para implante de transdutores de telemetria para registro contínuo da PAM e FC. O registro da PAM e FC foi realizado durante 24 horas uma vez por semana. Após uma semana de recuperação os animais foram divididos em dois grupos: um grupo foi alimentado com dieta padrão (DP) e outro com dieta hiperlipídica (DH). Após 3 semanas de dieta os animais receberam 5 injeções no NTS do vetor viral AAV2-eGFP ou AAV2-AT₂. Assim, os animais foram divididos nos seguintes grupos: DP-eGFP, DP-AT₂, DH-eGFP e DH-AT₂. Após a injeção do vetor viral os animais foram alimentados com DP ou DH por mais 3 semanas. Ao final do experimento os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (5% em 100% de O₂) e, imediatamente, decapitados para coleta de sangue, tecido adiposo e encéfalo para análise da adiposidade, metabolismo e expressão do RNAm de citocinas e componentes do SRA no NTS, respectivamente. Para confirmação do local da super-expressão do receptor AT₂ no NTS, foi realizada a quantificação do seu RNAm no NTS.

Outro conjunto de animais foi dividido nos mesmos grupos experimentais e submetido ao mesmo protocolo experimental, porém sem o implante prévio do transdutor de pressão. Após 6 semanas de DH e 3 semanas da injeção do vetor viral no NTS, em animais em animais conscientes e com livre movimentação, a PAM e FC basais, a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade cardiovascular foram avaliadas. Ao final do experimento os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (5% em 100% de O₂) e, imediatamente, decapitados para coleta de sangue, tecido adiposo e encéfalo para avaliar a adiposidade, metabolismo e expressão do RNAm de citocinas e componentes do SRA no NTS, respectivamente.

4.5 Efeitos do treinamento de força sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica

Animais foram divididos em quatro grupos experimentais: sedentário dieta padrão (SED-DP); sedentário dieta hiperlipídica (SED-DH); treinamento de força dieta padrão (TF-DP); e treinamento de força dieta hiperlipídica (TF-DH). Os animais dos grupos TF realizaram treinamento em intensidade moderada em uma escada vertical 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) durante 10 semanas. Cada sessão do TF consistiu em 15-20 escalas com um intervalo de 30 s de descanso entre elas. Nas primeiras 3 semanas de TF todos os grupos foram alimentados com dieta padrão. Após esse período os grupos DH foram alimentados com dieta hiperlipídica por 7 semanas. Ao final das 10 semanas de TF e 7 semanas de DH, foram realizados o TTI e a medida de glicemia, após 8 horas de jejum. Após 48 horas, em animais em animais conscientes e com livre movimentação, a PAM e FC basais, a sensibilidade do

barorreflexo e a variabilidade cardiovascular foram avaliadas. Após 24 horas os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (5% em 100% de O₂) e, imediatamente, decapitados para coleta de sangue, tecido adiposo e encéfalo para avaliar a adiposidade, metabolismo e expressão do RNAm de citocinas e componentes do SRA no NTS, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre a massa corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos

Na **Tabela 2** podemos verificar que o grupo DH apresentou um consumo alimentar (g/dia) menor que o grupo DP ($P < 0,05$), porém o consumo calórico (kcal/dia) do grupo DH foi maior do que o grupo DP ($P < 0,0001$), **Tabela 2**. A massa corporal inicial dos animais que foram assinados para serem alimentados com DP ou DH foi semelhante ($P = 0,27$), porém a massa corporal após 6 semanas de dieta foi maior no grupo DH ($P < 0,001$), **Tabela 2**. O grupo alimentado com DH apresentou maiores pesos relativos dos tecidos adiposos epididimal (EPI) ($P < 0,001$), retroperitoneal (RET) ($P < 0,0001$) e mesentérico (MES) ($P < 0,01$) comparados ao grupo DP (**Tabela 2**).

Analisando o perfil lipídico, foram observados maiores níveis séricos de colesterol total ($P < 0,0001$), triacilgliceróis (TGL) ($P < 0,01$) e glicose ($P < 0,001$) no grupo DH quando comparado ao grupo DP, porém não houve alteração na lipoproteína de alta densidade (HDL) ($P = 0,93$) (**Tabela 3**). Os resultados do teste de tolerância à insulina (TTI) mostraram menor sensibilidade à insulina após 6 semanas de DH quando comparado ao grupo controle ($P < 0,01$) e os níveis plasmáticos de leptina foram maiores após 6 semanas de DH ($P < 0,05$), **Tabela 3**.

Tabela 2. Consumo alimentar, consumo calórico, massa corporal e adiposidade após 6 semanas de dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH)

	DP	DH
Consumo alimentar (g/dia)	27,6 ± 1,0 (n = 10)	25,1 ± 0,6* (n = 10)
Consumo calórico (kcal/dia)	56 ± 2,2 (n = 10)	105 ± 2,3* (n = 10)
Massa corporal inicial (g)	305 ± 2,2 (n = 9)	301 ± 3,0 (n = 10)
Massa corporal final (g)	408 ± 2,3 (n = 9)	426 ± 3,8*# (n = 10)
Tecido adiposo epididimal (g/100 g massa corporal)	0,73 ± 0,04 (n = 9)	1,13 ± 0,08* (n = 10)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g massa corporal)	0,61 ± 0,03 (n = 9)	0,97 ± 0,03* (n = 10)
Tecido adiposo mesentérico (g/100 g massa corporal)	0,55 ± 0,07 (n = 9)	0,96 ± 0,11* (n = 10)

Os valores estão apresentados como média ± erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; P < 0,05.

Tabela 3. Parâmetros metabólicos após 6 semanas de dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH)

	DP	DH
Colesterol Total (mg/dl)	60 ± 2,0 (n = 6)	80 ± 2,5* (n = 6)
HDL (mg/dl)	22 ± 0,4 (n = 8)	22 ± 1,4 (n = 8)
TGL (mg/dl)	39 ± 2,6 (n = 8)	56 ± 5,0* (n = 8)
Glicemia (mg/dl)	91 ± 2,3 (n = 6)	109 ± 2,4* (n = 6)
Kitt (%/min)	3,7 ± 0,1 (n = 7)	2,7 ± 0,3* (n = 7)
Leptina (ng/ml)	1,0 ± 0,2 (n = 4)	4,5 ± 1,2* (n = 4)

Os valores estão apresentados como média ± erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; P < 0,05. HDL: lipoproteína de alta densidade; TGL: triacilgliceróis, Kitt (%/min): percentagem de declínio por minuto da concentração de glicose no plasma.

5.2 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre variáveis cardiovasculares

Conforme podemos observar nas **Figuras 2A e 2B**, a pressão arterial média (PAM) (DH6: 116 ± 1 vs. DP6: 106 ± 1 mmHg; $P < 0,01$) e a frequência cardíaca (FC) (DH6: 362 ± 4 vs. DP6: 338 ± 6 bpm; $P < 0,01$) foram maiores no grupo DH quando comparado ao grupo controle.

Após 6 semanas, o grupo alimentado com DH apresentou redução da bradicardia reflexa quando comparado ao grupo DP (slope: DH6: $-0,84 \pm 0,05$ vs. DP6: $-1,90 \pm 0,21$ bpm/mmHg; $P < 0,001$), porém não foram encontradas alterações na taquicardia reflexa (slope: DH6: $-3,4 \pm 0,4$ vs. DP6: $-4,0 \pm 0,3$ bpm/mmHg; $P = 0,22$), **Figura 2C**.

Analisando a variabilidade cardiovascular, foi encontrada maior modulação simpática na pressão arterial [espectro da banda LF da pressão arterial sistólica (PAS)] no grupo DH (DH6: $7,4 \pm 0,5$ vs. DP6: $3,5 \pm 0,6$ mmHg²; $P < 0,001$) (**Figura 3A**). Além disso, encontramos maior modulação simpática do intervalo de pulso (IP) (espectro da banda LF do IP) após 6 semanas de DH [DH6: $37,8 \pm 2,4$ vs. DP6: $21,8 \pm 2,4$ unidades normalizadas (un); $P < 0,001$] e menor modulação parassimpática no IP (espectro da banda HF do IP) (DH6: $61,0 \pm 2,9$ vs. DP6: $81,3 \pm 2,5$ un; $P < 0,0001$), resultando em um aumento no balanço simpatovagal (relação LF/HF) do IP (DH6: $0,60 \pm 0,06$ vs. DP6: $0,32 \pm 0,05$ un; $P < 0,01$), **Figuras 3B-D**.

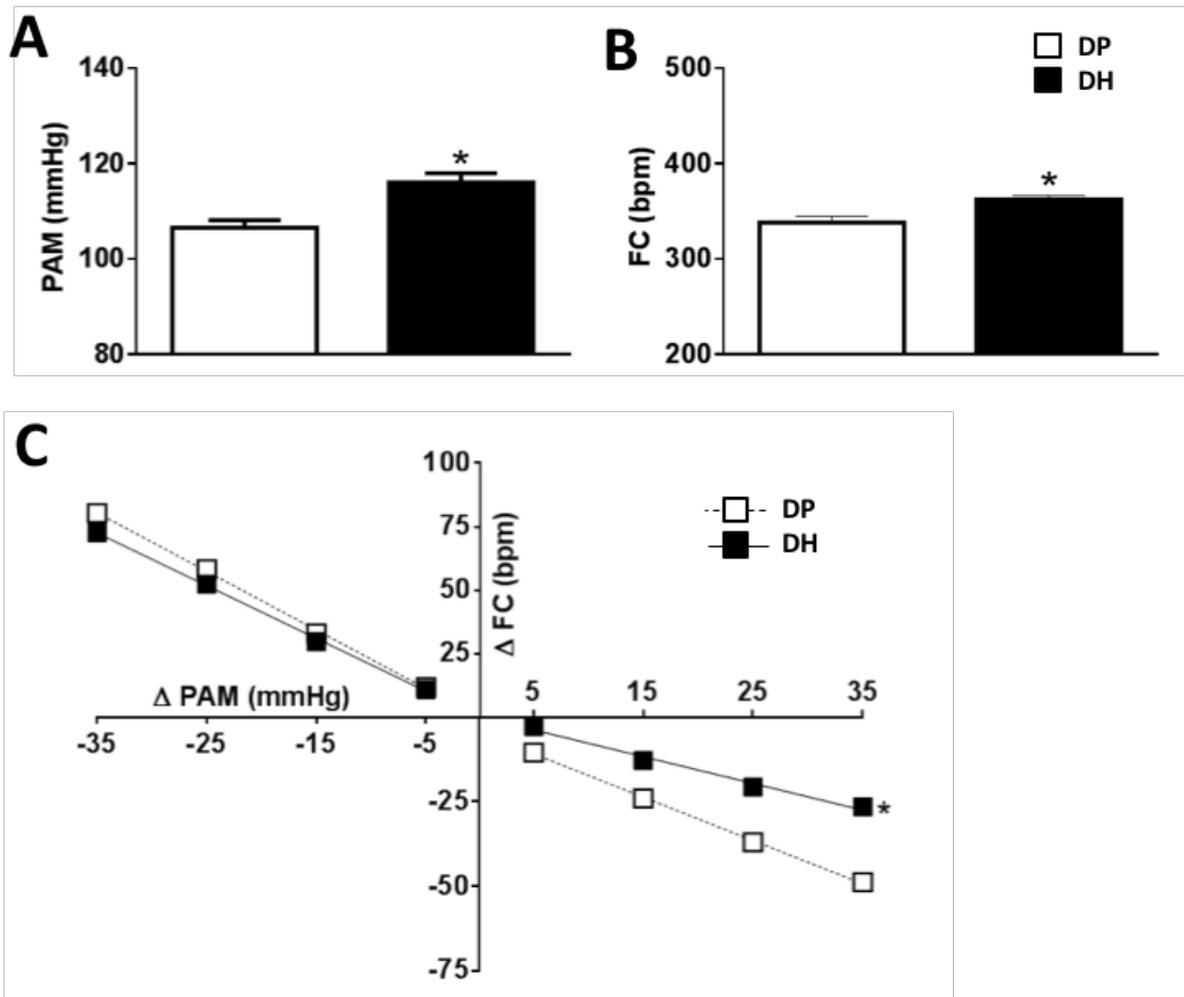


Figura 2. **A)** Pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média \pm erro da média Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 8$).

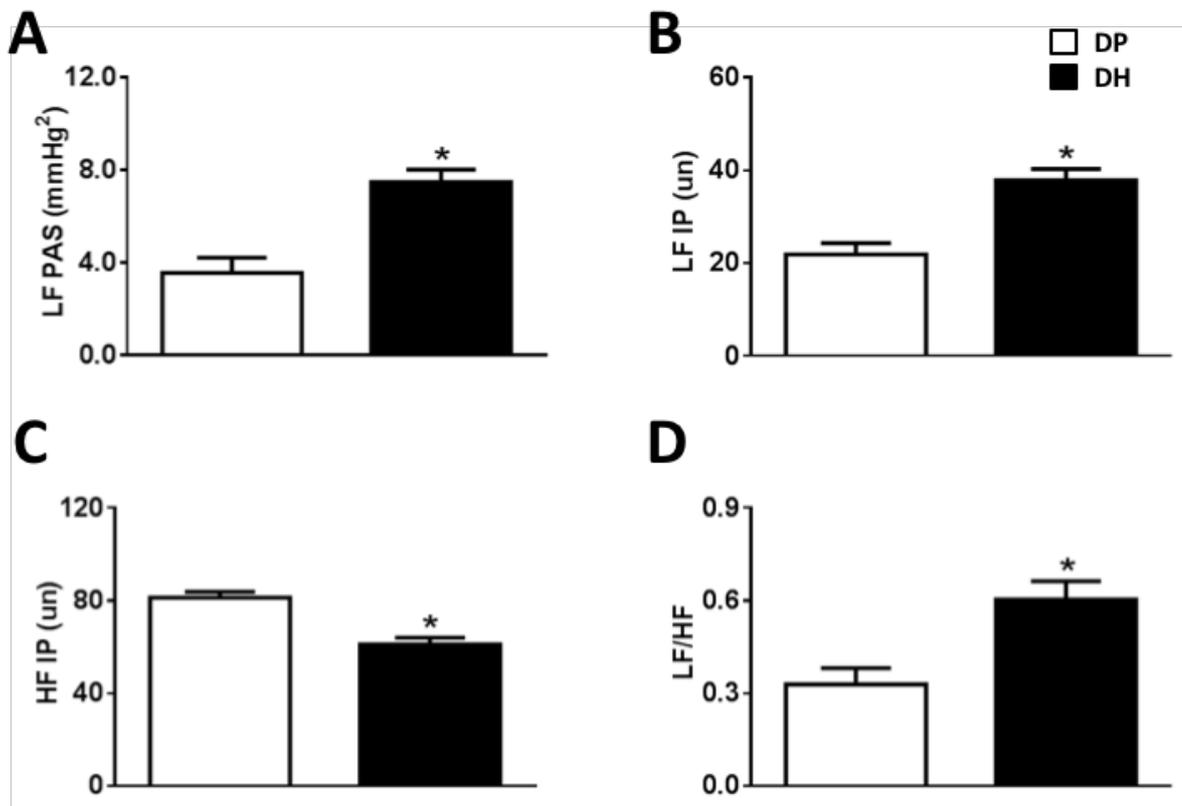


Figura 3. **A)** Potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 8$).

5.3 Efeitos de 6 semanas de dieta hiperlipídica sobre a expressão do RNAm de citocinas e componentes do SRA no NTS.

Após 6 semanas de DH houve aumento na expressão do RNAm de ECA (DH6: $2,85 \pm 0,73$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,37$ número de vezes; $P < 0,05$) e do receptor AT_1 (DH6: $2,74 \pm 0,35$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,34$ número de vezes; $P < 0,01$) e uma redução na expressão do RNAm dos receptores AT_2 (DH6: $0,35 \pm 0,07$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,23$ número de vezes; $P < 0,05$) e Mas (DH6: $0,45 \pm 0,07$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,22$ número de vezes; $P < 0,05$) no NTS quando comparado ao grupo controle (**Figuras 4A-D**). Não houve alteração na expressão da ECA2 (DH6: $0,55 \pm 0,16$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,20$ número de vezes; $P = 0,11$), **Figura 4E**.

Além disso, 6 semanas de DH promoveu maior expressão de RNAm no NTS de $TNF-\alpha$ (DH6: $3,23 \pm 0,83$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,22$ número de vezes; $P < 0,05$) e IL-6 (DH6: $2,73 \pm 0,56$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,16$ número de vezes; $P < 0,05$), **Figuras 5A-B**. A expressão do RNAm da IL- 1β não foi diferente do grupo DP (DH6: $1,10 \pm 0,42$ vs. DP6: $1,00 \pm 0,25$ número de vezes; $P = 0,83$), **Figura 5C**.

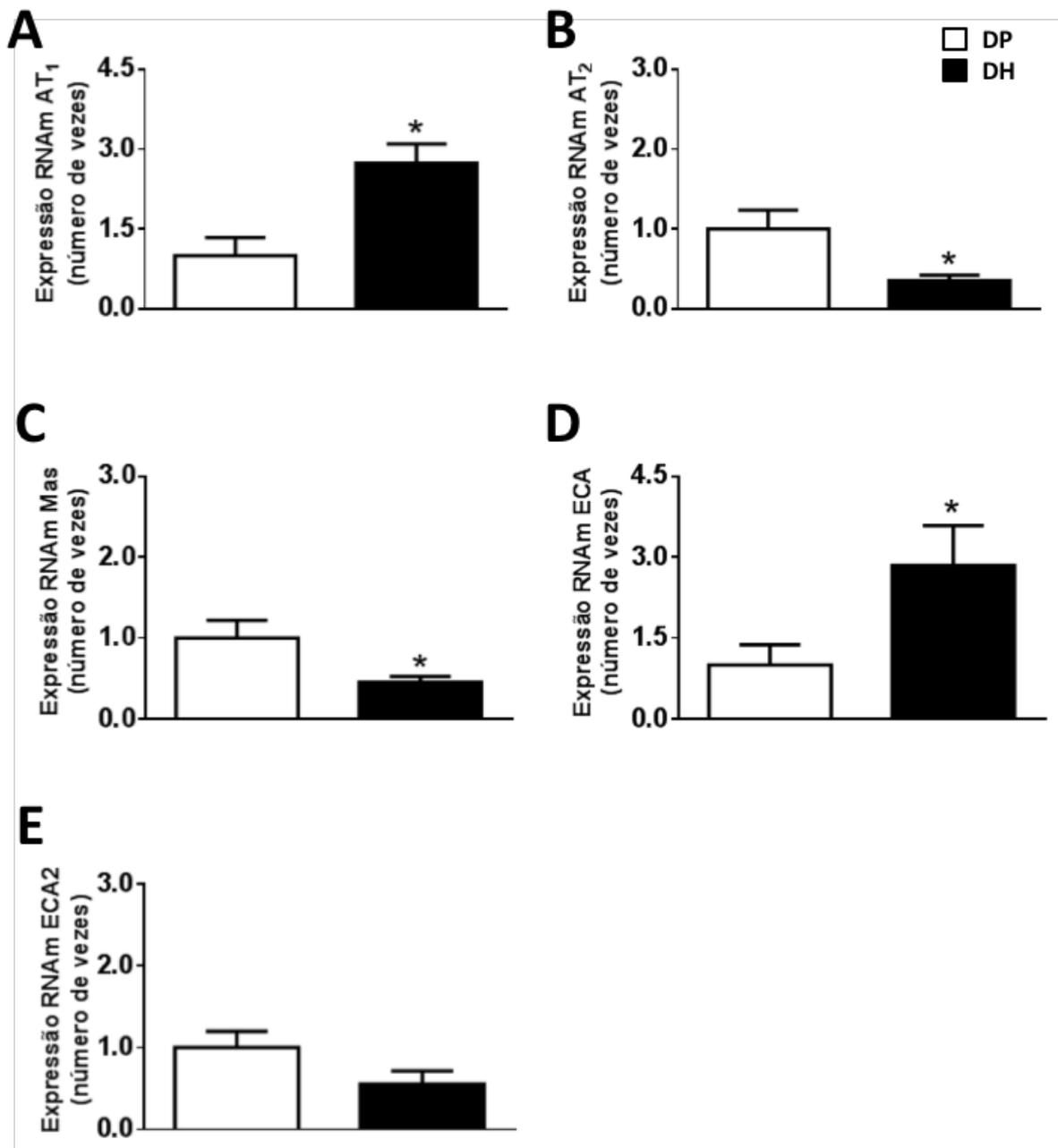


Figura 4. Expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA), e **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média ± erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 6$).

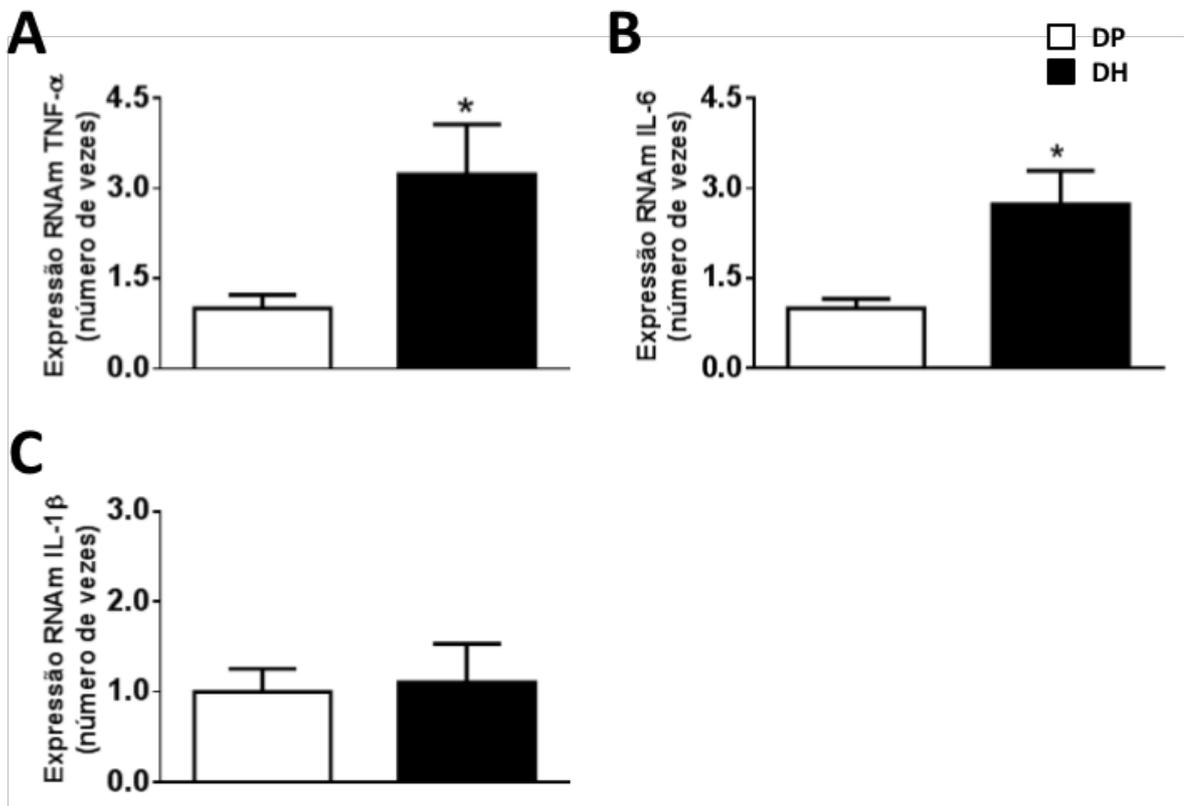


Figura 5. Expressão do RNAm no NTS do **A)** fator de necrose tumoral- α (TNF- α), **B)** interleucina-6 (IL-6), e **C)** interleucina-1 β (IL-1 β) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 6$).

5.4 Participação da micróglia e de astrócitos no processo inflamatório no NTS

Após 6 semanas o grupo DH apresentou maior imunorreatividade para GFAP (NTSi: DH: 162 ± 9 , vs. DP: 133 ± 3 ; NTSc: DH: 140 ± 5 , vs. DP: 119 ± 5 valores de cinza/seção; $P < 0,05$) (**Figura 6B**) e maior número de células positivas para Iba-1 (NTSi: DH: 23 ± 2 , vs. DP: 16 ± 1 ; NTSc: DH: 24 ± 2 , vs. DP: 17 ± 1 número de células positivas/seção; $P < 0,05$) (**Figura 6C**) quando comparados ao grupo DP no NTS intermediário (NTSi) e também no NTS comissural (NTSc).

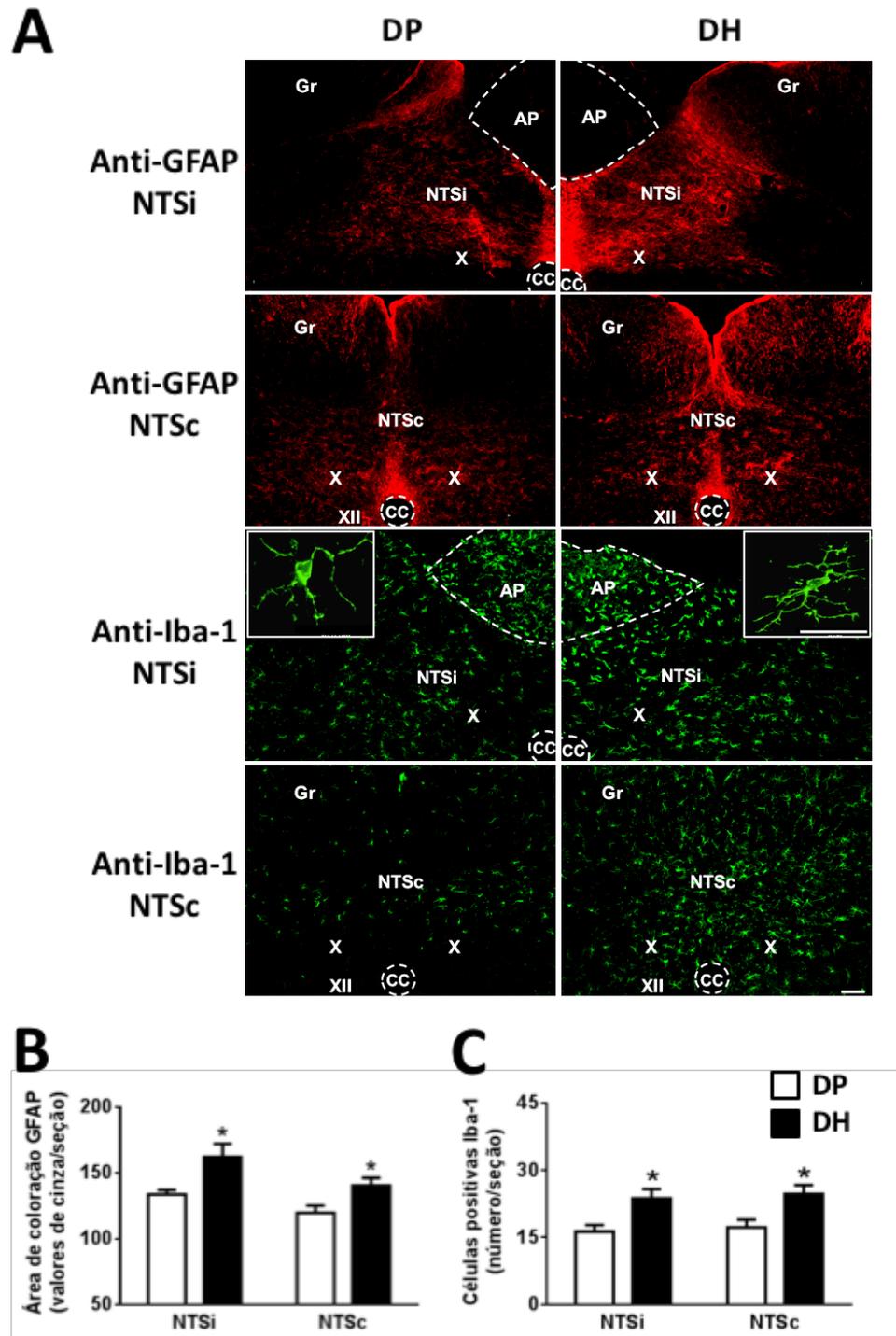


Figura 6. A) Imunoreatividade para GFAP (vermelho) e Iba-1 (verde) no NTS de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Imagens geradas de magnificação de 10x, barra de escala, 100 μ m. Em destaque, imagens geradas a partir de magnificação de 40x, barra de escala, 30 μ m. B) Quantificação da área de coloração positiva ao GFAP/seção (valores de cinza) no NTS, e C) Número de células positivas para Iba-1/seção no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Teste *t* de Student, * diferente de DP; $P < 0,05$ ($n = 7$). NTSi, núcleo do trato solitário intermediário; NTSc, núcleo do trato solitário comissural; AP, área postrema; CC, canal central; Gr, núcleo grácil; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso.

5.5 Efeitos do bloqueio do receptor AT₁ no NTS sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta hiperlipídica

Tendo em vista que com 6 semanas de DH observamos maior expressão do mRNA do receptor AT₁ no NTS, avaliamos, neste protocolo a participação desse receptor nas alterações cardiovasculares induzidas pela DH. Para isso realizamos o bloqueio do receptor AT₁ no NTS de ratos alimentados com DH por 6 semanas.

O grupo DH apresentou maior PAM basal que o DP (DH-antes LOS: 115 ± 2, vs. DP-antes LOS: 105 ± 2 mmHg); [F(1,18) = 7,05; P < 0,05], sem alterações na FC (DH-pré LOS: 308 ± 6 vs. DP- pré LOS: 300 ± 7 bpm); [F(1,18) = 0,11; P = 0,74]. O bloqueio dos receptores AT₁ no NTS promoveu queda na PAM no grupo DH após 30 minutos da microinjeção bilateral de losartan (DH-após LOS: 107 ± 2 vs. DH-pré LOS: 115 ± 2 mmHg), **Figura 7A**, sem causar alterações significantes na FC (DH-após LOS: 299 ± 5 vs. DH-pré LOS: 308 ± 6 bpm), **Figura 7B**. Por outro lado, no grupo DP, o bloqueio do receptor AT₁ no NTS não alterou a PAM (DP-após LOS: 102 ± 3 vs. DP-pré LOS: 105 ± 2 mmHg) ou a FC (DP-após LOS: 312 ± 10 vs. DP-pré LOS: 300 ± 7 bpm) (ambos P > 0,05), **Figuras 7A e 7B**.

A Tabela 4 mostra que os animais que tiveram as cânulas implantadas em áreas adjacentes ao NTS não apresentaram redução na PAM [F(1,16) = 0,24; P = 0,62] ou FC [F(1,16) = 4,15; P = 0,058] após a microinjeção bilateral de losartan.

O bloqueio do receptor AT₁ no NTS restabeleceu a bradicardia reflexa que estava atenuada nos animais alimentados com DH (slope: DH-pré LOS: -0,81 ± 0,13 vs. DP-pré LOS: -1,95 ± 0,16; DH-após LOS: -1,29 ± 0,17 vs. DP-após LOS: -1,80 ± 0,17 bpm/mmHg); [F(1,18) = 27,36; P < 0,05], **Figura 7C**. Não houve diferença entre os grupos na taquicardia reflexa (slope: DH-pré LOS: -2,87 ± 0,34 vs. DP-pré LOS: -3,97 ± 0,34; DH-após LOS: -3,56 ± 0,73 vs. DP-após LOS: -4,07 ± 0,49 bpm/mmHg); [F(1,18) = 2,40; P = 0,22].

Analisando a variabilidade cardiovascular, observamos que o bloqueio do receptor AT₁ no NTS promoveu uma redução na LF da PAS em ratos alimentados com DH (DH-pré LOS: 9,26 ± 0,85 vs. DP-pré LOS: 4,94 ± 0,64; DH-pós LOS: 6,57 ± 0,67 vs. DP-pós LOS: 4,71 ± 1,01 mmHg²) [F (1,18) = 14,51; P < 0,01], **Figura 8A**. Além disso, houve uma redução da LF do IP (DH-pré LOS: 42 ± 4 vs. DP-pré LOS: 25 ± 4; DH-pós LOS: 30 ± 3 vs. DP-pós LOS: 25 ± 3 un) [F (1,18) = 8,28; P < 0,001] e aumento da HF do IP (DH-pré LOS: 57 ± 4 vs. DP-pré LOS: 75 ± 4; DH-pós LOS: 69 ± 3 vs. DP-pós LOS: 72 ± 4 un) [F (1,18) = 6,03; P < 0,05], resultando em uma redução do balanço simpátovagal (relação LF/HF) do IP em ratos alimentados com DH (DH-pré LOS: 0,83 ± 0,01 vs. DP-pré LOS: 0,39 ± 0,09; DH-pós LOS: 0,57 ± 0,08 vs. DP-pós LOS: 0,37 ± 0,07), [F (1,18) = 8,57; P < 0,05], **Figuras 8B-D**.

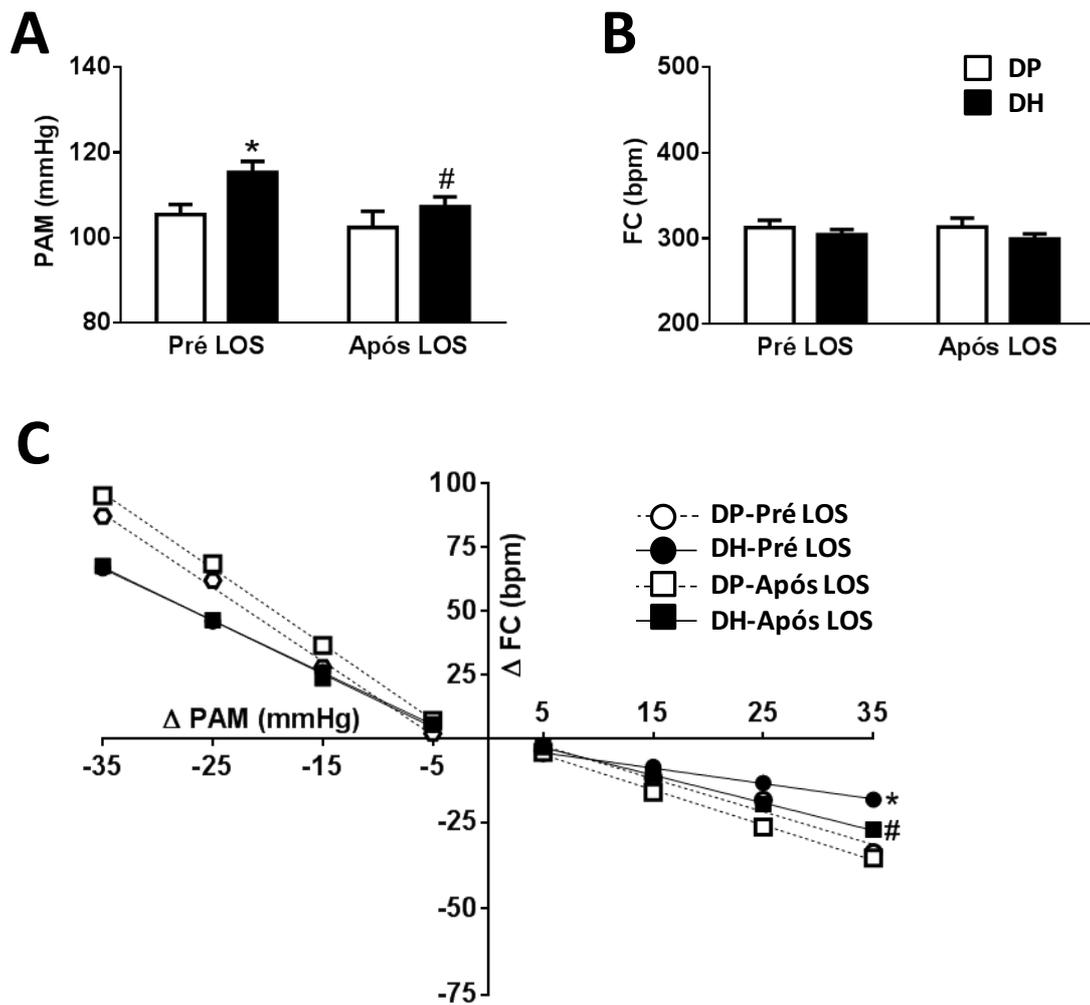


Figura 7. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) pré e após losartan (LOS; 10 $\mu\text{g}/100$ nl) bilateralmente no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-pré LOS; $P < 0,05$. DP (n = 5) e DH (n = 6).

Tabela 4. PAM e FC pré e após a microinjeção bilateral de losartan (LOS) em áreas adjacentes ao NTS em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).

	DP-pré LOS	DH-pré LOS	DP-após LOS	DH-após LOS
PAM (mmHg)	103 ± 1	111 ± 1	108 ± 5	109 ± 1
FC (bpm)	300 ± 16	291 ± 10	353 ± 23	299 ± 10*

Todos os valores estão apresentados como média ± EPM, ANOVA de duas vias seguida do teste Student-Newman-Keuls test, * diferente de DP-após LOS; P < 0,05. DP (n = 4) e DH (n = 6). PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca.

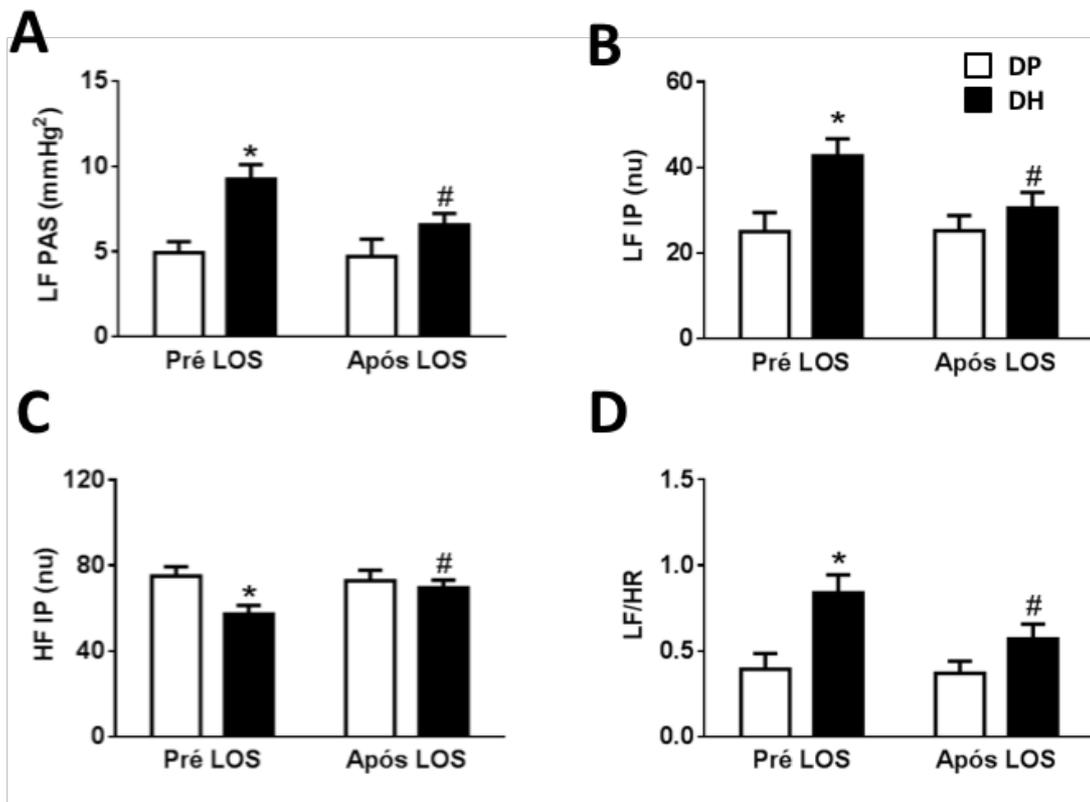


Figura 8. Alterações na **A)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) pré e após losartan (LOS; 10 μ g/100 nl) bilateralmente no NTS. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-pré LOS; $P < 0,05$. DP (n = 5) e DH (n=6).

5.6 Microinjeções no NTS intermediário

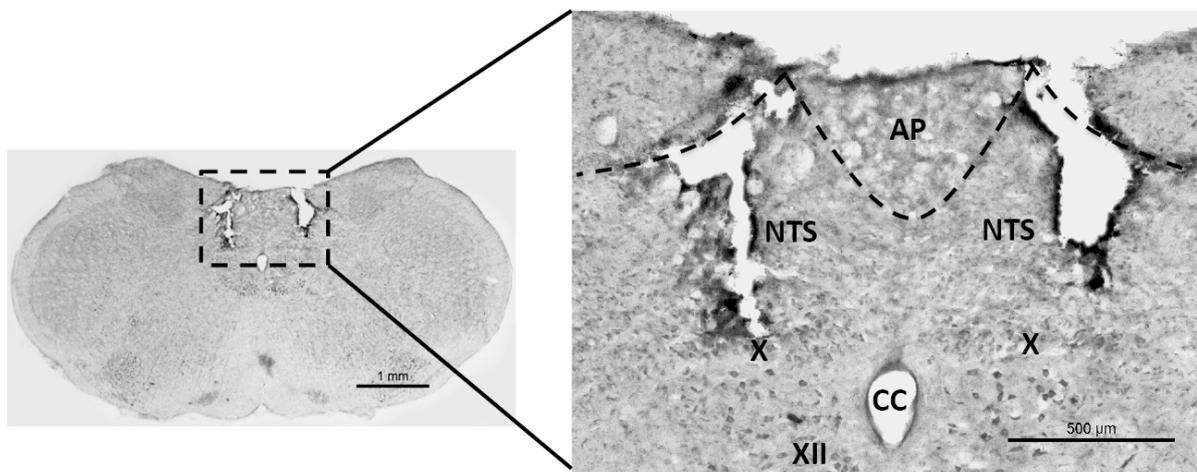


Figura 9. Fotomicrografia de corte coronal do bulbo de um animal representativo do grupo, demonstrando o local das microinjeções bilaterais no NTS intermediário. Barra de escala = 500 µm. NTS, NTS intermediário; AP, área postrema; CC, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso.

5.7 Efeitos da super-expressão de receptores AT₂ no NTS sobre as alterações na adiposidade, metabolismo e sistema cardiovascular induzidas pela dieta hiperlipídica

5.7.1 *Efeitos da super-expressão de receptores AT₂ no NTS sobre a massa corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica*

Após 6 semanas de DH (3 semanas após injeção do vetor viral) tanto os animais com vetor DH-AT₂ ou DH-eGFP apresentaram maior massa corporal [F(3,21) = 10,17; P < 0,05], bem como maior peso relativo dos tecidos adiposos EPI [F(3,21) = 18,00; P < 0,01], RET [F(3,21) = 32,92; P < 0,0001] e MES [F(3,21) = 17,19; P < 0,01] quando comparados aos respectivos grupos controle tratados com DP (**Tabela 5**).

Além disso, ambos os grupos alimentados com DH exibiram maiores níveis de colesterol total [F(3,21) = 18,47; P < 0,001], TGL [F(3,21) = 13,10; P < 0,01] e leptina [F(3,15) = 24,58; P < 0,0001] no sangue. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nos níveis de HDL [F(3,21) = 1,04; P = 0,40], **Tabela 5**.

Tabela 5. Adiposidade e parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂).

	DP-eGFP	DH-eGFP	DP-AT₂	DH-AT₂
Massa corporal (g)	387 ± 13 (n = 6)	471 ± 9* (n = 7)	393 ± 12 (n = 5)	440 ± 13* (n = 7)
Tecido adiposo epididimal (g/100 g massa corporal)	0,35 ± 0,03 (n = 6)	0,91 ± 0,07* (n = 7)	0,45 ± 0,06 (n = 5)	0,80 ± 0,06* (n = 7)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g massa corporal)	0,43 ± 0,03 (n = 6)	1,18 ± 0,08* (n = 7)	0,47 ± 0,05 (n = 5)	1,16 ± 0,08* (n = 7)
Tecido adiposo mesentérico (g/100 g massa corporal)	0,44 ± 0,05 (n = 6)	0,83 ± 0,06* (n = 7)	0,39 ± 0,03 (n = 5)	0,70 ± 0,03* (n = 7)
Colesterol total (mg/dl)	64 ± 5,7 (n = 6)	93 ± 2,5* (n = 7)	60 ± 2,4 (n = 5)	86 ± 3,23* (n = 7)
HDL (mg/dl)	38 ± 2,3 (n = 6)	38 ± 3,3 (n = 7)	34 ± 2,2 (n = 5)	40 ± 1,5 (n = 7)
TGL (mg/dl)	54 ± 4,4 (n = 6)	79 ± 2,9* (n = 7)	51 ± 3,9 (n = 5)	84 ± 6,1* (n = 7)
Leptina (ng/ml)	0,48 ± 0,12 (n = 4)	1,89 ± 0,20* (n = 6)	0,39 ± 0,05 (n = 4)	2,55 ± 0,28* (n = 5)

Todos os valores estão apresentados como média ± EPM, ANOVA de uma via seguida do teste Student-Newman-Keuls test, * diferente dos grupos DP; P < 0,05. HDL: lipoproteína de alta densidade; TGL: triacilgliceróis, Kitt (%/min): percentagem de declínio por minuto da concentração de glicose no plasma.

5.7.2 *Efeitos da super-expressão de receptores AT₂ no NTS sobre a PAM, FC e barorreflexo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica*

Foi observado que a PAM dos ratos DH foi maior do que à observada nos ratos DP a partir da 3^a semana da dieta [$F(3,140) = 15,12$; $P < 0,001$], independente da transdução gênica no NTS. Ou seja, a super-expressão de receptores AT₂, no NTS de ratos DH não promoveu redução da PAM. No ciclo escuro, exceto na semana 3^a semana após o início da DH, não foram encontradas diferenças significativas ao longo das semanas na PAM entre os grupos experimentais [$F(3,140) = 9,82$; $P < 0,05$], **Figuras 10A e 10C**.

Com relação a FC, a DH induziu um aumento significativo nesta variável a partir da 1^a - 2^a semana após o início da DH [$F(3,140) = 34,62$; $P < 0,001$]. Porém, diferente da PAM, uma semana após a transfecção viral, observamos que no grupo DH-AT₂ houve uma redução da FC à valores semelhantes aos animais DP ($P < 0,05$), **Figura 10B e 10D**.

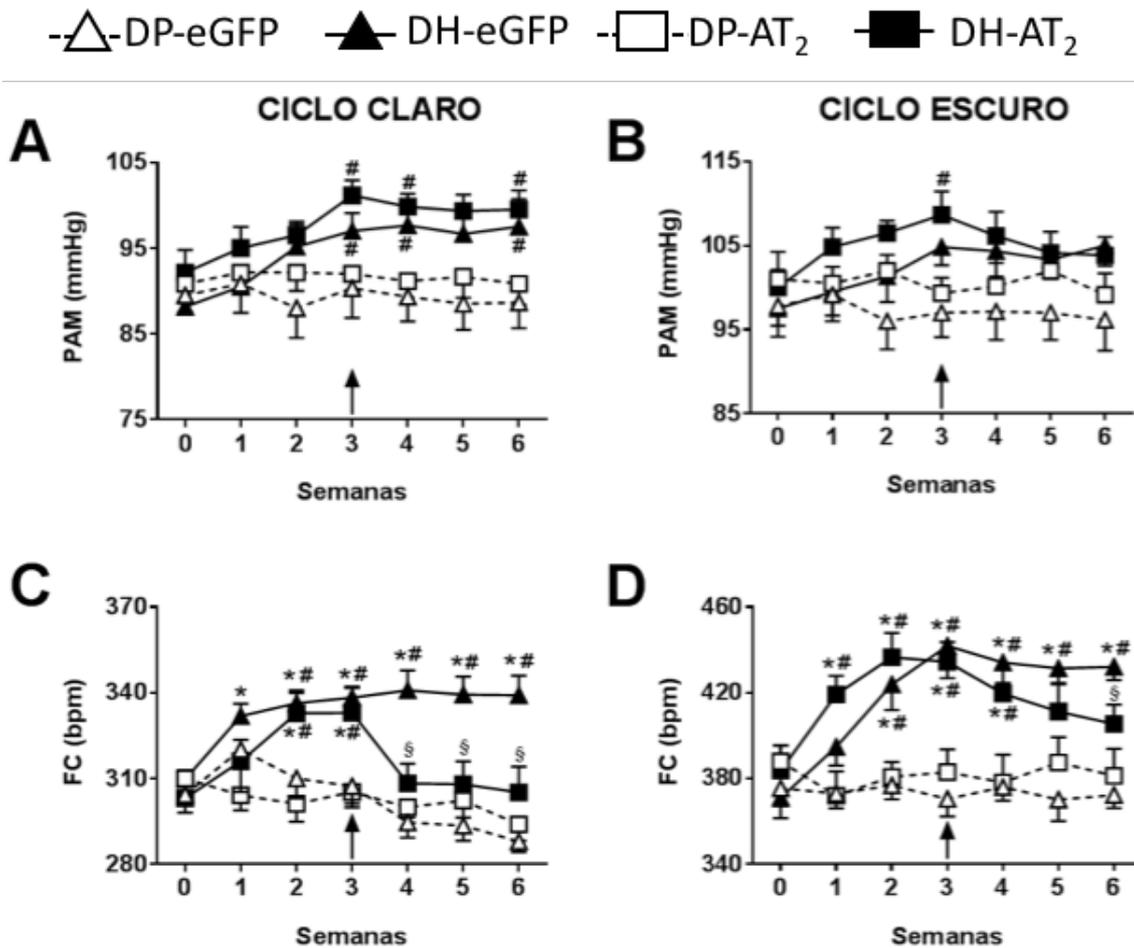


Figura 10. A) Pressão arterial média (PAM) e C) frequência cardíaca (FC) no ciclo claro, e B) PAM e D) FC no ciclo escuro em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Momento da injeção está indicado pela seta. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de basal, # diferente de DP, § diferente de DH-eGFP; $P < 0,05$. DP-eGFP, DH-eGFP e DP-AT₂ (n = 6), DH-AT₂ (n = 6).

Em outro grupo experimental, onde foi feita a medida da PAM e FC 6 semanas após a DH, ou seja, 3 semanas após a transfecção viral, observamos que os aumentos da PAM em ratos DH comparados com seu grupo controle (DH-eGFP: 111 ± 1 , vs. DP-eGFP: 102 ± 1 mmHg) [$F(3,21) = 4,99$; $P < 0,01$], não foram alterados pela super-expressão de AT₂ no NTS (DH-AT₂: 106 ± 3 , vs. DH-eGFP: 111 ± 1 mmHg, $P = 0,24$), **Figura 11A**. A FC também foi maior nos animais DH-eGFP comparado ao grupo alimentado com DP (379 ± 6 , vs. DP-eGFP: 346 ± 4 bpm) e a super-expressão do receptor AT₂ no NTS atenuou esse aumento (DH-AT₂: 340 ± 5 , vs. DH-eGFP: 379 ± 6 bpm) [$F(3,21) = 16,68$; $P < 0,001$], **Figura 11B**. A super-expressão de receptores AT₂ no NTS não alterou a PAM de animais alimentados com DP (DP-AT₂: 99 ± 3 , vs. DP-eGFP: 102 ± 1 mmHg; $P = 0,097$), tampouco a FC (DP-AT₂: 325 ± 3 , vs. DP-eGFP: 346 ± 4 mmHg; $P = 0,058$), **Figura 11A e B**.

A atenuação da bradicardia reflexa observada em ratos DH-eGFP ($-0,78 \pm 0,09$, vs. DP-eGFP: $-1,31 \pm 0,09$ bpm/mmHg) [$F(3,21) = 4,39$; $P < 0,05$] foi restaurada após a super-expressão do receptor AT₂ no NTS (DH-AT₂: $-1,19 \pm 0,06$ vs. DH-eGFP: $-0,78 \pm 0,23$ bpm/mmHg, $P < 0,05$). Nos grupos com DP, não houve alteração na bradicardia reflexa com a super-expressão de receptores AT₂ no NTS ($P = 0,86$). Não houve diferença entre os grupos na taquicardia reflexa (slope: DH-eGFP: $-2,86 \pm 0,18$ vs. DP-eGFP: $-2,54 \pm 0,12$; DH-AT₂: $-3,18 \pm 0,25$ vs. DP-AT₂: $-2,66 \pm 0,15$ bpm/mmHg) [$F(3,21) = 2,04$; $P = 0,13$], **Figura 11C**.

Analisando a variabilidade cardiovascular, o aumento na LF da PAS nos ratos DH-eGFP (DH-eGFP: $11,33 \pm 1,35$, vs. DP-eGFP: $4,29 \pm 0,40$ mmHg²), foi atenuado no grupo DH-AT₂ (DH-AT₂: $8,15 \pm 0,90$, vs. DP-AT₂: $4,05 \pm 0,68$ mmHg²), [$F(3,21) = 12,64$; $P < 0,05$], **Figura 12A**. O aumento no LF do IP dos ratos DH (DH-GFP: $34,71 \pm 4,17$, vs. DP-GFP: $22,67 \pm 0,98$ um) [$F(3,21) = 4,82$; $P < 0,05$] e do balanço simpatovagal (relação LF/HF; DH-eGFP: $0,60 \pm 0,10$, vs. DP-eGFP: $0,31 \pm 0,01$) [$F(3,21) = 4,73$; $P < 0,05$], foi totalmente bloqueado em ratos DH-AT₂ (DH-AT₂: $24,86 \pm 1,26$, vs. DP-AT₂: $21,80 \pm 2,93$ un) e (DH-AT₂: $0,36 \pm 0,03$, vs. DP-AT₂: $0,30 \pm 0,05$), respectivamente. A redução do HF do IP nos ratos DH (DH-eGFP: $65,29 \pm 4,17$, vs. DP-eGFP: $77,67 \pm 1,02$ un) [$F(3,21) = 4,92$; $P < 0,05$], foi bloqueada nos ratos DH-AT₂ ($75,14 \pm 1,26$, vs. DP-AT₂: $78,20 \pm 2,93$ un), **Figuras 12B-D**.

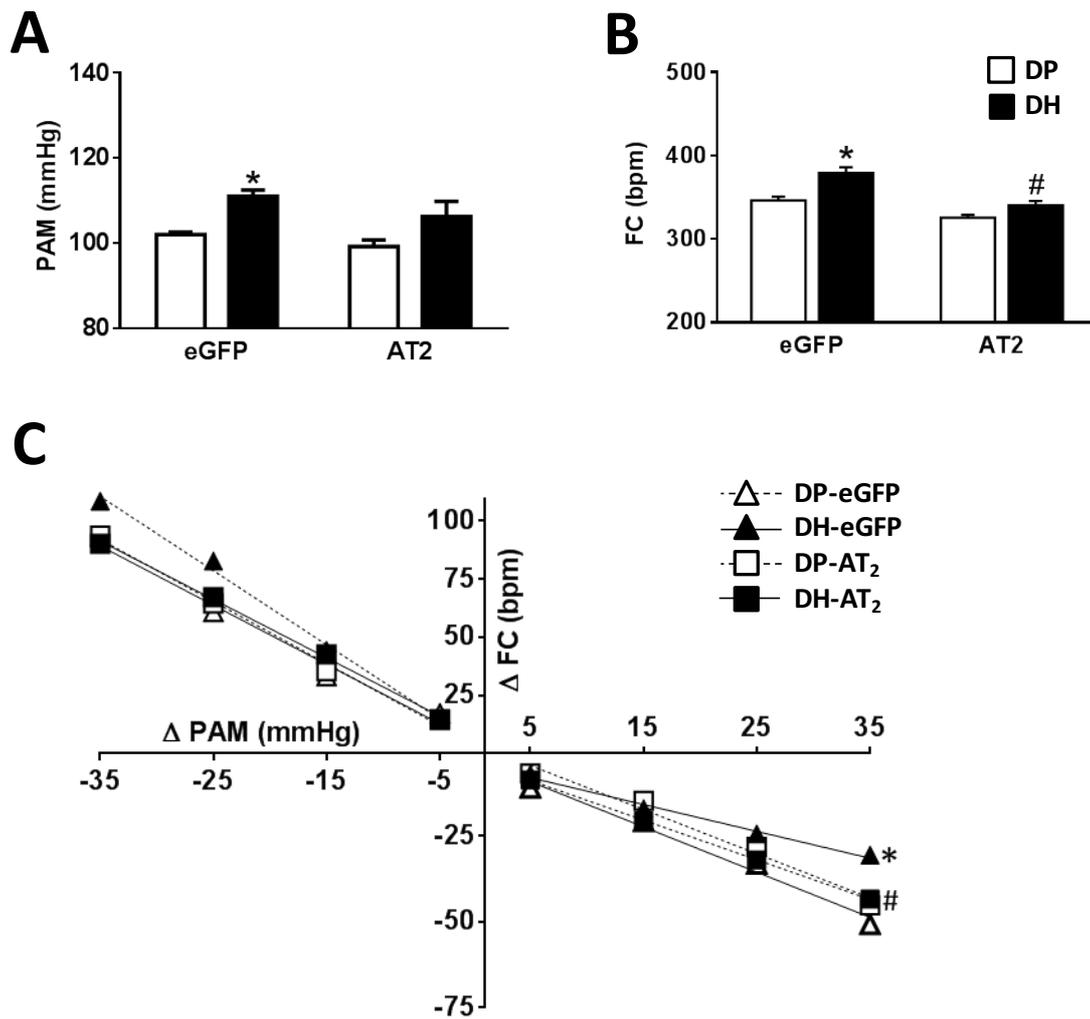


Figura 11. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 6), DH-eGFP (n = 7), DP-AT₂ (n = 5) e DH-AT₂ (n = 7).

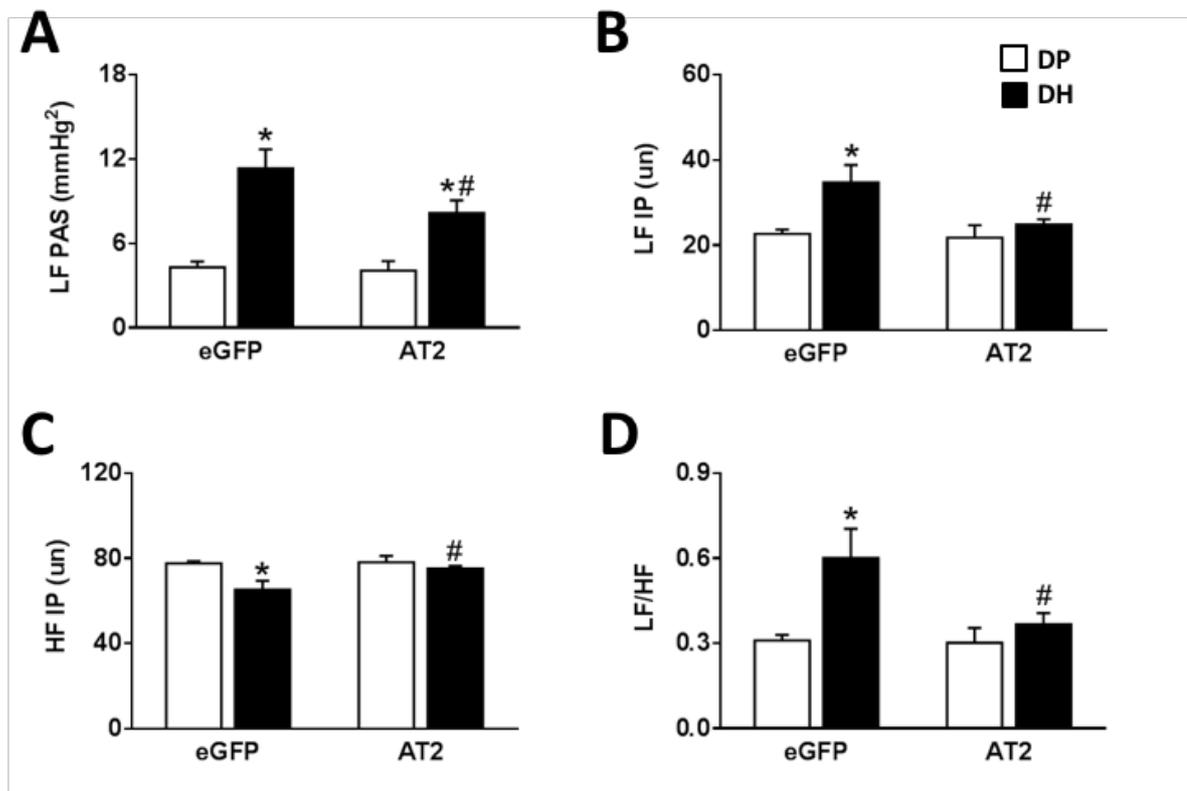


Figura 12. Alterações na **A**) potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B**) potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C**) potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D**) relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; $P < 0,05$. DP-eGFP (n = 6), DH-eGFP (n = 7), DP-AT₂ (n = 5) e DH-AT₂ (n = 7).

5.7.3 Efeitos da super-expressão de AT_2 no NTS sobre a expressão do RNAm de componentes do SRA e de citocinas no NTS de ratos alimentados com dieta hiperlipídica

O grupo DH-eGFP apresentou uma tendência em aumentar a expressão do RNAm do receptor AT_1 (DH-eGFP: $1,31 \pm 0,20$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,02$ número de vezes), [F(3,14) = 2,97; P = 0,06] e da enzima ECA (DH-eGFP: $1,46 \pm 0,43$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,07$ número de vezes), [F(3,14) = 1,16; P = 0,35], mas as diferenças não foram significativas. A super-expressão do receptor AT_2 não alterou a expressão do RNAm do receptor AT_1 (DH- AT_2 $0,83 \pm 0,11$, vs. DP- AT_2 : $0,80 \pm 0,10$) ou ECA (DH- AT_2 $0,83 \pm 0,05$, vs. DP- AT_2 : $0,97 \pm 0,13$) no NTS em nenhum grupo experimental.

Como era esperado, a expressão do RNAm do receptor AT_2 no NTS foi maior nos grupos AT_2 (DH- AT_2 $1,70 \pm 0,08$, vs. DH-eGFP: $0,99 \pm 0,08$; DP- AT_2 $1,63 \pm 0,11$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,08$ número de vezes), [F(3,14) = 18,05; P < 0,001]. A super-expressão de AT_2 no NTS promoveu maior expressão do receptor Mas no NTS em animais alimentados com DP e DH (DH- AT_2 $1,47 \pm 0,19$, vs. DH-eGFP: $0,90 \pm 0,11$; DP- AT_2 : $1,87 \pm 0,13$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,04$ número de vezes), [F(3,14) = 12,17; P < 0,05]. Não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão do RNAm da ECA2 no NTS (DH- AT_2 $1,39 \pm 0,23$, vs. DH-eGFP: $1,13 \pm 0,13$; DP- AT_2 : $1,57 \pm 0,18$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,06$ número de vezes), [F(3,14) = 12,17; P < 0,05], **Figura 13**.

Animais DH-eGFP apresentaram maior expressão do RNAm de TNF- α no NTS comparado ao grupo controle (DP-eGFP) e a super-expressão de AT_2 no NTS atenuou essa resposta (DH-eGFP: $1,42 \pm 0,13$, vs. DH- AT_2 : $1,03 \pm 0,08$), enquanto que no grupo DP a super-expressão de AT_2 não alterou a expressão desta citocina (DP- AT_2 : $1,02 \pm 0,07$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,06$ número de vezes) [F(3,14) = 4,38; P < 0,05]. Não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão do RNAm da IL-6 (DH-eGFP: $1,22 \pm 0,16$, vs. DP-eGFP: $1,00 \pm 0,07$; DH- AT_2 : $1,14 \pm 0,19$, vs. DP- AT_2 : $1,57 \pm 0,25$ número de vezes) [F(3,14) = 1,92; P = 0,17] no NTS, **Figura 14**.

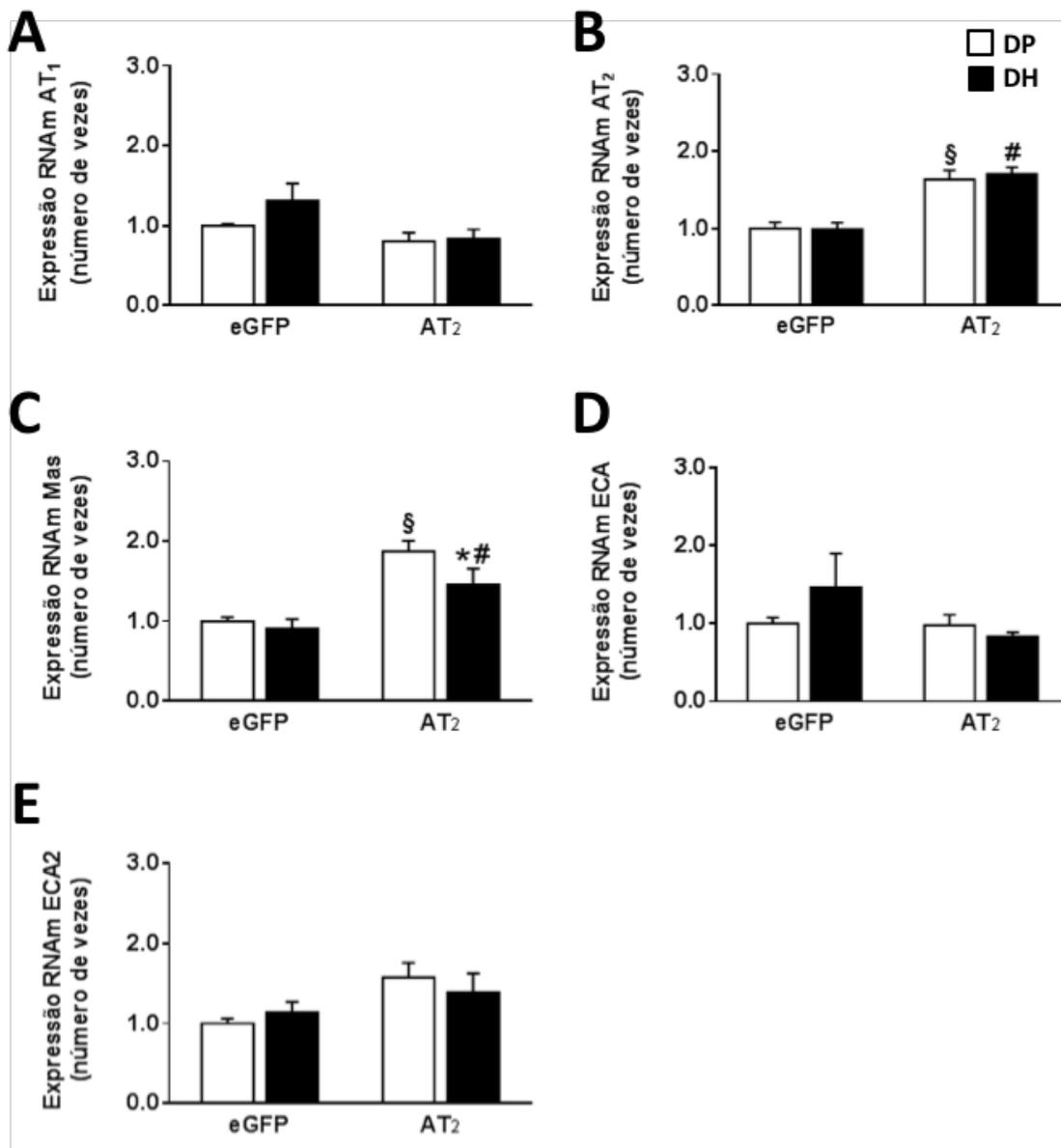


Figura 13. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA) **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; § diferente de DP-eGFP; P < 0,05. DP-eGFP (n = 4), DH-eGFP (n = 5), DP-AT₂ (n = 4) e DH- AT₂ (n = 4).

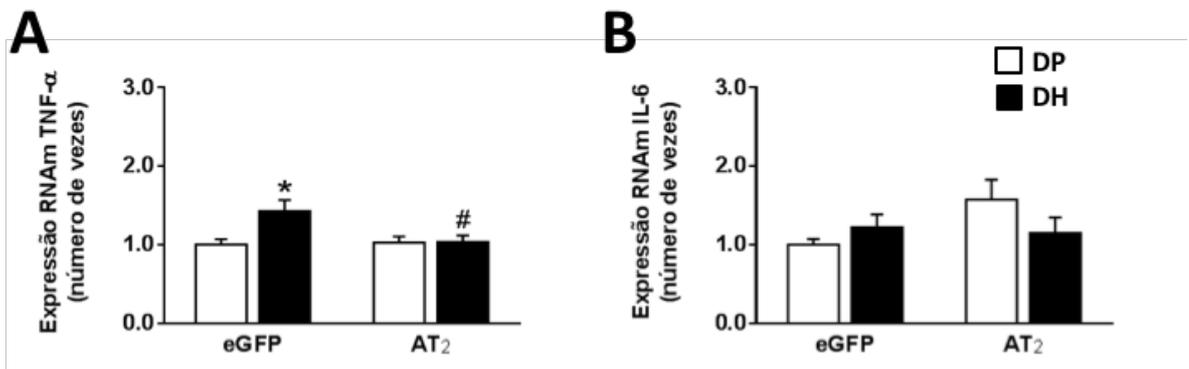


Figura 14. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** fator de necrose tumoral (TNF- α), e **B)** interleucina 6 (IL-6) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) com transdução no núcleo do trato solitário de eGFP (DP-eGFP e DH-eGFP) ou AT₂ (DP-AT₂ e DH-AT₂). Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de DH-eGFP; $P < 0,05$. DP-eGFP (n = 4), DH-eGFP (n = 5), DP-AT₂ (n = 4) e DH-AT₂ (n = 4).

5.8 Efeitos do treinamento de força sobre as alterações na adiposidade, metabolismo e sistema cardiovascular induzidas pela dieta hiperlipídica

5.8.1 Efeitos do treinamento de força sobre a massa corporal e CCVM em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

A massa corporal foi medida semanalmente e a CCVM foi ajustada a cada duas semanas para garantir que a intensidade do exercício fosse mantida entre 50-60% durante as 10 semanas de treinamento de força (TF) e para comparar a intensidade relativa entre os grupos DP e DH. A massa corporal inicial foi similar entre todos os grupos experimentais e todos os grupos apresentaram aumento similar na massa corporal até a 8^a. semana de TF (5 semanas de DH). Após 9 semanas de TF (6 semanas de DH) o grupo SED-DH apresentou maior massa corporal quando comparado ao grupo SED-DP, após 10 semanas de TF (7 semanas de DH) ambos os grupos alimentados com DH (SED-DH e TF-DH) apresentaram maior massa corporal quando comparados aos respectivos grupos controle (SED-SD e TF-SD) [F(3,352) = 16,94; P < 0,0001], **Figura 15A**.

A CCVM foi similar entre todos os grupos no início do treinamento (semana 0). O TF aumentou a CCVM igualmente nos grupos DP e DH após 4 semanas de treinamento e até o final do período experimental [F(3,80) = 72,18; P < 0,0001], **Figura 15B**. O número de escaladas por sessão de TF não foi diferente entre os grupos (TF-DH: 16,8 ± 0,3 vs. TF-DP: 16,9 ± 0,3 escaladas por sessão) [F(1,232) = 1,05; P = 0,30], **Figura 15C**.

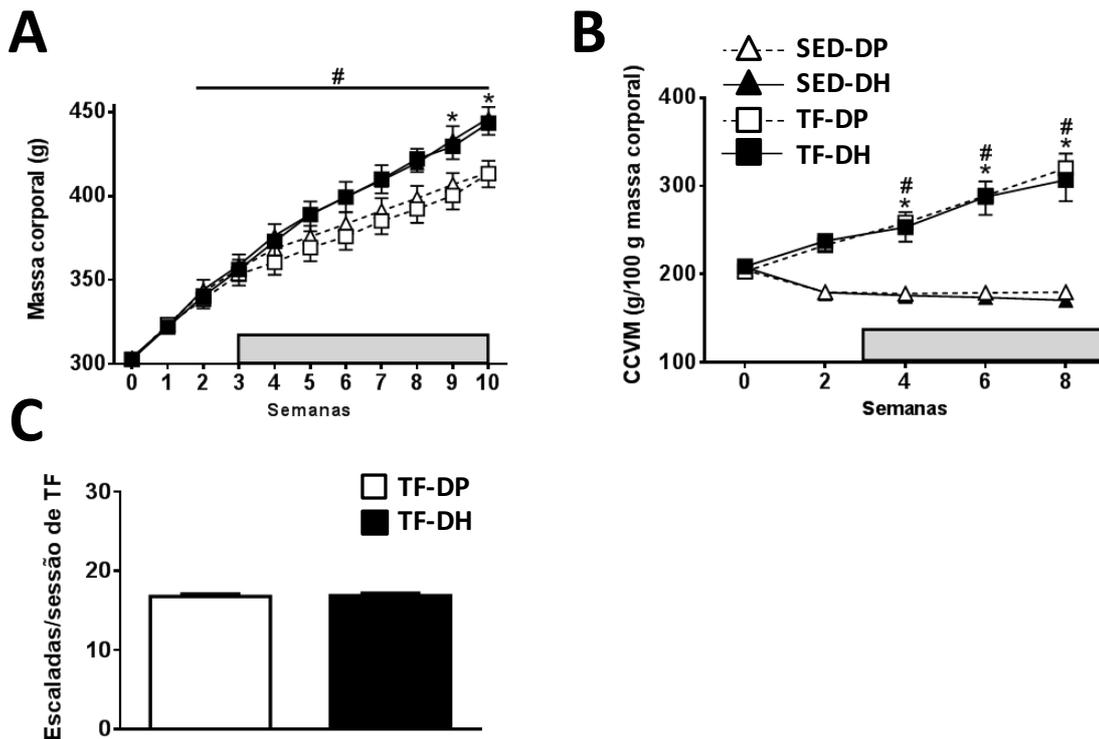


Figura 15. A) Massa corporal, B) capacidade de carregamento voluntária máxima (CCVM), e C) média do número de escadas por sessão de treinamento de força em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. A barra indica o período de administração da DH. Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (Figuras A e B); Teste *t* de Student (figura C). * diferente dos grupos DP; # Diferente da semana 0; $P < 0,05$. Em A) ($n = 9$) em todos os grupos e, em B) e C) ($n = 5$) em todos os grupos.

5.8.2 *Efeitos do treinamento de força sobre a adiposidade e alterações metabólicas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica*

Após 10 semanas de TF (7 semanas de DH), ambos os grupos alimentados com DH exibiram maior peso relativo dos tecidos adiposos EPI, RET e MES [$F(3,24) = 7,07$, $P < 0,01$; $F(3,24) = 16,90$, $P < 0,0001$; e $F(3,24) = 9,04$, $P < 0,001$, respectivamente], **Tabela 6**. Os níveis de colesterol total [$F(3,16) = 8,24$; $P < 0,01$] TGL [$F(3,16) = 5,86$; $p < 0,01$] no sangue também foram maiores nos grupos alimentados com DH sedentários. O TF preveniu o aumento do colesterol total em ratos alimentados com DH (**Tabela 6**).

O grupo SED-DH apresentou maior glicemia de jejum [$F(3,28) = 3,20$, $P < 0,05$] e níveis de insulina plasmática [$F(3,20) = 8,34$, $P < 0,001$], bem como menor sensibilidade à insulina [$F(3,31) = 4,84$, $P < 0,01$]. O TF preveniu o aumento da glicemia e a redução da sensibilidade à insulina e diminuiu discretamente os níveis de insulina (não diferente estatisticamente), **Tabela 6**.

Tabela 6. Adiposidade e medidas plasmáticas em ratos sedentários alimentados com dieta padrão (SED-DP), ratos sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (SED-DH), ratos treinados em força alimentados com dieta padrão (TF-DP), e ratos treinados em força alimentados com dieta hiperlipídica (TF-DH)

	SED-DP	SED-DH	TF-DP	TF-DH
Tecido adiposo epididimal (g/100 g massa corporal)	0,40 ± 0,05 (n = 7)	0,68 ± 0,09* (n = 7)	0,35 ± 0,01 (n = 8)	0,62 ± 0,05* (n = 10)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g massa corporal)	0,45 ± 0,04 (n = 7)	1,02 ± 0,14* (n = 7)	0,49 ± 0,14 (n = 8)	1,20 ± 0,08* (n = 10)
Tecido adiposo mesentérico (g/100 g massa corporal)	0,40 ± 0,05 (n = 7)	0,65 ± 0,08* (n = 7)	0,41 ± 0,03 (n = 8)	0,76 ± 0,05* (n = 10)
Colesterol total (mg/dl)	55 ± 3,4 (n = 5)	107 ± 14,1* (n = 5)	64 ± 3,1 (n = 5)	80 ± 5,6 [#] (n = 5)
HDL (mg/dl)	31 ± 2,8 (n = 5)	31 ± 3,0 (n = 5)	34 ± 3,7 (n = 5)	32 ± 3,2 (n = 5)
TGL (mg/dl)	46 ± 1,3 (n = 5)	70 ± 4,5* (n = 5)	57 ± 4,5 (n = 5)	56 ± 4,6 (n = 5)
Glicemia (mg/dl)	94 ± 3 (n = 8)	106 ± 2* (n = 8)	96 ± 4 (n = 9)	95 ± 2 [#] (n = 10)
Kitt (%/min)	4,62 ± 0,33 (n = 8)	3,35 ± 0,26* (n = 8)	5,01 ± 0,46 (n = 9)	5,17 ± 0,35 [#] (n = 10)
Insulina (ng/ml)	0,63 ± 0,17 (n = 6)	1,45 ± 0,11* (n = 6)	0,61 ± 0,13 (n = 6)	1,13 ± 0,13* (n = 6)

Todos os valores estão apresentados como média ± EPM, Análise de variância de uma via seguida do teste Student-Newman-Keuls test, * Diferente dos grupos DP; # Diferente de SED-DH; P < 0,05. HDL: lipoproteína de alta densidade; TGL: triacilgliceróis, Kitt (%/min): percentagem de declínio por minuto da concentração de glicose no plasma.

5.8.3 Efeitos do treinamento de força sobre a PAM, FC, sensibilidade do barorreflexo e variabilidade cardiovascular em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

Para testar se o TF poderia prevenir as alterações cardiovasculares induzidas pela DH, foram avaliadas a PAM, a FC, a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade cardiovascular. Depois de 10 semanas de TF (7 semanas de DH), os ratos sedentários alimentados com DH exibiram maior PAM (SED-DH: 119 ± 1 , vs. SED-DP: 107 ± 2 mmHg), **Figura 16A**. O TF preveniu o aumento na PAM induzido pela DH (TF-DH: 109 ± 2 mmHg), e não alterou esse parâmetro em ratos alimentados com DP (TF-DP: 106 ± 4 mmHg) [$F(3,28) = 4,46$; $P < 0,05$], **Figura 16A**. O grupo SED-DH também apresentou maior FC (SED-DH: 370 ± 7 , vs. SED-DP: 341 ± 3 bpm). O TF também preveniu essa resposta (TF-DH: 336 ± 11 bpm). Porém o TF não alterou a FC em ratos alimentados com DP (TF-DP: 339 ± 12 bpm) [$F(3,28) = 3,73$; $P < 0,05$], **Figura 16B**.

A bradicardia reflexa em resposta a ativação do barorreflexo foi comprometida em ratos sedentários alimentados com DH (slope: SED-DH: $-1,24 \pm 0,15$, vs. SED-DP: $-2,38 \pm 0,22$ bpm/mmHg). O TF preveniu esse efeito deletério induzido pela DH (slope: TF-DH: $-2,76 \pm 0,23$ bpm/mmHg), sem alterar a resposta de bradicardia reflexa em ratos alimentados com DP (slope TF-DP: $-2,41 \pm 0,19$ bpm/mmHg), [$F(3,24) = 10,02$; $P < 0,001$], **Figura 15C**. A ativação da resposta de taquicardia do barorreflexo foi similar entre todos os grupos (slope: SED-DH: $-3,88 \pm 0,54$, vs. SED-DP: $-4,36 \pm 0,57$; TF-DH: $-4,21 \pm 0,43$, vs. TF-DP: $-4,83 \pm 0,57$ [$F(3,24) = 0,46$; $P = 0,71$], **Figura 16C**.

A análise da variabilidade cardiovascular demonstrou maior LF da PAS no grupo alimentado com DH sedentário (SED-DH: $8,49 \pm 0,59$, vs. SED-DP: $4,96 \pm 0,37$ mmHg²), [$F(3,26) = 4,70$; $P < 0,01$], maior LF do IP [SED-DH: 45 ± 2 , vs. SED-DP: 22 ± 1 un], [$F(3,26) = 14,98$; $P < 0,0001$], maior relação LF/HF do IP (SED-DH: $0,77 \pm 0,07$, vs. SED-DP: $0,29 \pm 0,02$), [$F(3,26) = 18,13$; $P < 0,0001$] e menor HF do IP (SED-DH: 57 ± 2 , vs. SED-DP: 78 ± 2 un), [$F(3,26) = 6,91$; $P < 0,01$]. O TF preveniu as alterações na LF da PAS (RT-HFD: $6,29 \pm 1,06$ mmHg²), LF do IP (TF-DH: 34 ± 3 un), relação LF/HF do IP (TF-DH: $0,58 \pm 0,03$) e HF do IP (TF-DH: 69 ± 5 un) em ratos alimentados com DH (**Figura 17**).

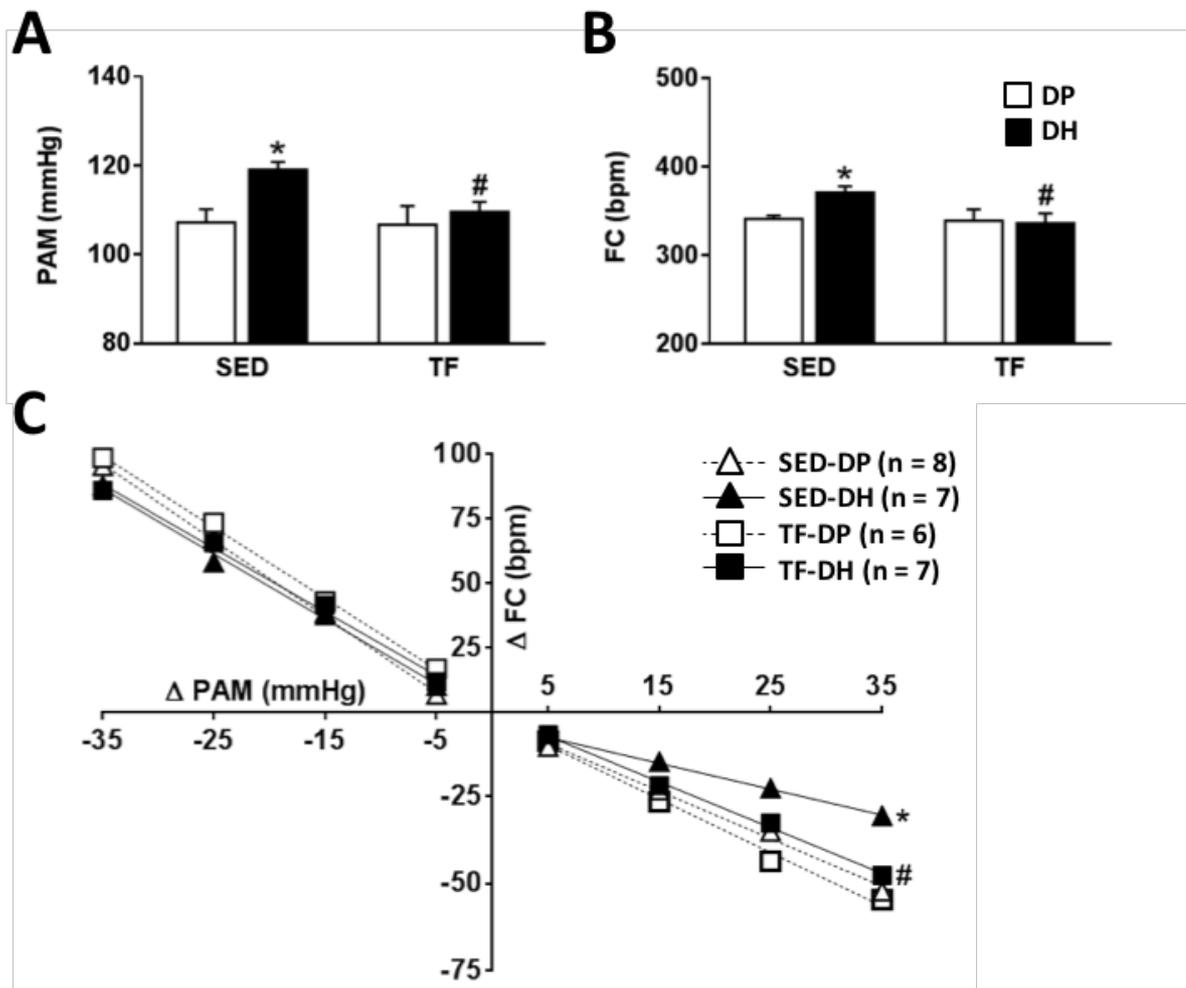


Figura 16. Alterações na **A)** pressão arterial média (PAM), **B)** frequência cardíaca (FC), e **C)** sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; $P < 0,05$. Em A) e B) SED-DP e SED-DH ($n = 9$), TF-DP e TF-DH ($n = 7$).

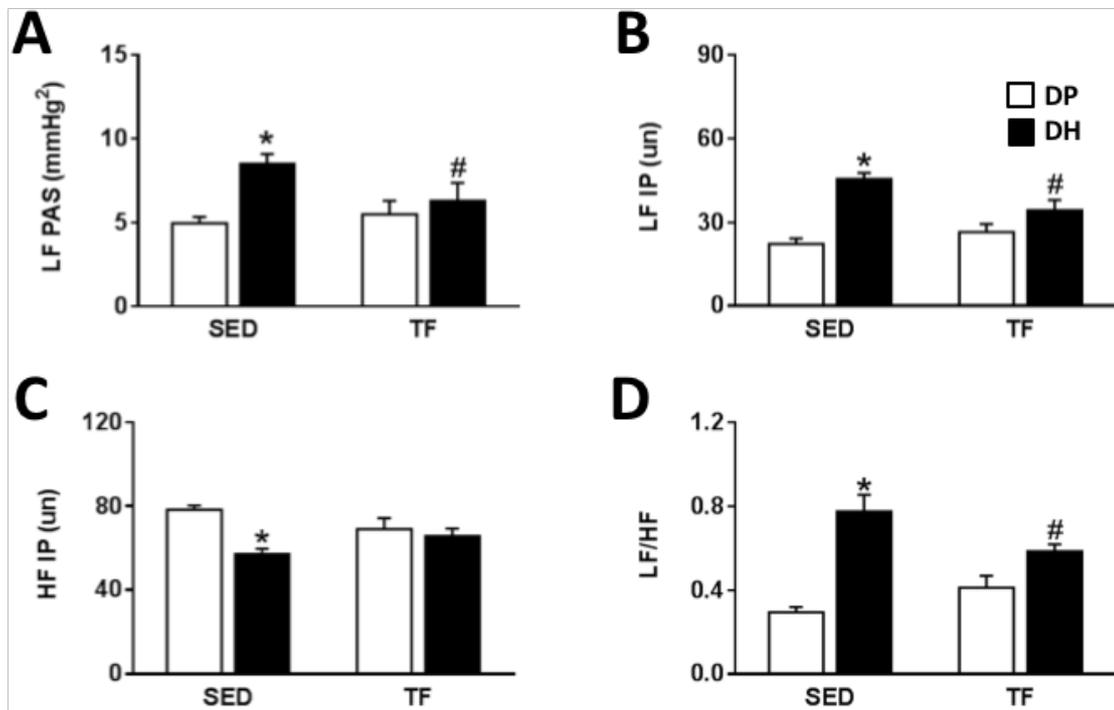


Figura 17. Alterações na **A)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS), **B)** potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP), **C)** potência do espectro da banda de alta frequência (HF) do IP, e **D)** relação LF/HF do IP em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; $P < 0,05$. SED-DP (n = 9), SED-DH, TF-DP e TF-DH (n = 7).

5.8.4 Efeitos de treinamento de força sobre a expressão do RNAm de componentes do SRA e de citocinas no NTS de ratos alimentados com dieta hiperlipídica

Buscando os mecanismos envolvidos nos efeitos positivos induzidos pelo TF no sistema cardiovascular, avaliamos as alterações nos componentes do SRA e de citocinas no NTS de ratos alimentados com DH. Ratos sedentários alimentados com DH apresentaram maior expressão do RNAm do receptor AT_1 (SED-DH: $3,10 \pm 0,12$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,06$ número de vezes), [F(3,13) = 25,69; P < 0,0001] e menor expressão do RNAm do receptor AT_2 no NTS (SED-DH: $0,68 \pm 0,11$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,07$ número de vezes), [F(3,13) = 4,97; P < 0,05]. O TF preveniu a redução na expressão do receptor AT_2 (TF-DH: $1,01 \pm 0,05$ número de vezes), mas não o aumento do receptor AT_1 (TF-DH: $3,68 \pm 0,42$ número de vezes). Em ratos treinados alimentados com DH a expressão do RNAm do receptor Mas no NTS foi maior quando comparada aos animais sedentários alimentados com a mesma dieta (TF-DH: $1,55 \pm 0,19$, vs. SED-DH: $0,70 \pm 0,11$ número de vezes), [F(3,13) = 4,72; P < 0,05]. Em ambos os grupos treinados, a expressão do RNAm da ECA2 no NTS foi maior quando comparados aos respectivos grupos controle (TF-DH: $2,62 \pm 0,23$, vs. SED-DH: $0,89 \pm 0,06$; TF-DP: $3,45 \pm 0,64$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,06$ número de vezes), [F(3,13) = 13,49; P < 0,001]. Não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão do RNAm da enzima ECA no NTS (SED-DH: $1,51 \pm 0,46$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,08$; TF-DH: $1,10 \pm 0,15$, vs. TF-DP: $0,86 \pm 0,05$ número de vezes) [F(3,13) = 1,27; P = 0,32], **Figura 18**.

O grupo sedentário alimentado com DH exibiu maior expressão do RNAm de TNF- α (SED-DH: $1,90 \pm 0,26$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,07$ número de vezes), [F(3,13) = 4,07; P < 0,05] e IL-1 β no NTS (SED-DH: $2,31 \pm 0,13$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,10$ número de vezes), [F(3,13) = 7,53; P < 0,01] e menor expressão do RNAm de IL-10 no NTS (SED-DH: $0,50 \pm 0,04$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,10$ número de vezes), [F(3,13) = 11,30; P = 0,001]. O TF preveniu as alterações na expressão de TNF- α (TF-DH: $1,15 \pm 0,25$ número de vezes), IL-1 β (TF-DH: $1,10 \pm 0,27$ número de vezes) e IL-10 no NTS (TF-DH: $1,04 \pm 0,69$ número de vezes). A expressão do RNAm da IL-6 no NTS foi similar entre os grupos (SED-DH: $1,55 \pm 0,40$, vs. SED-DP: $1,00 \pm 0,15$; TF-DH: $0,82 \pm 0,26$, vs. TF-DP: $0,87 \pm 0,14$ número de vezes) [F(3,13) = 1,57; P = 0,24] **Figura 19**.

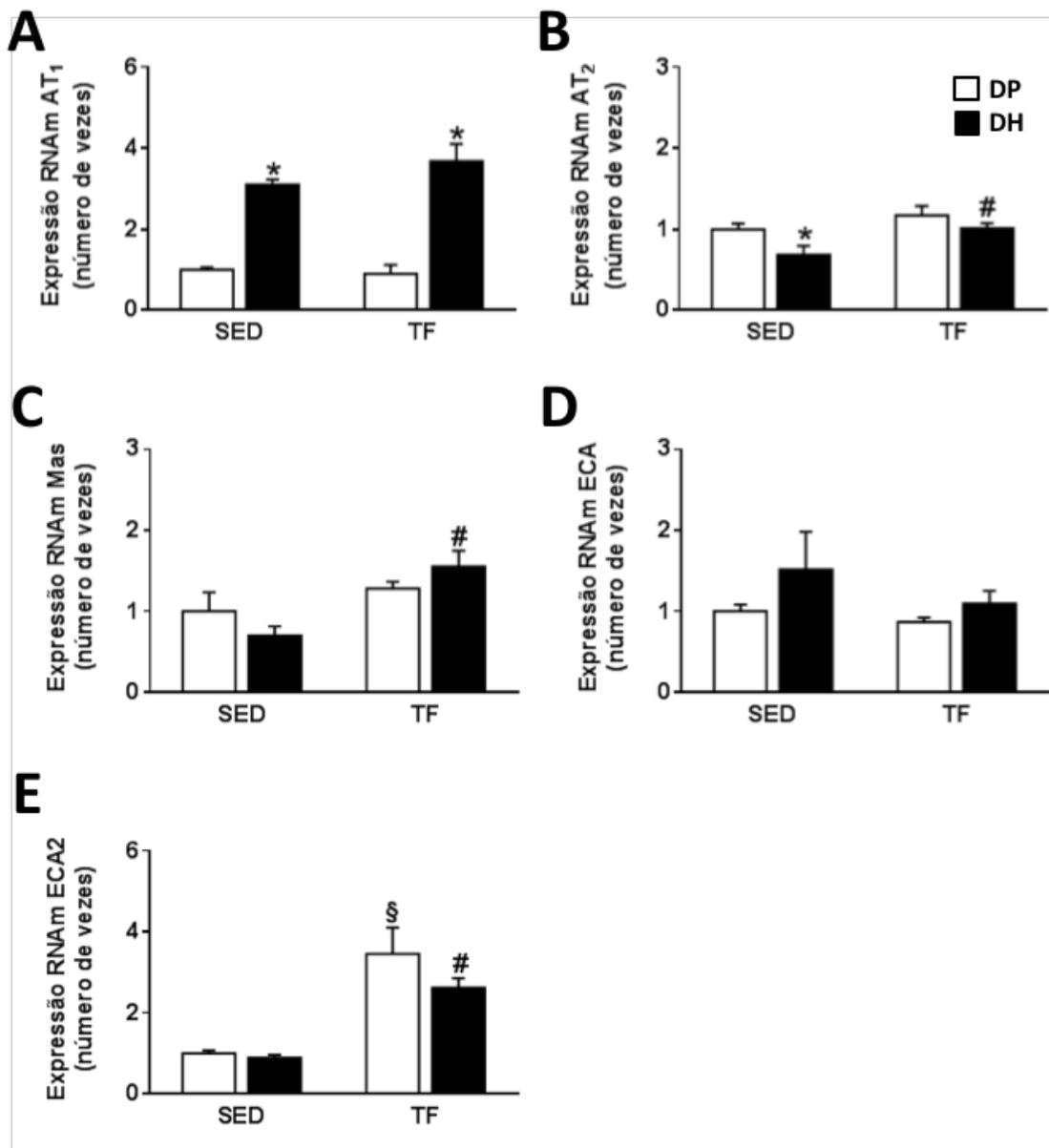


Figura 18. Alterações na expressão do RNAm no NTS do **A)** receptor AT₁, **B)** receptor AT₂, **C)** receptor Mas, **D)** enzima conversora de angiotensina (ECA), e **E)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média ± erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; § diferente de SED-DP; P < 0,05. SED-DP, SED-DH e TF-DP (n = 4), TF-DH (n = 5).

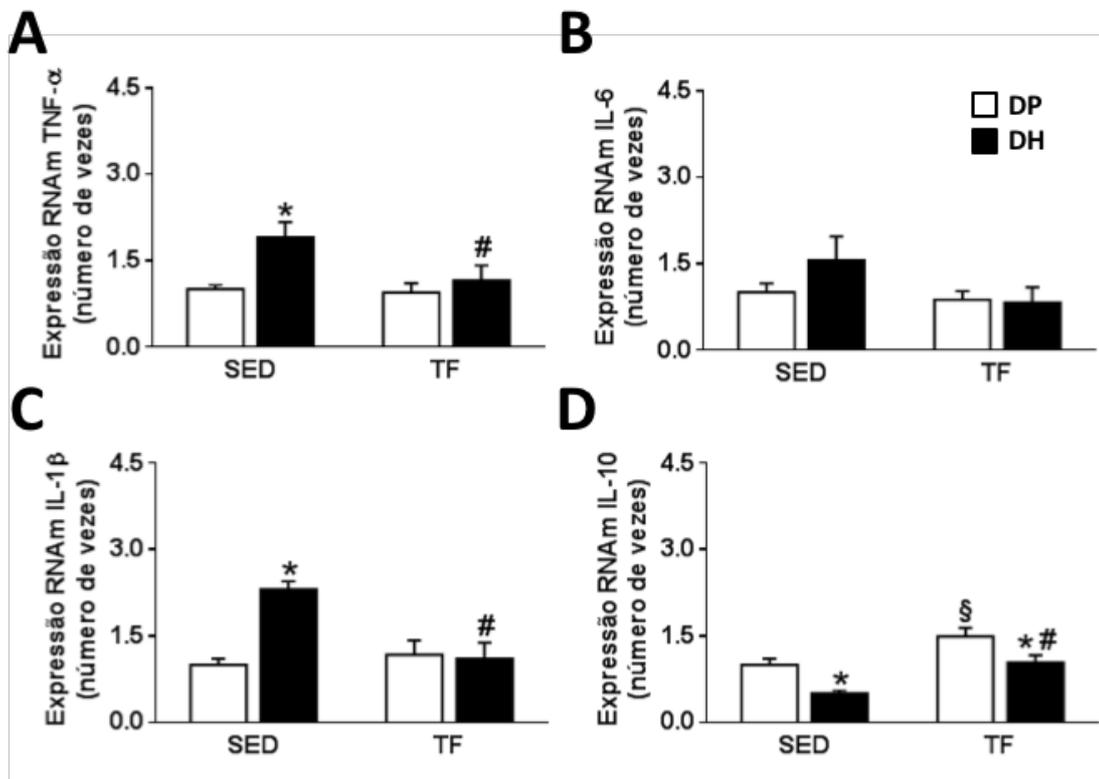


Figura 19. Alterações na expressão do RNAm no NTS de **A)** fator de necrose tumoral- α (TNF- α), **B)** interleucina-6 (IL-6), **C)** interleucina-1 β (IL-1 β), e **D)** interleucina-10 (IL-10) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) sedentários ou que realizaram 10 semanas de treinamento de força. Os dados estão expressos como média \pm erro da média. Análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls; * diferente de DP; # diferente de SED-DH; § diferente de SED-DP; $P < 0,05$. SED-DP, SED-DH e TF-DP ($n = 4$), TF-DH ($n = 5$).

6 DISCUSSÃO

Na presente investigação, observou-se que ratos alimentados com DH apresentaram aumento da PAM, aumento da modulação simpática na PAS (um índice da atividade simpática vasomotora), do balanço simpatovagal do IP e comprometimento da bradicardia reflexa do barorreflexo. Além disso, um aumento na expressão do RNAm de citocinas pró-inflamatórias e um desequilíbrio na expressão do RNAm dos componentes das vias pressora e protetora do SRA também foram encontrados no NTS de ratos alimentados com DH. O bloqueio do receptor AT_1 no NTS, diminuiu a PAM, aumentou a sensibilidade do barorreflexo, diminuiu a modulação simpática da PAS e o balanço simpatovagal do IP em ratos alimentados com DH. Já a super-expressão do receptor AT_2 no NTS reduziu a FC e o balanço simpatovagal do IP à níveis semelhantes aos ratos alimentados com DP e reduziu parcialmente a modulação simpática da PAS. Além disso, a super-expressão do receptor AT_2 no NTS aumentou a expressão do RNAm do receptor Mas e reduziu a expressão da citocina pró-inflamatória $TNF-\alpha$ no NTS. Por fim, evidenciamos que o TF preveniu as alterações cardiovasculares induzidas pela DH e essas respostas foram associadas com uma redução na expressão do RNAm de citocinas pró-inflamatórias, aumento na expressão do RNAm de uma citocina anti-inflamatória e de componentes da via protetora do SRA no NTS.

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de DH está diretamente correlacionado com sobrepeso, obesidade abdominal e distúrbios metabólicos, como a resistência à insulina e alterações no perfil lipídico (George *et al.*, 1990; Tucker *et al.*, 1992). Também já está bem estabelecido que o excesso de tecido adiposo resulta em uma disfunção nesse tecido, caracterizada microscopicamente por adipócitos hipertrofiados e o aumento da infiltração de macrófagos e funcionalmente por mudanças marcantes na secreção de ácidos graxos livres, leptina e adipocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$ e IL-6 (Dorresteijn *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2015). Essas anormalidades metabólicas são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II (Hanson *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2004). Nossos resultados indicaram um aumento de massa corporal e da adiposidade, além de alterações no perfil lipídico e aumento nos níveis plasmáticos de leptina em ratos alimentados com DH por 6 semanas. Além disso, houve ainda uma redução na sensibilidade à insulina culminando em maior glicemia. Esses resultados estão em linha com outros achados que indicam que o consumo de DH está associado com um acúmulo excessivo de tecido adiposo, aumento da glicemia, redução da sensibilidade à insulina e aumento dos níveis de

leptina plasmática em ratos (Despres *et al.*, 2006; Erdos *et al.*, 2011; Fardin *et al.*, 2012; Speretta *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013).

Somente o excesso de tecido adiposo, já é um fator de risco para o aumento da atividade simpática, pressão arterial e sensibilidade do barorreflexo em humanos e animais (Tuck, 1992; Rocchini *et al.*, 1999; Stocker *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2010; Guimaraes *et al.*, 2014). Nossos dados demonstraram que após 6 semanas de DH, a PAM estava ~10 mmHg mais alta do que em animais controles. Observamos também menor sensibilidade da bradicardia reflexa e maior FC, balanço simpatovagal do IP e modulação simpática da PAS em ratos alimentados com DH. Esses dados estão em consonância com dados da literatura que também observaram aumento da pressão arterial e da atividade simpática, além da redução na sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com DH (Boustany *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2007; Stocker *et al.*, 2007; Fardin *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013). Desta forma, este modelo de DH estabelecido por Estadella *et al.* (2004) mostrou-se efetivo em alterar além dos índices metabólicos, também parâmetros cardiovasculares.

Buscando entender os mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares induzidas pela DH avaliamos a expressão gênica dos componentes do SRA no NTS. Após 6 semanas de DH, encontramos maior expressão do mRNA da ECA e do receptor AT₁ no NTS. Esses dados estão em linha com a literatura que indica que a ativação da via pressora do SRA em núcleos que controlam a pressão arterial, inclusive no NTS, tem papel crucial na fisiopatologia de diferentes modelos de hipertensão (Shi *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011; Freiria-Oliveira *et al.*, 2013; Sriramula *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2014). Além disso, a Ang II atuando no receptor AT₁ no NTS promove uma redução da função do barorreflexo (Micheline *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999). Desta forma, é possível que nesta situação o aumento da pressão arterial associada ao aumento da modulação simpática da PAS e a redução da sensibilidade do barorreflexo possa ter sido causada pela ativação da via pressora do SRA no NTS.

De fato, nossos experimentos com a microinjeção de losartan (antagonista de receptor AT₁) no NTSi, a principal porção do NTS que recebe aferências dos barorreceptores arteriais (Ciriello, 1983; Ciriello, Hochstenbach, *et al.*, 1994), em ratos alimentados com DH por 6 semanas apontaram um restabelecimento da função do barorreflexo. Ademais, dados da literatura têm demonstrado que o NTS é mais do que um relé sináptico para as aferências cardiovasculares, pois desempenha um importante papel na regulação da pressão arterial e da simpatoexcitação observadas em animais SHR e em ratos com hipertensão renovascular (Sato *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2009; Freiria-Oliveira *et al.*, 2013; Blanch *et al.*, 2014). Em

conformidade com esses estudos, nossos dados também demonstraram que o bloqueio do receptor AT₁ no NTS reduziu o aumento da modulação simpática da PAS e no balanço simpátovagal do IP, promovendo uma redução da pressão arterial em torno de ~7-8 mmHg. Desta forma, os dados desse protocolo funcional sugerem que as alterações cardiovasculares induzidas pela DH são mediadas, pelo menos em parte, pela ativação de receptor AT₁ no NTS.

Ainda neste protocolo, evidenciamos menor expressão dos receptores Mas e AT₂ em ratos alimentados com DH por 6 semanas. Assim, outro possível mecanismo envolvido nas alterações cardiovasculares induzidas pela DH, é o desequilíbrio entre os componentes da via pressora do SRA (ECA e receptor AT₁) e dos componentes da via protetora do SRA (receptores AT₂ e Mas, e ECA2). Vários estudos têm demonstrado que, as ações da Ang II via receptor AT₂ e a ativação do eixo ECA2/receptor Mas/Ang (1-7) levam a respostas antagônicas às ações da ativação do receptor AT₁ pela Ang II (Gallinat *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2013). A redução na expressão do RNAm do receptor AT₂ está em linha com estudos funcionais que têm demonstrado maior pressão arterial basal e maior susceptibilidade para desenvolver a hipertensão DOCA-sal em camundongos nocaute para o receptor AT₂ (Ichiki *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 2000), e atenuação do desenvolvimento da hipertensão renovascular após a super-expressão do receptor AT₂ no NTS (Blanch *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que o tratamento crônico com o C21, agonista seletivo para receptor AT₂, administrado sistemicamente impede o desenvolvimento da hipertensão sensível a sal em ratos obesos (Ali *et al.*, 2015). Outros achados não encontraram alterações na pressão arterial em diferentes modelos de hipertensão com o tratamento crônico com C21 administrado sistemicamente (Matavelli *et al.*, 2011; Paulis *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2012), porém a ativação do receptor AT₂ resultou em benefícios cardiovasculares, como a redução da resposta inflamatória e aumento na produção de NO nos rins em ratos com hipertensão renovascular 2R1C (Matavelli *et al.*, 2011), prevenção do enrijecimento e acúmulo de colágeno na artéria aorta em ratos com hipertensão induzida pela inibição da síntese de NO (Paulis *et al.*, 2012), e melhora da função endotelial vascular em SHR (Rehman *et al.*, 2012).

Neste contexto, decidimos avaliar também os efeitos da super-expressão do receptor AT₂ no NTS em ratos alimentados com DH. Evidenciamos um reestabelecimento completo da sensibilidade do barorreflexo, da FC e do balanço simpátovagal do IP, além de uma atenuação parcial na modulação simpática da PAS. Tais resultados foram associados com um aumento na expressão do RNAm do receptor Mas e uma tendência de aumento na enzima ECA2. Contudo, esses efeitos não foram suficientes para culminar em uma redução da PAM. Esses dados estão parcialmente de acordo com um estudo recente, onde demonstramos que a

super-expressão do receptor AT_2 no NTS atenuou o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C em ratos e restabeleceu a modulação simpática da PAS, bem como a função do barorreflexo (Blanch *et al.*, 2014). Neste trabalho anterior mostramos ainda que, a expressão do RNAm de ECA2 no NTS que estava reduzida em ratos com hipertensão renovascular 2R1C, foi reestabelecida após a super-expressão de receptores AT_2 no NTS (Blanch *et al.*, 2014). Outros estudos demonstraram que a microinjeção bilateral de Ang (1-7) no NTSi melhorou a função do barorreflexo e promoveu uma redução na pressão arterial em SHR (Chaves *et al.*, 2000), enquanto que o bloqueio de ECA2 no NTS reduziu a função do barorreflexo em ratos saudáveis (Diz *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que um desequilíbrio entre as vias pressora e protetora do SRA no NTS participam das alterações cardiovasculares induzidas pela DH, porém é possível que a ativação da via pressora do SRA tenha um papel dominante no aumento da pressão arterial observado após 6 semanas de DH.

Dados da literatura tem demonstrado que a Ang II agindo sobre o receptor AT_1 é um potente regulador do sistema imune no SNC (Shi *et al.*, 2010; De Kloet *et al.*, 2014) e induz respostas inflamatórias que são críticas para o desenvolvimento de diferentes modelos de hipertensão, inclusive a hipertensão dependente de obesidade (Shi *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011; De Kloet, Pati, *et al.*, 2013). De Kloet *et al.* (2014) demonstraram que a deleção do receptor AT_1 , especificamente no PVN, reverte parcialmente a neuroinflamação observada nesses animais. O sistema imune também parece regular o SRA, uma vez que, já foi evidenciado que a infusão icv de etanercepte, proteína de fusão que inibe a ação do TNF- α , atenua o desenvolvimento da hipertensão dependente de Ang II em ratos (Sriramula *et al.*, 2013). Esse efeito protetor no sistema cardiovascular foi associado a uma redução na expressão do RNAm dos componentes da via pressora do SRA e aumento na expressão do RNAm de componentes da via protetora do SRA no PVN desses animais (Sriramula *et al.*, 2013). Ademais, a microinjeção de IL-6 no NTS atenua a função do barorreflexo (Takagishi *et al.*, 2010) e o aumento da expressão do TNF- α no PVN está associada com a redução da sensibilidade do barorreflexo em SHR (Masson *et al.*, 2014). Recentemente também foi demonstrado que, o consumo de DH por 3 semanas promove aumento na expressão do RNAm de citocinas inflamatórias e de componentes da via pressora do SRA na lâmina terminal e aumentam a sensibilização à hipertensão induzida por Ang II em ratos (Xue *et al.*, 2015). Os resultados indicaram ainda que, a infusão icv de minociclina ou de pentoxifilina, um inibidor da síntese da citocina pró-inflamatória TNF- α , durante o período de ingestão de DH, atenuam essas respostas (Xue *et al.*, 2015).

Tem sido demonstrado que as células gliais, que são células imunes residentes no SNC, estão ativas em diferentes doenças, incluindo a obesidade (Shi *et al.*, 2010; De Kloet *et al.*, 2014) e estão envolvidas na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo (De Kloet *et al.*, 2014). De Kloet *et al.* (2014) demonstraram recentemente maior astrogliose e número de micróglia no PVN e SFO, duas regiões que participam da regulação da pressão arterial, e maior expressão do RNAm da citocina pró-inflamatória IL-6 no PVN em camundongos alimentados com DH. Na presente investigação, também observamos uma neuroinflamação no NTS em ratos alimentados com DH. Evidenciamos maior expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 após 6 semanas de DH, bem como uma maior ativação de astrócitos e maior número de micróglia. É possível que a neuroinflamação observada no NTS dos animais DH tenha sido decorrente do aumento da atividade da via pressora do SRA, em particular da maior expressão do receptor AT₁. Por outro lado, a ativação da via protetora do SRA pode reduzir a neuroinflamação no NTS, uma vez que, no presente estudo, demonstramos que a super-expressão do receptor AT₂ no NTS atenuou a expressão do RNAm de TNF- α no mesmo núcleo em animais alimentados com DH. Portanto, é possível que uma interação entre o sistema imune e o SRA no NTS contribua para o desenvolvimento/manutenção das alterações cardiovasculares induzidas pela DH, porém futuros estudos com protocolos funcionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Observamos também, maiores níveis plasmáticos de leptina nos animais alimentados com DH. Estudos anteriores destacaram um importante papel desse hormônio produzido no tecido adiposo no desenvolvimento/manutenção da hipertensão em diferentes modelos experimentais devido à ativação do sistema melanocortina no encéfalo (Da Silva *et al.*, 2015). Também tem sido evidenciado que a leptina aumenta a atividade nervosa simpática (Mark *et al.*, 2009; Hilzendege *et al.*, 2012) e reduz a sensibilidade do barorreflexo atuando no NTS (Ciriello, 2013). Fardin *et al.* (2012) demonstraram que ratos alimentados com DH por 20 semanas exibiram uma redução na sensibilidade do barorreflexo, e sugeriram que esse efeito possa estar relacionado com os elevados níveis de leptina observados nesses animais. Além disso, foi demonstrado que, a microinjeção icv de losartan em ratos ou a deleção do receptor AT₁ em camundongos, impedem o aumento da atividade simpática para os rins e para o tecido adiposo marrom induzida pela microinjeção icv de leptina (Hilzendege *et al.*, 2012). Levando em conta que, os presentes achados demonstraram um grande envolvimento do receptor AT₁ no NTS nas alterações cardiovasculares após 6 semanas de DH, é possível que uma interação entre os mecanismos angiotensinérgicos e a leptina no NTS também esteja envolvida nas

alterações cardiovasculares induzidas pela DH, porém essa hipótese ainda precisa ser investigada.

Os presentes resultados demonstraram ainda que, o TF realizado em intensidade moderada preveniu as alterações cardiovasculares induzidas pela DH, incluindo o aumento da PAM, da modulação simpática da PAS, da FC e do balanço simpatovagal do IP, além da redução da sensibilidade do barorreflexo. Essas respostas foram associadas com um aumento na expressão do RNAm de componentes da via protetora do SRA (AT_2 , Mas e ECA2) e da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no NTS. Os aumentos da massa corporal e da adiposidade em animais sedentários estão associados com alterações metabólicas, tais como níveis plasmáticos de insulina, glicemia, redução da sensibilidade à insulina e alterações no perfil lipídico (Erdos *et al.*, 2011; Fardin *et al.*, 2012; Speretta *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013). Os presentes achados mostraram que o TF preveniu distúrbios cardiovasculares e metabólicos induzidos pela DH independentemente do aumento da massa corporal e da adiposidade. Contrastando com nossos resultados, foi demonstrado previamente que o TF realizado em escada, atenuou o aumento na massa corporal induzido pela DH (Speretta *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013). Essas diferenças podem estar relacionadas com as diferentes intensidades de exercício utilizadas no presente estudo e nos estudos prévios. O aumento na taxa metabólica basal e a oxidação de lipídeos que são efeitos agudos do TF, ou seja, ocorrem após cada sessão de exercício, parecem ser dependentes da intensidade do esforço em indivíduos com sobrepeso (Fatouros *et al.*, 2009). Portanto, o exercício em intensidade moderada utilizado no presente estudo (todas as escaladas com 50-60% da CCVM) em contraste com o exercício de alta intensidade usado em estudos prévios (primeira escalada com 50% da CCVM e última escalada com pelo menos 100% da CCVM) (Speretta *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013) talvez possa explicar a diferença entre os achados.

Nós também observamos que o TF preveniu a redução na sensibilidade à insulina e o aumento nos níveis plasmáticos de insulina. Tais efeitos podem estar associados com o aumento na fosforilação de enzimas envolvidas na sinalização intracelular da insulina, como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B (Akt), e o aumento da expressão proteica do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) no músculo esquelético em resposta ao TF realizado em escada, observados anteriormente em ratos alimentados com DH (Tang *et al.*, 2014). O TF também preveniu alterações no perfil lipídico em ratos alimentados com DH. Esses resultados são consistentes com um estudo que demonstrou redução na PAS, melhora no perfil lipídico e redução em citocinas pró-inflamatórias no plasma, sem redução da massa corporal ou da relação cintura-quadril em resposta ao treinamento aeróbio em pacientes diabéticos tipo II

com sobrepeso (Kadoglou *et al.*, 2007). Já está bem estabelecido que o aumento nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias está associado com a resistência à insulina (Finucane *et al.*, 2015; Gokulakrishnan *et al.*, 2015) e que existe uma correlação inversa entre citocinas pró-inflamatórias e a atividade física regular (Fischer *et al.*, 2007). Assim, apesar de não termos avaliado os níveis plasmáticos de citocinas no plasma no presente estudo, a melhora nos parâmetros metabólicos encontrada nos animais alimentados com DH e treinados em força pode estar relacionada com a redução dos níveis desses peptídeos na corrente sanguínea.

A DH aumenta a atividade do SRA (Boustany *et al.*, 2005; De Kloet *et al.*, 2014) e o bloqueio periférico do receptor AT_1 com losartan parece reduzir a hipertensão induzida pela obesidade (Boustany *et al.*, 2005). No encéfalo, está bem estabelecido que Ang II agindo sobre o receptor AT_1 no NTS reduz a sensibilidade do barorreflexo (Michelini *et al.*, 1990; Paton *et al.*, 1999) e que mecanismos angiotensinérgicos no NTS estão envolvidos na manutenção de diferentes modelos de hipertensão (Shi *et al.*, 2010; Freiria-Oliveira *et al.*, 2013; Zubcevic *et al.*, 2013; Blanch *et al.*, 2014). Ademais, na presente investigação, nós demonstramos que a microinjeção de losartan no NTS reduz a pressão arterial e aumenta a sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com DH. Contudo, apesar da prevenção nas alterações cardiovasculares, a maior expressão do RNAm do receptor AT_1 no NTS detectada em ratos alimentados com DH sedentários não foi modificada pelo TF, resultado similar a um estudo prévio que demonstrou que o exercício aeróbio promoveu queda na pressão arterial em SHR, apesar do aumento na expressão do RNAm do receptor AT_1 no NTS (Felix *et al.*, 2007).

No presente estudo, o TF também aumentou a expressão do RNAm dos receptores AT_2 e Mas e da ECA2 no NTS. Como já foi discutido, A ECA2 é uma enzima que tem atividade catalítica convertendo Ang II em Ang-(1-7) (Fraga-Silva *et al.*, 2013), e a Ang -(1-7), atuando no NTS aumenta a sensibilidade do barorreflexo e reduz a pressão arterial (Chaves *et al.*, 2000). Considerando que o receptor AT_2 e a ECA2/Ang-(1-7)-receptor Mas são parte do eixo protetor do SRA, o aumento da expressão do RNAm dos receptores AT_2 e Mas e da ECA2 no NTS encontrada em animais alimentados com DH e treinados em força, podem estar envolvidos na prevenção das alterações cardiovasculares induzidas pela DH, apesar do aumento na expressão do RNAm do receptor AT_1 . A redução na via pressora e aumento da via protetora do SRA foi encontrada em outros tecidos em animais submetidos ao treinamento aeróbio (Gomes-Santos *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Por exemplo, foi demonstrado que o exercício em esteira realizado em intensidade moderada causou mudanças no SRA no músculo esquelético em direção a via ECA2-Ang-(1-7)-Mas em ratos com insuficiência cardíaca congestiva (Gomes-Santos *et al.*, 2014) e reduziu a via pressora do SRA nas arteriais renais (Silva *et al.*, 2015),

bem como restaurou o equilíbrio entre as vias pressora e protetora no PVN e RVL (Agarwal *et al.*, 2011) em SHR. Em conjunto, esses dados prévios e os encontrados no presente estudo, suportam a idéia do exercício em esteira e do TF como moduladores dos componentes do SRA tanto na periferia como no encéfalo, promovendo tanto o aumento da via protetora e/ou a redução da via pressora.

A expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β aumentou e a expressão do RNAm da citocina anti-inflamatória IL-10 reduziu no NTS em ratos alimentados com DH sedentários, sugerindo uma inflamação crônica de baixa intensidade nesse núcleo. De maneira interessante, essas alterações foram prevenidas pelo TF. Nossos dados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram aumento na expressão do RNAm da IL-10 no hipotálamo após uma única sessão de exercício de natação ou esteira realizados em intensidade moderada em ratos alimentados com DH (Ropelle *et al.*, 2010) e redução na expressão do RNAm de citocinas pró-inflamatórias no PVN e RVL após 16 semanas de exercício em esteira realizado em intensidade moderada em SHR (Agarwal *et al.*, 2011). Também já foi demonstrado que, a microinjeção da IL-6 no NTS reduz a sensibilidade do barorreflexo em ratos (Takagishi *et al.*, 2010) e que o aumento sistêmico sustentado de IL-10 reduz citocinas pró-inflamatórias no coração e rins, reduzindo a pressão arterial em SHR e ratos Dahl sensíveis ao sódio (Nonaka-Sarukawa *et al.*, 2008; Nomoto *et al.*, 2009). Portanto, a redução da expressão do RNAm de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias observados no NTS de ratos alimentados com DH e treinados em força talvez tenha relação com os efeitos positivos na pressão arterial, sensibilidade do barorreflexo e na modulação simpática da PAS observados nesses animais.

Como já dito anteriormente, a interação entre inflamação e SRA no encéfalo parece estar envolvida em diferentes modelos de desordem cardiovascular (Shi *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011; Sriramula *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2014). Por exemplo, a infusão icv de minociclina, resultou em atenuação da resposta pressora da infusão crônica de Ang II e promoveu redução da ativação de micróglias e da expressão do RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no PVN em ratos (Shi *et al.*, 2010). A expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no PVN de camundongos alimentados com DH foi atenuada com a deleção do receptor AT₁ especificamente nesse núcleo (De Kloet *et al.*, 2014). Em contraste, a administração do agonista para receptor AT₂, C21, parece aumentar os níveis de IL-10 no hemisfério lesado em ratos com acidente vascular cerebral isquêmico (Alhusban *et al.*, 2015). Além disso, evidenciamos na presente investigação que, a super-expressão do receptor AT₂ no NTS reduz a expressão do TNF- α em ratos alimentados com DH. Assim, é possível que, as alterações na expressão dos

componentes da via protetora do SRA observadas em ratos alimentados com DH e treinados em força tenha relação com a alteração da expressão de citocinas nesse mesmo núcleo. Contudo, esta ainda é uma questão para ser testada em futuros estudos.

Está bem estabelecido que um dos efeitos crônicos do exercício aeróbio no sistema cardiovascular é a redução da FC de repouso (Seely *et al.*, 1974; Felix *et al.*, 2007), que se deve ao aumento da modulação parassimpática e redução da modulação simpática no coração induzidas por essa modalidade de treinamento (Seely *et al.*, 1974). Contudo, O TF parece não exercer um grande efeito crônico na FC de repouso em indivíduos saudáveis (Ricci *et al.*, 1982; Barauna *et al.*, 2005) como demonstrado no presente estudo em ratos alimentados com dieta padrão. Por outro lado, o TF preveniu o aumento da FC observado em ratos alimentados com DH sedentários. Esse efeito protetor pode ser devido à combinação do aumento da modulação parassimpática e redução da modulação simpática do IP encontrada nesses animais. De maneira similar aos nossos achados, foi demonstrado recentemente uma redução na FC associada a um menor tônus simpático em ratas ovariectomizadas hipertensas em resposta ao TF (Shimojo *et al.*, 2015).

7 CONCLUSÃO

A compreensão de mecanismos envolvidos com a hipertensão associada a obesidade é primordial para o desenvolvimento de novas ferramentas para a prevenção e tratamento dessa doença. Na presente investigação apresentamos evidências inéditas sobre a participação do SRA no NTS na etiologia das alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade. O desequilíbrio entre as vias pressora e protetora do SRA no NTS pode ser a base das respostas observadas. Uma vez que, também evidenciamos uma inflamação crônica no NTS, é possível que uma interação entre o SRA e o sistema imune esteja envolvida nessas alterações. O presente estudo também demonstrou que o TF realizado em intensidade moderada previne as alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade. Os possíveis mecanismos para estas respostas podem envolver a redução de respostas inflamatórias e modificações do SRA no NTS. A proteção cardiovascular observada em ratos treinados em força sugere que essa modalidade de exercício pode ter efeitos benéficos na prevenção de doenças crônicas, mesmo em indivíduos com maiores riscos.

8 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, D.; WELSCH, M. A.; KELLER, J. N.; FRANCIS, J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. **Basic Res Cardiol**, v. 106, n. 6, p. 1069-85, Nov 2011.
- AGHAMOHAMMADZADEH, R.; HEAGERTY, A. M. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. **Ann Med**, v. 44 Suppl 1, p. S74-84, Jun 2012.
- ALHUSBAN, A.; FOUDA, A. Y.; BINDU, P.; ISHRAT, T.; SOLIMAN, S.; FAGAN, S. C. Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke. **J Hypertens**, v. 33, n. 1, p. 170-80, Jan 2015.
- ALI, Q.; PATEL, S.; HUSSAIN, T. Angiotensin AT2 receptor agonist prevents salt-sensitive hypertension in obese Zucker rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 308, n. 12, p. F1379-85, Jun 15 2015.
- ALLEN, A. M.; CHAI, S. Y.; SEXTON, P. M.; LEWIS, S. J.; VERBERNE, A. J.; JARROTT, B.; LOUIS, W. J.; CLEVERS, J.; MCKINLEY, M. J.; PAXINOS, G.; ET AL. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata. **Hypertension**, v. 9, n. 6 Pt 2, p. III198-205, Jun 1987.
- ALLEN, A. M.; MCKINLEY, M. J.; OLDFIELD, B. J.; DAMPNEY, R. A.; MENDELSON, F. A. Angiotensin II receptor binding and the baroreflex pathway. **Clin Exp Hypertens A**, v. 10 Suppl 1, p. 63-78, 1988.
- ARMITAGE, J. A.; BURKE, S. L.; PRIOR, L. J.; BARZEL, B.; EIKELIS, N.; LIM, K.; HEAD, G. A. Rapid onset of renal sympathetic nerve activation in rabbits fed a high-fat diet. **Hypertension**, v. 60, n. 1, p. 163-71, Jul 2012.
- ARNOLD, A. C.; SHALTOUT, H. A.; GALLAGHER, P. E.; DIZ, D. I. Leptin impairs cardiovagal baroreflex function at the level of the solitary tract nucleus. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 1001-8, Nov 2009.
- ARONSSON, M.; ALMASAN, K.; FUXE, K.; CINTRA, A.; HARFSTRAND, A.; GUSTAFSSON, J. A.; GANTEN, D. Evidence for the existence of angiotensinogen mRNA in magnocellular paraventricular hypothalamic neurons. **Acta Physiol Scand**, v. 132, n. 4, p. 585-6, Apr 1988.
- BADER, M.; ALENINA, N.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; SANTOS, R. A. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 4, p. 1080-105, Oct 2014.
- BAHIA, L. R.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, v. 13, n. 1, p. 13-17, 2014.
- BARAUNA, V. G.; BATISTA, M. L., JR.; COSTA ROSA, L. F.; CASARINI, D. E.; KRIEGER, J. E.; OLIVEIRA, E. M. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a

resistance-training model. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 4, p. 249-54, Apr 2005.

BASKERVILLE, A. L.; ECKBERG, D. L.; THOMPSON, M. A. Arterial pressure and pulse interval responses to repetitive carotid baroreceptor stimuli in man. **J Physiol**, v. 297, n. 0, p. 61-71, Dec 1979.

BILLMAN, G. E. Heart rate variability - a historical perspective. **Front Physiol**, v. 2, p. 86, 2011.

BLAIR-WEST, J. R.; CAREY, K. D.; DENTON, D. A.; WEISINGER, R. S.; SHADE, R. E. Evidence that brain angiotensin II is involved in both thirst and sodium appetite in baboons. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1639-46, Nov 1998.

BLANCH, G. T.; FREIRIA-OLIVEIRA, A. H.; MURPHY, D.; PAULIN, R. F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, D. S. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 7, p. R531-42, Apr 1 2013.

BLANCH, G. T.; FREIRIA-OLIVEIRA, A. H.; SPERETTA, G. F.; CARRERA, E. J.; LI, H.; SPETH, R. C.; COLOMBARI, E.; SUMNERS, C.; COLOMBARI, D. S. Increased Expression of Angiotensin II Type 2 Receptors in the Solitary-Vagal Complex Blunts Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 777-783, Jun 23 2014.

BLESSING, W. W.; WILLOUGHBY, J. O. Depressor neurons in rabbit caudal medulla do not transmit the baroreceptor-vasomotor reflex. **Am J Physiol**, v. 253, n. 4 Pt 2, p. H777-86, Oct 1987.

BLUME, A.; LEBRUN, C. J.; HERDEGEN, T.; BRAVO, R.; LINZ, W.; MOLLENHOFF, E.; UNGER, T. Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. **Hypertension**, v. 29, n. 2, p. 592-8, Feb 1997.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, Feb 1989.

BOUSTANY, C. M.; BROWN, D. R.; RANDALL, D. C.; CASSIS, L. A. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, n. 1, p. R181-6, Jul 2005.

BRANDS, M. W.; BANES-BERCELI, A. K.; INSCHO, E. W.; AL-AZAWI, H.; ALLEN, A. J.; LABAZI, H. Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation. **Hypertension**, v. 56, n. 5, p. 879-84, Nov 2010.

BUSCHE, S.; GALLINAT, S.; FLEEGAL, M. A.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Novel role of macrophage migration inhibitory factor in angiotensin II regulation of neuromodulation in rat brain. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4623-30, Nov 2001.

CASTO, R.; PHILLIPS, M. I. Cardiovascular actions of microinjections of angiotensin II in the brain stem of rats. **Am J Physiol**, v. 246, n. 5 Pt 2, p. R811-6, May 1984.

CECCHINI, M.; SASSI, F. Preventing Obesity in the USA: Impact on Health Service Utilization and Costs. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 765-76, Jul 2015.

CHAVES, G. Z.; CALIGIORNE, S. M.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarius of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 12, p. 1841-8, Dec 2000.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 1, p. 9-15, Jul 2005.

CIRIELLO, J. Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat. **Neurosci Lett**, v. 36, n. 1, p. 37-42, Mar 28 1983.

_____. Plasma leptin inhibits the response of nucleus of the solitary tract neurons to aortic baroreceptor stimulation. **Brain Res Bull**, v. 97, p. 96-103, Aug 2013.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENBACH, S. L.; RODER, S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat. In: BARRACO, I. R. A. (Ed.). **Nucleus of the Solitary Tract**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p.35-50.

CIRIELLO, J.; SCHULTZ, C. G.; RODER, S. Collateral axonal projections from ventrolateral medullary non-catecholaminergic neurons to central nucleus of the amygdala. **Brain Res**, v. 663, n. 2, p. 346-51, Nov 14 1994.

CLEMENT, D. L.; PELLETIER, L. C.; SHEPHERD, J. T. Control of high and low blood pressure in the dog by aortic and sinus nerves. **Clin Sci Mol Med Suppl**, v. 2, p. 257s-258s, Jun 1975.

COCKS, M.; SHAW, C. S.; SHEPHERD, S. O.; FISHER, J. P.; RANASINGHE, A. M.; BARKER, T. A.; TIPTON, K. D.; WAGENMAKERS, A. J. Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males. **J Physiol**, v. 591, n. Pt 3, p. 641-56, Feb 1 2013.

COLOMBARI, E.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am J Physiol**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. R730-8, Mar 1994.

COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; TALMAN, W. T. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1220-5, Jun 1996.

COLOMBARI, E.; SATO, M. A.; CRAVO, S. L.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R., JR.; LOPES, O. U. Role of the medulla oblongata in hypertension. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 549-54, Sep 2001.

CORREA, F. M.; PLUNKETT, L. M.; SAAVEDRA, J. M. Quantitative distribution of

angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry. **Brain Res**, v. 375, n. 2, p. 259-66, Jun 11 1986.

COTTLE, M. K. Degeneration Studies of Primary Afferents of Ixth and Xth Cranial Nerves in the Cat. **J Comp Neurol**, v. 122, p. 329-45, Jun 1964.

COWLEY, A. W., JR.; GUYTON, A. C. Quantification of intermediate steps in the renin-angiotensin-vasoconstrictor feedback loop in the dog. **Circ Res**, v. 30, n. 5, p. 557-66, May 1972.

CRAVO, S. L.; MORRISON, S. F.; REIS, D. J. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. **Am J Physiol**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. R985-94, Oct 1991.

DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; DUBINION, J. H.; BASSI, M.; MOKHTARPOURIANI, K.; HAMZA, S. M.; HALL, J. E. Chronic central nervous system MC3/4R blockade attenuates hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition but not by angiotensin II infusion. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 171-7, Jan 2015.

DANYEL, L. A.; SCHMERLER, P.; PAULIS, L.; UNGER, T.; STECKELINGS, U. M. Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. **Integr Blood Press Control**, v. 6, p. 153-61, 2013.

DE KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; SHI, P. D.; ZUBCEVIC, J.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Neuroimmune communication in hypertension and obesity: a new therapeutic angle? **Pharmacol Ther**, v. 138, n. 3, p. 428-40, Jun 2013.

DE KLOET, A. D.; LIU, M.; RODRIGUEZ, V.; KRAUSE, E. G.; SUMNERS, C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 309, n. 5, p. R444-58, Sep 2015.

DE KLOET, A. D.; PATI, D.; WANG, L.; HILLER, H.; SUMNERS, C.; FRAZIER, C. J.; SEELEY, R. J.; HERMAN, J. P.; WOODS, S. C.; KRAUSE, E. G. Angiotensin type 1a receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus protect against diet-induced obesity. **J Neurosci**, v. 33, n. 11, p. 4825-33, Mar 13 2013.

DE KLOET, A. D.; PIOQUINTO, D. J.; NGUYEN, D.; WANG, L.; SMITH, J. A.; HILLER, H.; SUMNERS, C. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. **Physiol Behav**, Feb 6 2014.

DELBIN, M. A.; DAVEL, A. P.; COUTO, G. K.; DE ARAUJO, G. G.; ROSSONI, L. V.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e53318, 2012.

DESCHEPPER, C. F.; BOUHNICK, J.; GANONG, W. F. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. **Brain Res**, v. 374, n. 1, p. 195-8, May 21 1986.

DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444,

n. 7121, p. 881-7, Dec 14 2006.

DIZ, D. I.; GARCIA-ESPINOSA, M. A.; GEGICK, S.; TOMMASI, E. N.; FERRARIO, C. M.; ANN TALLANT, E.; CHAPPELL, M. C.; GALLAGHER, P. E. Injections of angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor MLN4760 into nucleus tractus solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. **Exp Physiol**, v. 93, n. 5, p. 694-700, May 2008.

DOBA, N.; REIS, D. J. Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. **Circ Res**, v. 32, n. 5, p. 584-93, May 1973.

DONNELLY, J. E.; BLAIR, S. N.; JAKICIC, J. M.; MANORE, M. M.; RANKIN, J. W.; SMITH, B. K.; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 2, p. 459-71, Feb 2009.

DORRESTEIJN, J. A.; VISSEREN, F. L.; SPIERING, W. Mechanisms linking obesity to hypertension. **Obes Rev**, v. 13, n. 1, p. 17-26, Jan 2012.

DZAU, V. J.; INGELFINGER, J.; PRATT, R. E.; ELLISON, K. E. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 544-8, Jun 1986.

ERDOS, B.; KIRICHENKO, N.; WHIDDEN, M.; BASGUT, B.; WOODS, M.; CUDYKIER, I.; TAWIL, R.; SCARPACE, P. J.; TUMER, N. Effect of age on high-fat diet-induced hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 1, p. H164-72, Jul 2011.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DAMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-24, Feb 2004.

FABER, J. E.; BRODY, M. J. Reflex hemodynamic response to superior laryngeal nerve stimulation in the rat. **J Auton Nerv Syst**, v. 9, n. 4, p. 607-22, Dec 1983.

FAGARD, R. H. Physical activity in the prevention and treatment of hypertension in the obese. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 11 Suppl, p. S624-30, Nov 1999.

FARAH, V. M.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 3, p. 361-9, Mar 1999.

FARDIN, N. M.; OYAMA, L. M.; CAMPOS, R. R. Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 8, p. 1591-7, Aug 2012.

FATOUROS, I. G.; CHATZINIKOLAOU, A.; TOURNIS, S.; NIKOLAIDIS, M. G.; JAMURTAS, A. Z.; DOUROUDOS, II; PAPASSOTIRIOU, I.; THOMAKOS, P. M.; TAXILDARIS, K.; MASTORAKOS, G.; MITRAKOU, A. Intensity of resistance exercise determines adipokine and resting energy expenditure responses in overweight elderly individuals. **Diabetes Care**, v. 32, n. 12, p. 2161-7, Dec 2009.

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 780-5, Oct 2007.

FINUCANE, M. M.; STEVENS, G. A.; COWAN, M. J.; DANAELI, G.; LIN, J. K.; PACIOREK, C. J.; SINGH, G. M.; GUTIERREZ, H. R.; LU, Y.; BAHALIM, A. N.; FARZADFAR, F.; RILEY, L. M.; EZZATI, M.; GLOBAL BURDEN OF METABOLIC RISK FACTORS OF CHRONIC DISEASES COLLABORATING, G. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-67, Feb 12 2011.

FINUCANE, O. M.; LYONS, C. L.; MURPHY, A. M.; REYNOLDS, C. M.; KLINGER, R.; HEALY, N. P.; COOKE, A. A.; COLL, R. C.; MCALLAN, L.; NILAWEERA, K. N.; O'REILLY, M. E.; TIERNEY, A. C.; MORINE, M. J.; ALCALA-DIAZ, J. F.; LOPEZ-MIRANDA, J.; O'CONNOR, D. P.; O'NEILL, L. A.; MCGILLICUDDY, F. C.; ROCHE, H. M. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2116-28, Jun 2015.

FISCHER, C. P.; BERNTSEN, A.; PERSTRUP, L. B.; ESKILDSEN, P.; PEDERSEN, B. K. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. **Scand J Med Sci Sports**, v. 17, n. 5, p. 580-7, Oct 2007.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998.

FRAGA-SILVA, R. A.; FERREIRA, A. J.; DOS SANTOS, R. A. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 15, n. 1, p. 31-8, Feb 2013.

FREIRIA-OLIVEIRA, A. H.; BLANCH, G. T.; LI, H.; COLOMBARI, E.; COLOMBARI, D. S.; SUMNERS, C. Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR. **Cardiovasc Res**, v. 97, n. 1, p. 153-60, Jan 1 2013.

FREITAS, R. R.; LOPES, K. L.; CARILLO, B. A.; BERGAMASCHI, C. T.; CARMONA, A. K.; CASARINI, D. E.; FURUKAWA, L.; HEIMANN, J. C.; CAMPOS, R. R.; DOLNIKOFF, M. S. Sympathetic and renin-angiotensin systems contribute to increased blood pressure in sucrose-fed rats. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 6, p. 692-8, Jun 2007.

GALLINAT, S.; BUSCHE, S.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 3, p. E357-74, Mar 2000.

GANTEN, D.; HERMANN, K.; BAYER, C.; UNGER, T.; LANG, R. E. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. **Science**, v. 221, n. 4613, p. 869-71, Aug 26 1983.

GANTEN, D.; MINNICH, J. L.; GRANGER, P.; HAYDUK, K.; BRECHT, H. M.;

BARBEAU, A.; BOUCHER, R.; GENEST, J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. **Science**, v. 173, n. 3991, p. 64-5, Jul 2 1971.

GEORGE, V.; TREMBLAY, A.; DESPRES, J. P.; LEBLANC, C.; BOUCHARD, C. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. **Int J Obes**, v. 14, n. 12, p. 1085-94, Dec 1990.

GOKULAKRISHNAN, K.; AMUTHA, A.; RANJANI, H.; BIBIN, S. Y.; BALAKUMAR, M.; PANDEY, G. K.; ANJANA, R. M.; ALI, M. K.; NARAYAN, K. M.; MOHAN, V. Relationship of Adipokines and Proinflammatory Cytokines among Asian Indians with Obesity and Youth Onset Type 2 Diabetes. **Endocr Pract**, v. 21, n. 10, p. 1143-51, Oct 2015.

GOMES-SANTOS, I. L.; FERNANDES, T.; COUTO, G. K.; FERREIRA-FILHO, J. C.; SALEMI, V. M.; FERNANDES, F. B.; CASARINI, D. E.; BRUM, P. C.; ROSSONI, L. V.; DE OLIVEIRA, E. M.; NEGRAO, C. E. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98012, 2014.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annu Rev Immunol**, Apr 5 2010.

GROBE, J. L.; XU, D.; SIGMUND, C. D. An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 187-93, Aug 2008.

GROSS, V.; MILIA, A. F.; PLEHM, R.; INAGAMI, T.; LUFT, F. C. Long-term blood pressure telemetry in AT2 receptor-disrupted mice. **J Hypertens**, v. 18, n. 7, p. 955-61, Jul 2000.

GUIMARAES, P. S.; HUBER, D. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHREIHOFER, A. M. Development of attenuated baroreflexes in obese Zucker rats coincides with impaired activation of nucleus tractus solitarius. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 9, p. R681-92, May 2014.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006.

HACKENTHAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D.; TAUGNER, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol Rev**, v. 70, n. 4, p. 1067-116, Oct 1990.

HALL, J. E.; DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; DUBINION, J.; HAMZA, S.; MUNUSAMY, S.; SMITH, G.; STEC, D. E. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17271-6, Jun 4 2010.

HANSON, R. L.; IMPERATORE, G.; BENNETT, P. H.; KNOWLER, W. C. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 3120-7, Oct 2002.

HARTLE, D. K.; BRODY, M. J. The angiotensin II pressor system of the rat forebrain. **Circ Res**, v. 54, n. 4, p. 355-66, Apr 1984.

HEBER, D. An integrative view of obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 1, p. 280S-283S, Jan

2010.

HILZENDEGER, A. M.; MORGAN, D. A.; BROOKS, L.; DELLSPERGER, D.; LIU, X.; GROBE, J. L.; RAHMOUNI, K.; SIGMUND, C. D.; MARK, A. L. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 2, p. H197-206, Jul 15 2012.

HODGE, R. L.; LOWE, R. D.; VANE, J. R. The effects of alteration of blood-volume on the concentration of circulating angiotensin in anaesthetized dogs. **J Physiol**, v. 185, n. 3, p. 613-26, Aug 1966.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

HUNT, K. J.; RESENDEZ, R. G.; WILLIAMS, K.; HAFFNER, S. M.; STERN, M. P.; SAN ANTONIO HEART, S. National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1251-7, Sep 7 2004.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013 - Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014.

ICHIKI, T.; LABOSKY, P. A.; SHIOTA, C.; OKUYAMA, S.; IMAGAWA, Y.; FOGO, A.; NIIMURA, F.; ICHIKAWA, I.; HOGAN, B. L.; INAGAMI, T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. **Nature**, v. 377, n. 6551, p. 748-50, Oct 26 1995.

JURASCHEK, S. P.; BLAHA, M. J.; WHELTON, S. P.; BLUMENTHAL, R.; JONES, S. R.; KETELYAN, S. J.; SCHAIRER, J.; BRAWNER, C. A.; AL-MALLAH, M. H. Physical fitness and hypertension in a population at risk for cardiovascular disease: the Henry Ford Exercise Testing (FIT) Project. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 6, p. e001268, Dec 2014.

KADOGLU, N. P.; PERREA, D.; ILIADIS, F.; ANGELOPOULOU, N.; LIAPIS, C.; ALEVIZOS, M. Exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 719-21, Mar 2007.

KLINE, D. D.; KING, T. L.; AUSTGEN, J. R.; HEESCH, C. M.; HASSER, E. M. Sensory afferent and hypoxia-mediated activation of nucleus tractus solitarius neurons that project to the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 510-27, May 5 2010.

KOKKINOS, P. Cardiorespiratory fitness, exercise, and blood pressure. **Hypertension**, v. 64, n. 6, p. 1160-4, Dec 2014.

KROGH-MADSEN, R.; PEDERSEN, M.; SOLOMON, T. P.; KNUDSEN, S. H.; HANSEN, L. S.; KARSTOFT, K.; LEHRSKOV-SCHMIDT, L.; PEDERSEN, K. K.; THOMSEN, C.; HOLST, J. J.; PEDERSEN, B. K. Normal physical activity obliterates the deleterious effects of a high-caloric intake. **J Appl Physiol (1985)**, v. 116, n. 3, p. 231-9, Feb 1 2014.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. **Hormones**

(Athens), v. 7, n. 4, p. 287-93, Oct-Dec 2008.

LAYE, M. J.; NIELSEN, M. B.; HANSEN, L. S.; KNUDSEN, T.; PEDERSEN, B. K. Physical activity enhances metabolic fitness independently of cardiorespiratory fitness in marathon runners. **Dis Markers**, v. 2015, p. 806418, 2015.

LEE, C. M.; HUXLEY, R. R.; WILDMAN, R. P.; WOODWARD, M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. **J Clin Epidemiol**, v. 61, n. 7, p. 646-53, Jul 2008.

LEITE, R. D.; DURIGAN RDE, C.; DE SOUZA LINO, A. D.; DE SOUZA CAMPOS, M. V.; SOUZA, M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BOUSKELA, E.; KRAEMER-AGUIAR, L. G. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. **Metabolism**, v. 62, n. 10, p. 1477-84, Oct 2013.

LI, B.; SHI, Z.; CASSAGLIA, P. A.; BROOKS, V. L. Leptin acts in the forebrain to differentially influence baroreflex control of lumbar, renal, and splanchnic sympathetic nerve activity and heart rate. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 812-9, Apr 2013.

LI, H.; GAO, Y.; FREIRE, C. D.; RAIZADA, M. K.; TONEY, G. M.; SUMNERS, C. Macrophage migration inhibitory factor in the PVN attenuates the central pressor and dipsogenic actions of angiotensin II. **FASEB J**, v. 20, n. 10, p. 1748-50, Aug 2006.

LI, H. W.; GAO, Y. X.; MATSUURA, T.; MARTYNYUK, A.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Adenoviral-mediated neuron specific transduction of angiotensin II type 2 receptors. **Regul Pept**, v. 126, n. 3, p. 213-22, Mar 30 2005.

LI, H. W.; GAO, Y. X.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Intronic enhancement of angiotensin II type 2 receptor transgene expression in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, n. 1, p. 29-35, Oct 14 2005.

LIANG, C. S.; GAVRAS, H. Renin-angiotensin system inhibition in conscious dogs during acute hypoxemia. Effects on systemic hemodynamics, regional blood flows, and tissue metabolism. **J Clin Invest**, v. 62, n. 5, p. 961-70, Nov 1978.

LIM, K.; BURKE, S. L.; HEAD, G. A. Obesity-related hypertension and the role of insulin and leptin in high-fat-fed rabbits. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 628-34, Mar 2013.

LIU, H.; YANG, Z.; HU, J.; LUO, Y.; ZHU, L.; YANG, H.; LI, G. Improvement of thoracic aortic vasoreactivity by continuous and intermittent exercise in high-fat diet-induced obese rats. **Biomed Rep**, v. 3, n. 4, p. 527-532, Jul 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

Long-term pharmacotherapy in the management of obesity. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. **JAMA**, v. 276, n. 23, p. 1907-15, Dec 18 1996.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 940, p. 179-96, Jun 2001.

MARK, A. L.; AGASSANDIAN, K.; MORGAN, D. A.; LIU, X.; CASSELL, M. D.; RAHMOUNI, K. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarii increases sympathetic nerve activity to the kidney. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 375-80, Feb 2009.

MASSON, G. S.; COSTA, T. S.; YSHII, L.; FERNANDES, D. C.; SOARES, P. P.; LAURINDO, F. R.; SCAVONE, C.; MICHELINI, L. C. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94927, 2014.

MATAVELLI, L. C.; HUANG, J.; SIRAGY, H. M. Angiotensin AT(2) receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 308-13, Feb 2011.

MATSUMURA, K.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1611-9, Nov 1998.

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. **Hypertension**, v. 15, n. 2 Suppl, p. I45-50, Feb 1990.

MIURA, M.; REIS, D. J. The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors. **J Physiol**, v. 223, n. 2, p. 525-48, Jun 1972.

MONTANO, N.; RUSCONE, T. G.; PORTA, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v. 90, n. 4, p. 1826-31, Oct 1994.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V. Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 6, p. R1797-806, Jun 2009.

MULROW, P. J.; GANONG, W. F. Role of the kidney and the renin-angiotensin system in the response of aldosterone secretion to hemorrhage. **Circulation**, v. 25, p. 213-20, Jan 1962.

NATHAN, M. A.; REIS, D. J. Chronic labile hypertension produced by lesions of the nucleus tractus solitarii in the cat. **Circ Res**, v. 40, n. 1, p. 72-81, Jan 1977.

NIARCHOS, A. P.; PICKERING, T. G.; CASE, D. B.; SULLIVAN, P.; LARAGH, J. H. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation. The cardiovascular effects of converting enzyme inhibition in normotensive subjects. **Circ Res**, v. 45, n. 6, p. 829-37, Dec 1979.

NOMOTO, T.; OKADA, T.; SHIMAZAKI, K.; YOSHIOKA, T.; NONAKA-SARUKAWA, M.; ITO, T.; TAKEUCHI, K.; KATSURA, K. I.; MIZUKAMI, H.; KUME, A.; OOKAWARA, S.; IKEDA, U.; KATAYAMA, Y.; OZAWA, K. Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector

prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Gene Ther**, v. 16, n. 3, p. 383-91, Mar 2009.

NONAKA-SARUKAWA, M.; OKADA, T.; ITO, T.; YAMAMOTO, K.; YOSHIOKA, T.; NOMOTO, T.; HOJO, Y.; SHIMPO, M.; URABE, M.; MIZUKAMI, H.; KUME, A.; IKEDA, U.; SHIMADA, K.; OZAWA, K. Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. **J Gene Med**, v. 10, n. 4, p. 368-74, Apr 2008.

PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Prog Brain Res**, v. 47, p. 9-34, 1977.

PATON, J. F.; KASPAROV, S. Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - a microinjection study in the rat. **J Physiol**, v. 521 Pt 1, p. 213-25, Nov 15 1999.

PAULIS, L.; BECKER, S. T.; LUCHT, K.; SCHWENGEL, K.; SLAVIC, S.; KASCHINA, E.; THONE-REINEKE, C.; DAHLOF, B.; BAULMANN, J.; UNGER, T.; STECKELINGS, U. M. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in Nomega-nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: the effect on pulse wave velocity and aortic remodeling. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 485-92, Feb 2012.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 8, p. 457-65, Aug 2012.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A.; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-53, Mar 2004.

PINHEIRO, A. R.; CUNHA, A. R.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 17, n. 5, p. 365-75, Jun 2007.

PIRES, W.; WANNER, S. P.; LIMA, M. R.; FONSECA, I. A.; FUMEGA, U.; HAIBARA, A. S.; COIMBRA, C. C.; LIMA, N. R. Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72005, 2013.

PRIOR, L. J.; EIKELIS, N.; ARMITAGE, J. A.; DAVERN, P. J.; BURKE, S. L.; MONTANI, J. P.; BARZEL, B.; HEAD, G. A. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 862-8, Apr 2010.

PUTNAM, K.; SHOEMAKER, R.; YIANNIKOURIS, F.; CASSIS, L. A. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 6, p. H1219-30, Mar 15 2012.

REHMAN, A.; LEIBOWITZ, A.; YAMAMOTO, N.; RAUTUREAU, Y.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 291-9, Feb 2012.

RICCI, G.; LAJOIE, D.; PETITCLERC, R.; PERONNET, F.; FERGUSON, R. J.; FOURNIER, M.; TAYLOR, A. W. Left ventricular size following endurance, sprint, and strength training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 14, n. 5, p. 344-7, 1982.

ROCCHINI, A. P.; MAO, H. Z.; BABU, K.; MARKER, P.; ROCCHINI, A. J. Clonidine prevents insulin resistance and hypertension in obese dogs. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 548-53, Jan 1999.

RODRIGUEZ, A.; EZQUERRO, S.; MENDEZ-GIMENEZ, L.; BECERRIL, S.; FRUHBECK, G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 309, n. 8, p. E691-714, Oct 15 2015.

ROPELLE, E. R.; FLORES, M. B.; CINTRA, D. E.; ROCHA, G. Z.; PAULI, J. R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C. T.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; GUADAGNINI, D.; MARIN, R. M.; OLIVEIRA, A. G.; AUGUSTO, T. M.; CARVALHO, H. F.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, p. 1-20, 2010.

SAAVEDRA, J. M.; FERNANDEZ-PARDAL, J.; CHEVILLARD, C. Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland. **Brain Res**, v. 245, n. 2, p. 317-25, Aug 12 1982.

SABINO, J. P.; DA SILVA, C. A.; DE MELO, R. F.; FAZAN, R., JR.; SALGADO, H. C. The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure. **Auton Neurosci**, v. 173, n. 1-2, p. 58-64, Jan 2013.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J Endocrinol**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013.

SATO, M. A.; COLOMBARI, E.; MORRISON, S. F. Inhibition of neurons in commissural nucleus of solitary tract reduces sympathetic nerve activity in SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 5, p. H1679-84, May 2002.

SATO, M. A.; MENANI, J. V.; LOPES, O. U.; COLOMBARI, E. Enhanced pressor response to carotid occlusion in commNTS-lesioned rats: possible efferent mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 5, p. R1258-66, May 2000.

SCHREIHOFER, A. M.; ANDERSON, B. K.; SCHILTZ, J. C.; XU, L.; SVED, A. F.; STRICKER, E. M. Thirst and salt appetite elicited by hypovolemia in rats with chronic lesions of the nucleus of the solitary tract. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R251-8, Jan 1999.

SCHREIHOFER, A. M.; STRICKER, E. M.; SVED, A. F. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. **Am J Physiol Regul**

Integr Comp Physiol, v. 279, n. 1, p. R239-47, Jul 2000.

SEELY, J. E.; GUZMAN, C. A.; BECKLAKE, M. R. Heart and lung function at rest and during exercise in adolescence. **J Appl Physiol**, v. 36, n. 1, p. 34-40, Jan 1974.

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

SHIMOJO, G. L.; PALMA, R. K.; BRITO, J. O.; SANCHES, I. C.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 6, p. 523-7, Jun 2015.

SILVA, S. D., JR.; ZAMPIERI, T. T.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; ARAGAO, D. S.; FERNANDES, F. B.; CASARINI, D. E.; MICHELINI, L. C. Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training - focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes. **Circ J**, v. 79, n. 6, p. 1372-80, 2015.

SPERETTA, G. F.; ROSANTE, M. C.; DUARTE, F. O.; LEITE, R. D.; LINO, A. D.; ANDRE, R. A.; SILVESTRE, J. G.; ARAUJO, H. S.; DUARTE, A. C. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 12, p. 1469-77, Dec 2012.

SRIRAMULA, S.; CARDINALE, J. P.; FRANCIS, J. Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63847, 2013.

STECKELINGS, U.; LEBRUN, C.; QADRI, F.; VELTMAR, A.; UNGER, T. Role of brain angiotensin in cardiovascular regulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 19 Suppl 6, p. S72-9, 1992.

STOCKER, S. D.; MEADOR, R.; ADAMS, J. M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 640-6, Mar 2007.

STORNETTA, R. L.; HAWELU-JOHNSON, C. L.; GUYENET, P. G.; LYNCH, K. R. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1444-6, Dec 9 1988.

STRASSER, B.; ARVANDI, M.; SIEBERT, U. Resistance training, visceral obesity and inflammatory response: a review of the evidence. **Obes Rev**, v. 13, n. 7, p. 578-91, Jul 2012.

SUMNERS, C.; DE KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; UNGER, T.; STECKELINGS, U. M. Angiotensin type 2 receptors: blood pressure regulation and end organ damage. **Curr Opin Pharmacol**, v. 21, p. 115-21, Apr 2015.

TAKAGISHI, M.; WAKI, H.; BHUIYAN, M. E.; GOURAUD, S. S.; KOHSAKA, A.; CUI, H.; YAMAZAKI, T.; PATON, J. F.; MAEDA, M. IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarius attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 1, p. R183-90, Jan 2010.

TALMAN, W. T.; PERRONE, M. H.; REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, v. 209, n. 4458, p. 813-5, Aug 15 1980.

TAN, P. S.; POTAS, J. R.; KILLINGER, S.; HORIUCHI, J.; GOODCHILD, A. K.; PILOWSKY, P. M.; DAMPNEY, R. A. Angiotensin II evokes hypotension and renal sympathoinhibition from a highly restricted region in the nucleus tractus solitarii. **Brain Res**, v. 1036, n. 1-2, p. 70-6, Mar 2 2005.

TANG, L.; LUO, K.; LIU, C.; WANG, X.; ZHANG, D.; CHI, A.; ZHANG, J.; SUN, L. Decrease in myostatin by ladder-climbing training is associated with insulin resistance in diet-induced obese rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 127, n. 12, p. 2342-9, 2014.

TER HORST, G. J.; STREEFLAND, C. Ascending projections of the solitary tract nucleus. In: BARRACO, I. R. A. (Ed.). **Nucleus of the solitary tract**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p.93-103.

TIMPSON, N. J.; HARBORD, R.; DAVEY SMITH, G.; ZACHO, J.; TYBJAERG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B. G. Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk?: Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 84-90, Jul 2009.

TORVIK, A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 106, n. 1, p. 51-141, Nov 1956.

TUCK, M. L. Obesity, the sympathetic nervous system, and essential hypertension. **Hypertension**, v. 19, n. 1 Suppl, p. I67-77, Jan 1992.

TUCKER, L. A.; KANO, M. J. Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. **Am J Clin Nutr**, v. 56, n. 4, p. 616-22, Oct 1992.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v. 89, n. 2A, p. 3A-9A; discussion 10A, Jan 24 2002.

VAN DE BORNE, P.; MONTANO, N.; PAGANI, M.; OREN, R.; SOMERS, V. K. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1449-54, Mar 18 1997.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 2, p. 191-202, May 2003.

VIEIRA, A. A.; COLOMBARI, E.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, D. S.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. **Brain Res**, v. 1322, p. 72-80, Mar 31 2010.

VIEIRA, V. J.; VALENTINE, R. J.; WILUND, K. R.; ANTAO, N.; BAYNARD, T.; WOODS, J. A. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, May

2009.

VILLELA, D.; LEONHARDT, J.; PATEL, N.; JOSEPH, J.; KIRSCH, S.; HALLBERG, A.; UNGER, T.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; SUMNERS, C.; STECKELINGS, U. M. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. **Clin Sci (Lond)**, v. 128, n. 4, p. 227-34, Feb 2015.

WAKI, H.; GOURAUD, S. S.; MAEDA, M.; PATON, J. F. Gene expression profiles of major cytokines in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive rat. **Auton Neurosci**, v. 142, n. 1-2, p. 40-4, Nov 3 2008.

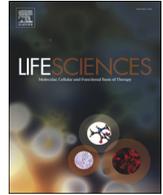
WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 1, p. 133-51, Jan 2013.

XUE, B.; THUNHORST, R. L.; YU, Y.; GUO, F.; BELTZ, T. G.; FELDER, R. B.; JOHNSON, A. K. Central Renin-Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II-Elicited Hypertension. **Hypertension**, Nov 16 2015.

ZHANG, Y.; GAO, Y.; SPETH, R. C.; JIANG, N.; MAO, Y.; SUMNERS, C.; LI, H. Adenoviral and adeno-associated viral vectors-mediated neuronal gene transfer to cardiovascular control regions of the rat brain. **Int J Med Sci**, v. 10, n. 5, p. 607-16, 2013.

ZUBCEVIC, J.; JUN, J. Y.; LAMONT, G.; MURCA, T. M.; SHI, P.; YUAN, W.; LIN, F.; CARVAJAL, J. M.; LI, Q.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M. K.; SHAN, Z. Nucleus of the solitary tract (pro)renin receptor-mediated antihypertensive effect involves nuclear factor-kappaB-cytokine signaling in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 622-7, Mar 2013.

APÊNDICE



Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet



Guilherme F. Speretta^a, André A. Silva^a, Regina C. Vendramini^b, Angelina Zanesco^c, Maria A. Delbin^d, José V. Menani^a, Mirian Bassi^a, Eduardo Colombari^a, Débora S.A. Colombari^{a,*}

^a Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

^b Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^c Department of Physical Education, Institute of Bioscience, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

^d Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2015

Received in revised form 4 December 2015

Accepted 7 January 2016

Available online 9 January 2016

Keywords:

Obesity
Hypertension
Baroreflex
Renin-angiotensin system
Nucleus of the solitary tract
Brainstem

ABSTRACT

Aims: Aerobic exercise is indicated for prevention and treatment of obesity-induced cardiovascular disorders. Although the resistance training (RT) may also produce effects similar to aerobic exercise, this is not completely clear yet. In the present study, we tested if RT in moderate intensity might prevent alterations in blood pressure (BP), sympathetic modulation of systolic blood pressure (SBP), baroreflex function and the changes in renin-angiotensin system (RAS) and cytokines mRNA expression within the nucleus of the tract solitary (NTS) in rats fed with high-fat diet (HFD).

Main methods: Male Holtzman rats (300–320 g) were divided into 4 groups: sedentary with standard chow diet (SED-SD); sedentary with high-fat diet (SED-HFD); RT with standard chow diet (RT-SD); and RT with high-fat diet (RT-HFD). The trained groups performed a total of 10 weeks of moderate intensity RT in a vertical ladder. In the first 3 weeks all experimental groups were fed with SD. In the next 7 weeks, the SED-HFD and RT-HFD groups were fed with HFD.

Key findings: In SED-HFD, BP and sympathetic modulation of SBP increased, whereas baroreflex bradycardic responses were attenuated. RT prevented the cardiovascular and inflammatory responses (increases in tumoral necrosis factor- α and interleukin-1 β) produced by HFD in SED rats. The anti-inflammatory interleukin-10, angiotensin type 2 receptor, Mas receptor and angiotensin converting enzyme 2 mRNA expressions in the NTS increased in the RT-HFD compared to SED-HFD.

Significance: The data demonstrated that moderate intensity RT prevented obesity-induced cardiovascular disorders simultaneously with reduced inflammatory responses and modifications of RAS in the NTS.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Excessive fat accumulation, particularly in the visceral adipose tissue, is associated with chronic inflammation in different tissues, including the brain, causing metabolic changes which favor the development of degenerative diseases such as cardiovascular disorders [10,14,47]. In this regard, impairment of baroreflex sensitivity, increased sympathetic nerve activity (SNA), increase in the renin angiotensin system (RAS) and high blood pressure (BP) have been described in this situation [7, 15,29,49].

The RAS components are found in the main areas of the brain involved in cardiovascular control, including the nucleus of the tract

solitary (NTS) [31], the primary site of baroreceptor afferents in the dorsal hindbrain [9]. It has been shown that the activation of AT₁ receptors in the NTS attenuates baroreflex sensitivity [32,36] and angiotensinergic mechanisms in the NTS contribute to the development of different models of hypertension [5,18,22,54]. In young obese rats, it was demonstrated that AT₁ receptors are augmented in the NTS [13]. Additionally, chronic inflammation in the NTS is suggested to be involved in the etiology of neurogenic hypertension [53,54] and the microinjection of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) in the NTS blunts the baroreflex function in rats [50]. Interestingly, recent studies have described an interaction between inflammation and the RAS in the brain as a mechanism involved with different models of cardiovascular disorders including those produced by obesity [1,11,44,48].

Aerobic exercise is an important non-pharmacological intervention to prevent or treat hypertension [28,37]. In animals, the obesity-associated mild hypertension decreased after aerobic exercise [38] and the full development of hypertension was prevented with aerobic exercise in pre-hypertensive spontaneously hypertensive rats (SHR) [1,18].

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara 14801-903, SP, Brazil.

E-mail address: deborac@foar.unesp.br (D.S.A. Colombari).

Aerobic exercise also decreases the mRNA levels of angiotensinogen in the NTS in hypertensive SHR [18].

Similar to aerobic exercise, resistance training (RT) also produces positive effects on the cardiovascular system of hypertensive rats [16, 29,45]. High intensity RT attenuated the increase in adiposity and the development of mild hypertension [29], and ameliorated the changes of metabolism in obese rats [47], which suggests that similar to aerobic exercise, RT could be an intervention to treat the deleterious changes in metabolism and cardiovascular system found in obese rats. Therefore, the purpose of the present study was to test if moderate intensity RT prevents the alterations in BP, sympathetic modulation of systolic blood pressure (SBP) and baroreflex function in HFD feeding rats. In addition, no study has investigated in HFD feeding rats the formation of pro- and anti-inflammatory cytokines or the RAS components in the NTS, a key area of the brainstem for cardiovascular control [5,22,32, 36]. Then, we also tested if the positive effects of RT in the cardiovascular system were accompanied by alterations in RAS and cytokines mRNA expression in the NTS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A total number of 40 male Holtzman rats weighing 300–320 g were used. The animals were maintained in collective polypropylene cages (2 or 3 animals per cage) with food (please see composition below) and water provided ad libitum in a room with controlled temperature (23 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$). Lights were on from 7:00 am to 7:00 pm. Ethics Committee for Animal Care and Use of the Dental School of Araraquara, UNESP, approved the experimental protocols used in the present study (protocol number CEUA15/2013) and it has been carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

2.2. Experimental design

The experimental groups received standard rat chow diet (Biobase, Águas Frias, SC, Brazil), named standard diet (SD) or high-fat diet (HFD). Bromatological analysis (Engeali, São José do Rio Preto, SP, Brazil) determined that SD contained 22 g of protein, 48 g of carbohydrates, 4 g of total fat, 8 g of fiber and 200 mg of sodium per 100 g of diet. HFD was composed of standard rat chow plus peanuts, milk chocolate, and sweet biscuits in a proportion of 3:2:2:1 as previously described [47] and contained 13 g of protein, 40 g of carbohydrate, 19 g of total fat, 4 g of fiber and 73 mg of sodium per 100 g of diet. The caloric values of the diets were approximately 2.25 kcal/g for the SD and 3.82 kcal/g for HFD. Body weight and food intake were recorded 3 times a week.

Rats were divided into four experimental groups balanced to ensure equal initial body weight and maximum voluntary carrying capacity (MVCC) across groups: sedentary (SED) with SD (SED-SD); SED with HFD (SED-HFD); resistance training (RT) with SD (RT-SD); and RT with HFD (RT-HFD). Trained groups performed 10 weeks of RT on ladder at 50–60% of MVCC, 3 days a week (Mondays, Wednesdays and Fridays). Each training session consisted of 15–20 ladder climbs with a 30 s rest interval between climbs. The maximal voluntary carrying test was repeated every 2 weeks until the week 8. Sedentary rats also performed MVCC tests at the same time intervals as indicated for the trained animals, but otherwise remained in their cages and did not undergo to the training protocol. All groups were fed with standard chow diet until the end of the week 3 of RT to guarantee an increase in physical fitness observed by MVCC in the trained groups (RT-SD and RT-HFD) before offering the HFD. After that both HFD (SED-HFD and RT-HFD) groups were fed with HFD for 7 weeks.

24 h after the last RT session, the rats were submitted to 8 h of fasting to conduct insulin tolerance test (ITT) and blood glucose levels

measurement. Two days later, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in conscious freely moving rats. Baroreflex tests started at least 20 min after connecting the arterial cannula to the recording system. In the next day, the rats were decapitated after 12 h of fasting for collection of blood sample to analyze the levels of insulin, total cholesterol, triglycerides (TGL) and high-density lipoprotein (HDL). The brains were removed to analyze mRNA expression and the adipose tissue to analyze relative weight.

2.3. Resistance training

The RT protocol was adapted from Hornberger & Farrar [26]. The rats were adapted to the RT protocol by climbing a vertical ladder (1.1 m; 0.18 m, 2-cm grid, 80° inclination) with a load apparatus without weight. The load apparatus was fixed to the tail by wrapping its proximal portion with a self-adhesive foam strip. With the load apparatus fixed to the tail, each rat was placed at the bottom of the ladder and familiarized with the climbing procedure. If necessary, a stimulus with tweezers was applied to the animal's tail to initiate movement. When the rats reached the top of the ladder (house chamber), they were allowed to rest for 60 s. This procedure was repeated until they would voluntarily climb the ladder for three consecutive turns without any stimuli. This procedure was repeated for two non consecutive days.

Two days after the adaptation procedures, each animal performed a test in order to evaluate its MVCC that consisted of climbs with progressive heavier loads. The initial climb was performed with 75% of the animal's body mass and additional 30-g weight loads was added in the next climbs until the rat could not climb the entire length of the ladder. The highest load that the animal successfully carried the entire length of the ladder was considered the MVCC for that training session. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli to the tail.

Two days after the MVCC test, RT protocol was performed as described above in the Experimental Design.

2.4. Drugs

Phenylephrine [5 µg/kg of body weight (wt.)] and sodium nitroprusside (30 µg/kg of body wt.) purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) were injected i.v. for the baroreflex tests. The drugs were diluted in saline.

2.5. Arterial pressure recording and baroreflex function

MAP and HR were recorded in conscious freely moving rats. 48 h after the last RT session the rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg of body wt.); Cristália, Itapira, SP, Brazil] and xylazine (7 mg/kg of body wt.; Agener Union, Embu, SP, Brazil) and under aseptic conditions the femoral artery and vein were isolated and cannulated with polyethylene tubes (PE-10 connected to a PE-50) filled with saline. The catheters were exteriorized between the scapulae and fixed on the back of the animal to allow MAP and HR recording in freely moving animals. The femoral vein catheter was used to drugs administrations.

To record pulsatile arterial pressure, MAP and HR in conscious unrestrained, freely moving animals, the arterial catheter was connected to a Statham Gould (P23 Db; El Segundo, CA, USA) pressure transducer coupled to a pre-amplifier (model ETH-200 Bridge Bio Amplifier, Chicago, IL, USA) that was connected to a Powerlab computer data acquisition system (model Powerlab 16SP, ADInstruments, Colorado Springs CO, USA). After a baseline period of cardiovascular recordings, rats received i.v. injections of phenylephrine (5 µg/kg of body wt.) or sodium nitroprusside (SNP; 30 µg/kg of body wt.) to test the HR reflex responses to pressor and depressor stimuli, respectively. We analyzed the one-second mean HR values in response to 10 mm Hg incremental changes in MAP, starting in 5 mm Hg up to a maximal change of 35 mm Hg. The values were plotted and a linear regression was performed for each

animal, and the slope of each linear regression was used to calculate the differences between groups.

2.6. Cardiovascular variability

The pulse interval (PI) and systolic blood pressure (SBP) variability analysis were performed using a custom computer software (CardioSeries v2.4 – <http://www.danielpenteado.com>), as described previously [5,39,42]. Briefly, beat-by-beat series obtained from pulsatile arterial pressure recordings were converted to data points every 100 ms using cubic spline interpolation (10 Hz). The interpolated series was divided into half-overlapping sequential sets of 512 data points (51.2 s). Before calculation of the spectral power density, segments were visually inspected and non-stationary data were not taken into consideration. A Hanning window was used to attenuate side effects and the spectrum was computed using a direct FFT algorithm for discrete time series. The spectra were integrated in low-frequency (LF; 0.2–0.75 Hz) and high-frequency (HF; 0.75–3 Hz) bands, and results are expressed in absolute for SBP (mm Hg²) and normalized units (nu) for PI. The normalized values were achieved by calculating the percentage of LF and HF power with regard to the total power of spectrum minus very low frequency band (VLF; <0.2 Hz) power [4,52]. To assess the sympathovagal balance, LF/HF ratio of PI variability was calculated [33]. LF of SBP is an index of the sympathetic vasoconstrictor tone, whereas LF and HF of PI are index of sympathetic and parasympathetic modulation of the PI.

2.7. Insulin tolerance test

Insulin sensitivity was measured by insulin tolerance test (ITT) and the rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula $0.693/\text{biological half-life } (t_{1/2})$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentration during linear phase of decline [6,12]. Rats were submitted to an ITT after 8 h of fasting. Human recombinant insulin (Novolin R, Novo Nordisk, Montes Claros, MG, Brazil) was administered at dose of 2.0 U/kg, i.p. and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 min from tail vein and blood glucose was measured using standard test strips (One Touch UltraMini/Johnson & Johnson, Milpitas, CA, USA). The ITT is expressed as Kitt (%/min), meaning the percentage of plasma glucose concentration decline per minute [12].

2.8. Blood and tissue collection

The animals were anesthetized with halothane (4% in 100% O₂) and immediately decapitated. Blood was collected in EDTA coated tubes for plasma insulin analyses and non-coated tubes for lipid profile and glucose measurements. Blood was centrifuged (1200 g for 10 min at 4 °C). Insulin levels were analyzed using commercially available ELISA kits, following the instructions of the manufacturer (ALPO, Salem, NH, USA). The triglycerides (TGL), total cholesterol, and high-density lipoprotein (HDL) concentrations were determined enzymatically (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), using automation equipment Labmax 240 (Hirose Electronic System CO, Nishinasuno, Japan). After blood collection, the brains were quickly removed, immediately frozen on dry ice and stored at –80 °C for subsequent mRNA extraction (described below). Finally, retroperitoneal (RET), epididymal (EPI) and mesenteric (MES) white adipose tissues were removed and weighed.

2.9. qRT-PCR analyses in the NTS

We evaluated the mRNA levels in the NTS of tumor necrosis factor α (TNF- α ; Rn99999017_m1), interleukin-1 β (IL-1 β ; Rn99999009_m1), interleukin-6 (IL-6; Rn01410330_m1); interleukin-10 (IL-10; Rn99999012_m1), angiotensin type-1

receptor (AT₁; Rn01435427_m1), angiotensin type-2 receptor (AT₂; Rn00560677_s1), Mas receptor (Mas; Rn00562673_s1), angiotensin-converting enzyme (ACE; Rn00561094_m1), angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2; Rn01416293_m1). The NTS was removed by micropunch with the aid of a surgical microscope using the area postrema and *calamus scriptorius* as reference sites. Total RNA was extracted using b-mercaptanol and isolated using a PureLink® RNA mini kit (Life technologies, Grand Island, USA). The isolated RNA was converted in cDNA using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life technologies, Grand Island, USA) and samples were run in duplicate using a StepOne Real-time PCR system, Taqman Universal Gene Expression Master Mix and validated Taqman probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression patterns of genes of interest were normalized to constitutively-expressed 18 s (Hs9999901_s1) and relative expression was quantified using the 2^{ΔΔCt} method [30].

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM. One or two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post hoc were used for comparisons as appropriate. Differences were taken as significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight and MVCC in rats on high-fat diet performing resistance training

Body weight was measured weekly and the MVCC was adjusted every two weeks to guarantee that the intensity of exercise would be maintained between 50 and 60% during the 10 weeks of RT and to compare the relative intensity between SD and HFD groups. Baseline body weight before the commencing of the experimental protocol was similar in all experimental groups and all rats had a similar increase of body weight during the first 8 weeks of RT (5 weeks of HFD). At week 9 (6 weeks of HFD) the SED-HFD group showed increased body weight compared to SED-SD, and at week 10 (7 weeks of HFD) both HFD groups (SED-HFD and RT-HFD) showed similar increased body weight compared to their control groups (SED-SD and RT-SD, respectively) [$F(3,352) = 16.94$; $P < 0.0001$] (Fig. 1A).

The MVCC was similar among all groups at the beginning of the training protocol (week 0). RT increased the MVCC similarly in SD and HFD groups from week 4 until the end of the experimental period [$F(3,80) = 72.18$; $P < 0.0001$] (Fig. 1B). The number of climbs per session was not different between RT groups (RT-HFD: 16.8 ± 0.3 vs. RT-SD: 16.9 ± 0.3 climbs/session) [$F(1,232) = 1.054$; $P = 0.3057$].

3.2. Adiposity and metabolic changes in rats on high-fat diet performing resistance training

Considering that high intensity RT reduces body weight and adiposity [29,47], the impact of moderate RT on adiposity and metabolic changes in HFD feeding animals were evaluated. After 10 weeks (7 weeks of HFD), both HFD groups exhibited increased relative weight of epididymal, retroperitoneal and mesenteric adipose tissue [$F(3,24) = 7.07$, $P = 0.0014$; $F(3,24) = 16.90$, $P < 0.0001$; and $F(3,24) = 9.04$, $P = 0.0003$, respectively] (Table 1). Total cholesterol [$F(3,16) = 8.24$; $P = 0.0015$] and triglycerides [$F(3,16) = 5.86$; $P = 0.0067$] also increased in sedentary HFD group. RT prevented the increase in total cholesterol in HFD rats (Table 1).

In sedentary HFD group, fasting blood glucose [$F(3,28) = 3.20$, $P = 0.0385$] and blood insulin levels increased [$F(3,20) = 8.34$, $P = 0.0009$], whereas insulin sensitivity was reduced [$F(3,31) = 4.84$, $P = 0.0071$]. RT prevented the increase in blood glucose levels and the decrease in insulin sensitivity and slightly decreased the concentration of insulin (not statistically different) in HFD rats (Table 1).

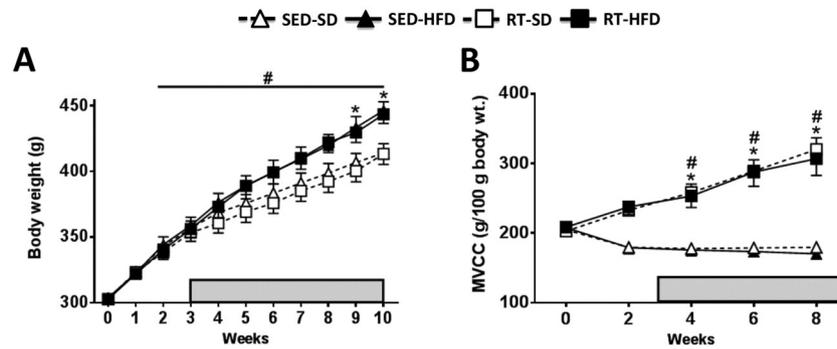


Fig. 1. (A) Body weight and (B) maximal voluntary carrying capacity (MVCC) of sedentary (SED) and resistance trained (RT) rats fed with standard chow diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 7 weeks. The results are presented as means \pm SEM. The bar indicates the period of HFD administration. Two-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. *Different from SD groups; #different from week 0; $P < 0.05$. In (A) the number of animals was 9 in all groups and in (B) the number of animals was 5 in all groups.

3.3. MAP, HR and baroreflex in rats on high-fat diet performing resistance training

To test if RT could prevent the cardiovascular changes induced by HFD, MAP, HR, baroreflex function and cardiovascular variability were assessed. After 10 weeks (7 weeks of HFD), MAP increased in HFD sedentary rats (119 ± 1 , vs. SED-SD: 107 ± 2 mm Hg) (Fig. 2A). RT prevented the increase in MAP produced by HFD (109 ± 2 mm Hg), without changing MAP in rats with SD (106 ± 4 mm Hg) [$F(3,28) = 4.46$; $P = 0.0110$] (Fig. 2A). HR also increased in sedentary HFD rats (370 ± 7 , vs. SED-SD: 341 ± 3 bpm), an effect prevented by RT (336 ± 11 bpm) [$F(3,28) = 3.73$; $P = 0.0225$]. RT did not change HR in SD rats (339 ± 12 , vs. SED-SD: 341 ± 3 bpm; $P > 0.05$) (Fig. 2B).

The bradycardic response to baroreflex activation was impaired in sedentary rats fed with HFD (SED-HFD slope: -1.24 ± 0.15 , vs. SED-SD slope: -2.38 ± 0.22 bpm/mm Hg). RT prevented these alterations in HFD fed rats (RT-HFD slope: -2.76 ± 0.23 bpm/mm Hg), without changing baroreflex bradycardia in SD rats (RT-SD slope: -2.41 ± 0.19 bpm/mm Hg), [$F(3,24) = 10.02$; $P = 0.0002$] (Fig. 2C). The tachycardic response to baroreflex activation was similar between groups [$F(3,24) = 0.46$; $P = 0.71$] (Fig. 2C).

In the sedentary HFD group, the spectral analysis of SBP showed increased LF of SBP (8.49 ± 0.59 , vs. SED-SD: 4.96 ± 0.37 mm Hg²), [$F(3,26) = 4.70$; $P = 0.0094$], LF of PI [45 ± 2 , vs. SED-SD: 22 ± 1 normalized unit (nu)], [$F(3,26) = 14.98$; $P < 0.0001$] and LF/HF ratio of PI (0.77 ± 0.07 , vs. SED-SD: 0.29 ± 0.02), [$F(3,26) = 18.13$; $P < 0.0001$] and reduced HF of PI (57 ± 2 , vs. SED-SD: 78 ± 2 nu), [$F(3,26) = 6.91$; $P < 0.0014$]. RT prevented the changes in the LF of SBP in HFD group (RT-HFD: 6.29 ± 1.06 mm Hg²), LF of PI (RT-HFD: 34 ± 3 nu), LF/HF ratio of PI (RT-HFD: 0.58 ± 0.03) and HF of PI (RT-HFD: 69 ± 5 nu) (Fig. 3).

Table 1

Adiposity and plasma measurements in sedentary rats fed with standard chow diet (SED-SD), sedentary rats fed with high-fat diet (SED-HFD), resistance training rats fed with standard chow diet (RT-SD), and resistance training rats fed with high-fat diet (RT-HFD).

	SED-SD	SED-HFD	RT-SD	RT-HFD
Epididymal adipose tissue (g/100 g body wt.)	0.40 ± 0.05	$0.68 \pm 0.09^*$	0.35 ± 0.01	$0.62 \pm 0.05^*$
Retroperitoneal adipose tissue (g/100 g body wt.)	0.45 ± 0.04	$1.02 \pm 0.14^*$	0.49 ± 0.14	$1.20 \pm 0.08^*$
Mesenteric adipose tissue (g/100 g body wt.)	0.40 ± 0.05	$0.65 \pm 0.08^*$	0.41 ± 0.03	$0.76 \pm 0.05^*$
Total cholesterol (mg/dl)	55 ± 3.4	$107 \pm 14.1^*$	64 ± 3.1	$80 \pm 5.6^{\#}$
HDL (mg/dl)	31.4 ± 2.8	31 ± 3.0	34.8 ± 3.7	32.8 ± 3.2
TGL (mg/dl)	46 ± 1.3	$70 \pm 4.5^*$	57 ± 4.5	56 ± 4.6
Blood glucose (mg/dl)	94 ± 3	$106 \pm 2^*$	96 ± 4	$95 \pm 2^{\#}$
Kitt (%/min)	4.62 ± 0.33	$3.35 \pm 0.26^*$	5.01 ± 0.46	$5.17 \pm 0.35^{\#}$
Insulin (ng/ml)	0.63 ± 0.17	$1.45 \pm 0.11^*$	0.61 ± 0.13	$1.13 \pm 0.13^*$

All values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. HDL: High-density lipoprotein; TGL: triacylglycerol. Kitt (%/min): percentage of plasma glucose concentration decline per minute. Total cholesterol, HDL, TGL and insulin levels were measured after 12 h fasting and glucose levels after 8 h fasting.

* Different from SD groups.

Different from SED-HFD; $P < 0.05$ ($n = 5-7$ /group).

3.4. RAS components and cytokines mRNA expression in the NTS in rats on high-fat diet performing resistance training

Seeking the mechanisms for positive effects induced by RT on cardiovascular system, we analyzed the alterations in the RAS components and cytokines mRNA expression in the NTS, a key area in the brainstem involved with cardiovascular regulation. In HFD sedentary rats, AT₁ receptor mRNA expression increased (3.10 ± 0.12 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.06 fold change), [$F(3,13) = 25.69$; $P < 0.0001$] and AT₂ receptor mRNA expression decreased in the NTS (0.68 ± 0.11 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.07 fold change), [$F(3,13) = 4.97$; $P = 0.016$]. RT prevented the decrease in AT₂ receptor expression (RT-HFD: 1.01 ± 0.05 fold change), without changing the increase in AT₁ receptor expression (RT-HFD: 3.68 ± 0.42 fold change). In trained rats fed with HFD, Mas mRNA expression in the NTS also increased (RT-HFD: 1.55 ± 0.19 fold change) compared to sedentary rats fed with HFD (SED-HFD: 0.70 ± 0.11), [$F(3,13) = 4.72$; $P = 0.019$]. In both trained groups, ACE2 mRNA expression in the NTS increased compared to their control groups (RT-HFD: 2.62 ± 0.23 , vs. SED-HFD: 0.89 ± 0.06 ; RT-SD: 3.45 ± 0.64 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.06 ; fold change), [$F(3,13) = 13.49$; $P = 0.0003$]. There was no significant change in ACE mRNA levels in the NTS of all groups [$F(3,13) = 1.27$; $P = 0.32$] (Fig. 4).

At the end of experimental protocol, sedentary HFD rats presented increased TNF- α (SED-HFD: 1.90 ± 0.26 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.07 fold change), [$F(3,13) = 4.07$; $P = 0.030$] and IL-1 β mRNA expression in the NTS (SED-HFD: 2.31 ± 0.13 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.10 fold change), [$F(3,13) = 7.53$; $P = 0.0036$] and reduced IL-10 (SED-HFD: 0.50 ± 0.04 , vs. SED-SD: 1.00 ± 0.10 fold change), [$F(3,13) = 11.30$; $P = 0.0006$] mRNA expression levels in the NTS. RT prevented the changes in TNF- α (RT-HFD: 1.15 ± 0.25 fold change), IL-1 β (RT-HFD: 1.10 ± 0.27 fold change) and IL-10 mRNA expression in the NTS (RT-HFD:

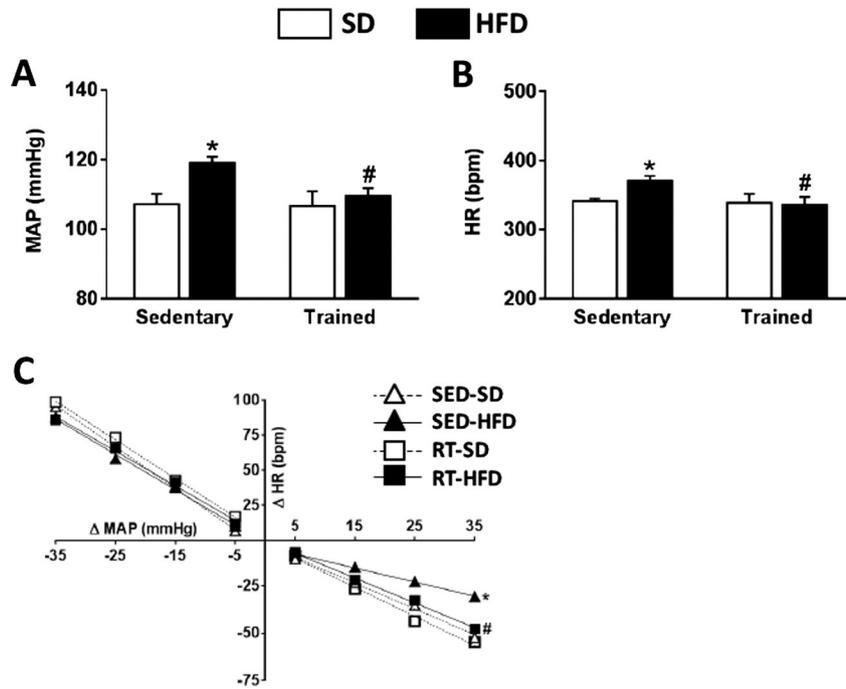


Fig. 2. (A) Mean arterial pressure (MAP), (B) heart rate (HR) and (C) baroreflex function in sedentary (SED) and resistance trained (RT) rats fed with standard chow diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 7 weeks. The results are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. *Different from SD groups; #different from SED-HFD; $P < 0.05$. SED-SD, $n = 9$ rats; SED-HFD, $n = 9$ rats; RT-SD, $n = 8$ rats and RT-HFD, $n = 7$ rats.

1.04 ± 0.69 fold change). The IL-6 mRNA expression in the NTS was similar in all groups [$F(3,13) = 1.58$; $P = 0.24$] (Fig. 5).

4. Discussion

The present results demonstrated that moderate intensity RT prevented the cardiovascular changes induced by HFD including increase in MAP, sympathetic modulation of SBP and impaired baroreflex sensitivity. These responses were associated with an improvement in the protective axis of the RAS components (AT_2 and Mas receptors

and ACE2) and a reduction in inflammatory responses in the NTS, without changing the increased AT_1 receptors mRNA expression in this area.

HFD increased body and adipose tissue weights that are associated with metabolic alterations like increased blood insulin and glucose levels, reduced insulin sensitivity as well as alterations in lipid profile in sedentary animals [13,15,29,47]. The present results showed that RT prevents cardiovascular and metabolic disorders produced by HFD independently of the increase in body weight and adiposity. Contrasting with the present study, it was previously demonstrated that RT performed on ladder, attenuated the increase in body weight induced by

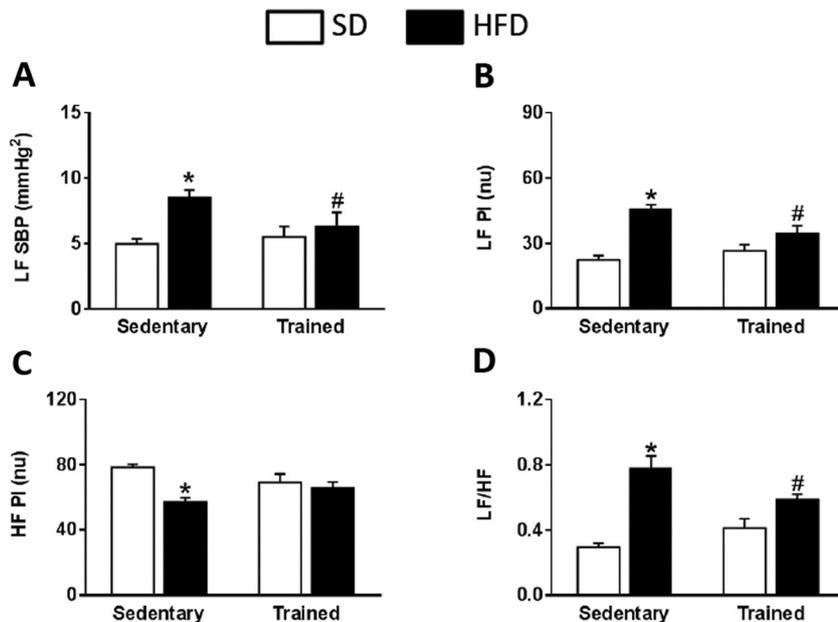


Fig. 3. (A) Low frequency (LF) of systolic arterial pressure (SBP), (B) LF of pulse interval (PI), (C) High frequency (HF) of PI and (D) LF/HF ratio of PI in sedentary (SED) and resistance trained (RT) rats fed with standard chow diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 7 weeks. The results are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. *Different from SD groups; #different from SED-HFD; $P < 0.05$. SED-SD, $n = 9$ rats; SED-HFD, $n = 7$ rats; RT-SD, $n = 7$ rats; RT-HFD, $n = 7$ rats.

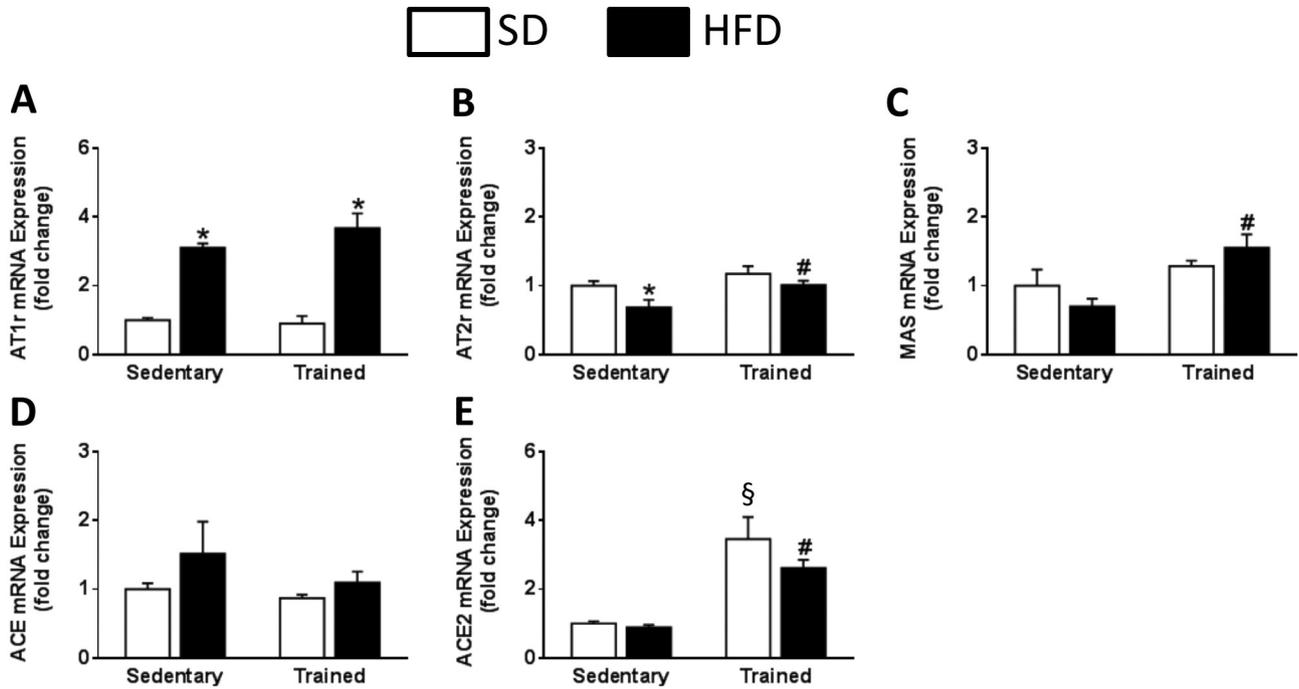


Fig. 4. Fold change in mRNA expression levels of (A) angiotensin II type 1 receptor (AT₁), (B) angiotensin II type 2 receptor (AT₂), (C) Mas receptor, (D) angiotensin converting enzyme (ACE) and (E) angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in sedentary (SED) and resistance trained (RT) rats fed with standard chow diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 7 weeks. The results are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. *Different from SD groups; #different from SED-HFD; §different from SED-SD; P < 0.05. SED-SD, n = 4 rats; SED-HFD, n = 4 rats; RT-SD, n = 4 rats and RT-HFD, n = 5 rats.

HFD [29,47]. These differences may rely on the different intensity of exercise used in the present and previous studies. Resting energy expenditure and fat oxidation post RT seems to occur in an intensity-dependent manner in overweight individuals [17]. Therefore, the moderate intensity exercise (all the climbs with 50–60% of MVCC) in contrast to the high intensity exercise used in previous studies (first climb with 50%

of MVCC and last climb with at least 100% of MVCC) may explain the difference between studies [29,47].

We also observed that RT prevented the decrease in insulin sensitivity and the rise in glucose blood levels, effects that might be associated to increased glucose transporter type 4 (GLUT4) protein expression in the skeletal muscle of trained animals [51]. RT also prevented the

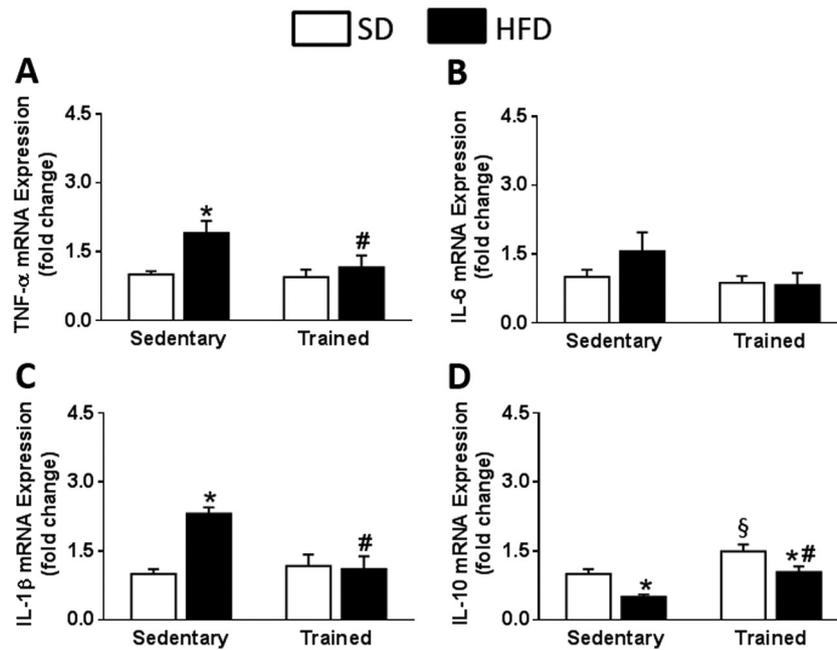


Fig. 5. Fold change in mRNA expression levels of (A) tumoral necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukyn-1 β (IL-1 β), (C) interleukyn-6 (IL-6) and interleukyn-10 (IL-10) in sedentary (SED) and resistance trained (RT) rats fed with standard chow diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 7 weeks. The results are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. *Different from SD groups; #different from SED-HFD; §different from SED-SD; P < 0.05. SED-SD, n = 4 rats; SED-HFD, n = 4 rats; RT-SD, n = 4 rats and RT-HFD, n = 5 rats.

alterations in lipid profile in rats fed with HFD. These results are consistent with a clinical study that demonstrated decreases in the SBP, improvement in the lipid profile and decreases in plasma inflammatory cytokines without weight loss or waist-to-rip reduction after aerobic exercise training in overweight patients with type II diabetes [27]. Changes in plasma levels of pro-inflammatory cytokines are associated with insulin resistance [19,24] and low circulating levels of pro-inflammatory cytokines are associated with a regular physical activity [20]. Although not tested in the present study, a decrease in plasma levels of pro-inflammatory cytokines might also account for the improvement of the metabolic alterations found in RT-HFD feeding rats.

Evidence shows that RT also promotes cardiac remodeling and increases in the endothelium-mediated vasodilatation which were effective for the treatment of obesity-induced hypertension [29] and the hypertension in SHR, a neurogenic model of hypertension [16]. The present study demonstrated that baroreflex impairment present in sedentary HFD fed rats was improved after RT. In addition, the increase in the sympathetic modulation SBP (an index of vasomotor sympathetic activity) was prevented by RT. HFD increases the activity of the renin-angiotensin system [7,11] and the peripheral blockade of AT₁ receptors with losartan seems to reduce obesity-induced hypertension [7]. In the brain, it is well known that Ang II acting on the AT₁ receptors in the NTS blunts the baroreflex sensitivity [32,36] and angiotensinergic mechanisms in the NTS is involved with the maintenance of different forms of hypertension [5,22,44,54]. In spite of the improvement of the baroreflex and the attenuation of the sympathetic modulation of the SBP, the increased AT₁ mRNA expression in the NTS detected in HFD sedentary rats was not modified by RT, which is similar to a previous study that demonstrated that aerobic exercise promoted falls in BP in SHR in spite of the increased AT₁ mRNA expression in the NTS [18].

The activation of AT₂ receptors can oppose the actions of Ang II on AT₁ receptors in the cardiovascular system [23]. Recently, we demonstrated that the increased expression of AT₂ receptors in the NTS attenuated the renovascular hypertension, decreasing the sympathetic modulation of SBP and improving baroreflex function in these animals [5]. In the present study, RT increased mRNA levels of AT₂ and Mas receptors and ACE2 in the NTS. ACE2 is an enzyme that has a high catalytic activity converting Ang II to angiotensin-(1-7) [21], and angiotensin-(1-7), acting in the NTS, increases baroreflex sensitivity and decreases arterial pressure [8]. Considering that AT₂ receptors and the ACE2/Ang-(1-7)-Mas receptors are part of the protective axis of the RAS, the increased mRNA levels of AT₂ and Mas receptors and ACE2 in the NTS might be the reason for the reduction of arterial pressure and improvement of the baroreflex in HFD trained rats, in spite of the high levels of AT₁ receptors. Indeed, preliminary data from our laboratory demonstrated that although AT₂ overexpression in the NTS was not able to blunt the mild-hypertension induced by HFD, it was effective to improve the baroreflex in this condition. Thus, it is possible that the increase in the expression of AT₂ receptors in the NTS produced by RT might be involved with some of the cardiovascular improvement observed in HFD feeding rats. However, it seems this is not sole mechanism. Thus, it is possible that changes in other components of the protective RAS pathway such as Mas receptors and ACE2 and/or cytokines in the NTS might also be important for the alterations in blood pressure in HFD feeding rats submitted to RT.

The reduction in the vasoconstrictor axis towards the protective axis of the RAS was also found in other tissues in animals submitted to aerobic exercise [25,46]. For instance, it was demonstrated that aerobic exercise caused a shift in RAS in skeletal muscle towards the ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis in rats with congestive heart failure [25] and reduced the vasoconstrictor axis of RAS in renal arteries of SHRs [46]. Together, these data demonstrated that aerobic exercise and RT are modulators of the RAS components in the tissues producing either an increase in the protective axis and/or a reduction in the hypertensive axis.

The mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β increased and the mRNA expression of the anti-inflammatory

cytokine IL-10 decreased in the NTS of HFD sedentary rats, suggesting a chronic low-grade inflammation in this nuclei, a response prevented by RT. Our data are in line with a previous study that showed increases in IL-10 mRNA expression in the hypothalamus of HFD feeding rats performing a single session of moderate intensity aerobic exercise [41]. Hypertensive stimuli like HFD activate astrocytes and microglia (central nervous system immune resident cells) that are involved in the production and release of pro-inflammatory cytokines in the brain [11]. Microinjection of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) in the NTS blunts the baroreflex function in rats [50] and sustained increases in systemic levels of IL-10 decrease pro-inflammatory cytokines in the heart and kidney decreasing blood pressure in SHR and Dahl salt-sensitive rats [34,35]. Thus, decreased levels of inflammatory and increased levels of anti-inflammatory cytokines observed in the NTS may have beneficial effects in the baroreflex sensitivity and sympathetic modulation of SBP, preventing the increase in MAP in RT-HFD fed rats.

An interaction between inflammation and the RAS in the brain as a mechanism involved with different models of cardiovascular disorders, including those produced by obesity has been suggested [1,11,44,48]. For instance, intracerebroventricular infusion of minocycline, an anti-inflammatory antibiotic, resulted in attenuation of the pressor response to chronic Ang II infusion and reduction of microglia activation and IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression in the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) [44]. Gene expression of pro-inflammatory cytokines in the PVN in HFD mouse is attenuated in mouse with deletion of AT₁ receptor specifically at this site [10]. In contrast, administration of the AT₂ receptor agonist, Compound 21, has been shown to increase IL-10 levels in the stroked hemisphere of rats with ischemic stroke [2]. Thus, it is possible that changes in RAS in the NTS observed in RT-HFD rats in the present study affect the cytokines expression at the same site. However, this is still an open question to be tested in future studies.

It is well established that aerobic exercise decreases resting HR [18, 43] due to increases in the parasympathetic modulation and decreases in the sympathetic modulation on heart [43]. However, it seems that RT has no effect in resting HR [3,40] as also showed in the present study. On the other hand, RT prevented the increase in HR observed in HFD fed rats. This protective effect might be due to the combined reduction of sympathetic modulation and increased parasympathetic modulation in the PI found in these animals. Similarly to our results, hypertensive ovariectomized rats submitted to RT showed a decrease in HR associated to a lower sympathetic tone [45].

5. Conclusions

Although aerobic exercise has been recommended as primary intervention for prevention and treatment of different forms of hypertension [18,37,38], more recently RT has been shown to reduce the arterial pressure in hypertensive rats [29,45]. The present study also demonstrates that moderate intensity RT prevents obesity-induced mild hypertension, the increased sympathetic modulation of the arterial pressure and the impairment of baroreflex in HFD feeding rats. The possible mechanisms for these responses may involve reduction of inflammatory responses and modifications of RAS in the NTS. The cardiovascular protection in obese rats pre-conditioned with RT suggests that this type of exercise may have beneficial effects preventing chronic diseases even in individuals with increased risks. However, considering that the usual is to start an exercise program after gaining weight, a question that remains for future studies is if starting RT later would have beneficial effects on obesity related cardiovascular disorders.

Conflict of interest

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

Funding

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2011/50770-1; 2013/13118-0; 2013/14850-6); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 304873/2014-4) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 33001014037P4).

Acknowledgments

The authors thank Reginaldo C. Queiroz, Silas P. Barbosa and Silvia Fógia for expert technical assistance, Silvana A. D. Malavolta and Carla D. Alencar for secretarial assistance and Ana V. de Oliveira for animal care.

References

- [1] D. Agarwal, M.A. Welsch, J.N. Keller, J. Francis, Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR, *Basic Res. Cardiol.* 106 (2011) 1069–1085.
- [2] A. Alhusban, A.Y. Fouda, P. Bindu, T. Ishrat, S. Soliman, S.C. Fagan, Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke, *J. Hypertens.* 33 (2015) 170–180.
- [3] V.G. Barauna, M.L. Batista Jr., L.F. Costa Rosa, D.E. Casarini, J.E. Krieger, E.M. Oliveira, Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32 (2005) 249–254.
- [4] G.E. Billman, Heart rate variability - a historical perspective, *Front. Physiol.* 2 (2011) 86.
- [5] G.T. Blanch, A.H. Freiria-Oliveira, G.F. Speretta, E.J. Carrera, H. Li, R.C. Speth, E. Colombari, C. Summers, D.S. Colombari, Increased expression of angiotensin II type 2 receptors in the solitary-vagal complex blunts renovascular hypertension, *Hypertension* 64 (2014) 777–783.
- [6] E. Bonora, P. Moghetti, C. Zancanaro, M. Cigolini, M. Querena, V. Cacciatori, A. Corgnati, M. Muggeo, Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68 (1989) 374–378.
- [7] C.M. Boustany, D.R. Brown, D.C. Randall, L.A. Cassis, AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2005) R181–R186.
- [8] G.Z. Chaves, S.M. Caligiorne, R.A. Santos, M.C. Khosla, M.J. Campagnole-Santos, Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1–7) at the nucleus tractus solitarius of normotensive and spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.* 18 (2000) 1841–1848.
- [9] J. Ciriello, Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat, *Neuroscience letters* 36 (1983) 37–42.
- [10] A.D. de Kloet, E.G. Krause, P.D. Shi, J. Zubcevic, M.K. Raizada, C. Summers, Neuroimmune communication in hypertension and obesity: a new therapeutic angle? *Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 428–440.
- [11] A.D. de Kloet, D.J. Pioquinto, D. Nguyen, L. Wang, J.A. Smith, H. Hiller, C. Summers, Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei, *Physiol. Behav.* (2014).
- [12] M.A. Delbin, A.P. Davel, G.K. Couto, G.G. de Araujo, L.V. Rossoni, E. Antunes, A. Zanoso, Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats, *PLoS One* 7 (2012) e53318.
- [13] B. Erdos, N. Kirichenko, M. Whidden, B. Basgut, M. Woods, I. Cudykier, R. Tawil, P.J. Scarpace, N. Tumer, Effect of age on high-fat diet-induced hypertension, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (2011) H164–H172.
- [14] M. Esler, N. Straznicki, N. Eikelis, K. Masuo, G. Lambert, E. Lambert, Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension, *Hypertension* 48 (2006) 787–796.
- [15] N.M. Fardin, L.M. Oyama, R.R. Campos, Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension, *Obesity (Silver Spring)* 20 (2012) 1591–1597.
- [16] O. Faria Tde, G.P. Targueta, J.K. Angeli, E.A. Almeida, I. Stefanon, D.V. Vassallo, J.H. Lizardo, Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats, *Eur. J. Appl. Physiol.* 110 (2010) 359–366.
- [17] I.G. Fatouros, A. Chatzizikolaou, S. Tournis, M.G. Nikolaidis, A.Z. Jamurtas, I.I. Douroudos, I. Papassotiropou, P.M. Thomakos, K. Taxildaris, G. Mastorakos, A. Mitrakou, Intensity of resistance exercise determines adipokine and resting energy expenditure responses in overweight elderly individuals, *Diabetes Care* 32 (2009) 2161–2167.
- [18] J.V. Felix, L.C. Michelini, Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius, *Hypertension* 50 (2007) 780–785.
- [19] O.M. Finucane, C.L. Lyons, A.M. Murphy, C.M. Reynolds, R. Klinger, N.P. Healy, A.A. Cooke, R.C. Coll, L. McAllan, K.N. Nilaweera, M.E. O'Reilly, A.C. Tierney, M.J. Morine, J.F. Alcalá-Díaz, J. Lopez-Miranda, D.P. O'Connor, L.A. O'Neill, F.C. McGillicuddy, H.M. Roche, Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity, *Diabetes* 64 (2015) 2116–2128.
- [20] C.P. Fischer, A. Bernsten, L.B. Perstrup, P. Eskildsen, B.K. Pedersen, Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity, *Scand. J. Med. Sci. Sports* 17 (2007) 580–587.
- [21] R.A. Fraga-Silva, A.J. Ferreira, R.A. Dos Santos, Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/mas receptor pathway in hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* 15 (2013) 31–38.
- [22] A.H. Freiria-Oliveira, G.T. Blanch, H. Li, E. Colombari, D.S. Colombari, C. Summers, Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHRs, *Cardiovasc. Res.* 97 (2013) 153–160.
- [23] S. Gallinat, S. Busche, M.K. Raizada, C. Summers, The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278 (2000) E357–E374.
- [24] K. Gokulakrishnan, A. Amutha, H. Ranjani, S.Y. Bibin, M. Balakumar, G.K. Pandey, R.M. Anjana, M.K. Ali, K.M. Narayan, V. Mohan, Relationship of adipokines and pro-inflammatory cytokines among Asian Indians with obesity and youth onset type 2 diabetes, *Endocr. Pract.* 21 (2015) 1143–1151.
- [25] I.L. Gomes-Santos, T. Fernandes, G.K. Couto, J.C. Ferreira-Filho, V.M. Salemi, F.B. Fernandes, D.E. Casarini, P.C. Brum, L.V. Rossoni, E.M. de Oliveira, C.E. Negroao, Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats, *PLoS One* 9 (2014) e98012.
- [26] T.A. Hornberger Jr., R.P. Farrar, Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat, *Can. J. Appl. Physiol.* 29 (2004) 16–31.
- [27] N.P. Kadoglou, D. Perrea, F. Iliadis, N. Angelopoulou, C. Liapis, M. Alevizos, Exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 30 (2007) 719–721.
- [28] P. Kokkinos, Cardiorespiratory fitness, exercise, and blood pressure, *Hypertension* 64 (2014) 1160–1164.
- [29] R.D. Leite, C. Durigan Rde, A.D. de Souza Lino, M.V. de Souza Campos, M. Souza, H.S. Selistre-de-Araujo, E. Bouskela, L.G. Kraemer-Aguiar, Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats, *Metabolism* 62 (2013) 1477–1484.
- [30] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [31] M.J. McKinley, A.L. Albiston, A.M. Allen, M.L. Mathai, C.N. May, R.M. McAllen, B.J. Oldfield, F.A. Mendelsohn, S.Y. Chai, The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 901–918.
- [32] L.C. Michelini, L.G. Bonagamba, Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats, *Hypertension* 15 (1990) 145–150.
- [33] N. Montano, T.G. Ruscone, A. Porta, F. Lombardi, M. Pagani, A. Malliani, Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation* 90 (1994) 1826–1831.
- [34] T. Nomoto, T. Okada, K. Shimazaki, T. Yoshioka, M. Nonaka-Sarukawa, T. Ito, K. Takeuchi, K.I. Katsura, H. Mizukami, A. Kume, S. Ookawara, U. Ikeda, Y. Katayama, K. Ozawa, Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Gene Ther.* 16 (2009) 383–391.
- [35] M. Nonaka-Sarukawa, T. Okada, T. Ito, K. Yamamoto, T. Yoshioka, T. Nomoto, Y. Hojo, M. Shimo, M. Urabe, H. Mizukami, A. Kume, U. Ikeda, K. Shimada, K. Ozawa, Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats, *J. Gene Med.* 10 (2008) 368–374.
- [36] J.F. Paton, S. Kasparov, Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarius - a microinjection study in the rat, *J. Physiol.* 521 (Pt 1) (1999) 213–225.
- [37] L.S. Pescatello, B.A. Franklin, R. Fagard, W.B. Farquhar, G.A. Kelley, C.A. Ray, American College of Sports M, American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension, *Med. Sci. Sports Exerc.* 36 (2004) 533–553.
- [38] A.R. Pinheiro, A.R. Cunha, M.B. Aguilã, C.A. Mandarim-de-Lacerda, Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17 (2007) 365–375.
- [39] W. Pires, S.P. Wanner, M.R. Lima, I.A. Fonseca, U. Fumega, A.S. Haibara, C.C. Coimbra, N.R. Lima, Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex, *PLoS One* 8 (2013) e72005.
- [40] G. Ricci, D. Lajoie, R. Petitclerc, F. Peronnet, R.J. Ferguson, M. Fournier, A.W. Taylor, Left ventricular size following endurance, sprint, and strength training, *Med. Sci. Sports Exerc.* 14 (1982) 344–347.
- [41] E.R. Ropelle, M.B. Flores, D.E. Cintra, G.Z. Rocha, J.R. Pauli, J. Morari, C.T. de Souza, J.C. Moraes, P.O. Prada, D. Guadagnini, R.M. Marin, A.G. Oliveira, T.M. Augusto, H.F. Carvalho, L.A. Velloso, M.J. Saad, J.B. Carvalheira, IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition, *PLoS Biol.* 8 (2010) 1–20.
- [42] J.P. Sabino, C.A. da Silva, R.F. de Melo, R. Fazan Jr., H.C. Salgado, The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure, *Auton. Neurosci.* 173 (2013) 58–64.
- [43] J.E. Seely, C.A. Guzman, M.R. Becklake, Heart and lung function at rest and during exercise in adolescence, *J. Appl. Physiol.* 36 (1974) 34–40.
- [44] P. Shi, C. Diez-Freire, J.Y. Jun, Y. Qi, M.J. Katovich, Q. Li, S. Sriramula, J. Francis, C. Summers, M.K. Raizada, Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension, *Hypertension* 56 (2010) 297–303.

- [45] G.L. Shimojo, R.K. Palma, J.O. Brito, I.C. Sanches, M.C. Irigoyen, K. De Angelis, Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48 (2015) 523–527.
- [46] S.D. Silva Jr., T.T. Zampieri, A. Ruggeri, A. Ceroni, D.S. Aragao, F.B. Fernandes, D.E. Casarini, L.C. Michelini, Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training – focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes, *Circ. J.* 79 (2015) 1372–1380.
- [47] G.F. Speretta, M.C. Rosante, F.O. Duarte, R.D. Leite, A.D. Lino, R.A. Andre, J.G. Silvestre, H.S. Araujo, A.C. Duarte, The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats, *Clinics* 67 (2012) 1469–1477.
- [48] S. Sriramula, J.P. Cardinale, J. Francis, Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension, *PLoS One* 8 (2013) e63847.
- [49] S.D. Stocker, R. Meador, J.M. Adams, Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats, *Hypertension* 49 (2007) 640–646.
- [50] M. Takagishi, H. Waki, M.E. Bhuiyan, S.S. Gouraud, A. Kohsaka, H. Cui, T. Yamazaki, J.F. Paton, M. Maeda, IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarius attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298 (2010) R183–R190.
- [51] L. Tang, K. Luo, C. Liu, X. Wang, D. Zhang, A. Chi, J. Zhang, L. Sun, Decrease in myostatin by ladder-climbing training is associated with insulin resistance in diet-induced obese rats, *Chin. Med. J.* 127 (2014) 2342–2349.
- [52] P. van de Borne, N. Montano, M. Pagani, R. Oren, V.K. Somers, Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure, *Circulation* 95 (1997) 1449–1454.
- [53] H. Waki, S.S. Gouraud, M. Maeda, J.F. Paton, Gene expression profiles of major cytokines in the nucleus tractus solitarius of the spontaneously hypertensive rat, *Auton. Neurosci.* 142 (2008) 40–44.
- [54] J. Zubcevic, J.Y. Jun, G. Lamont, T.M. Murca, P. Shi, W. Yuan, F. Lin, J.M. Carvajal, Q. Li, C. Summers, M.K. Raizada, Z. Shan, Nucleus of the solitary tract (pro)renin receptor-mediated antihypertensive effect involves nuclear factor- κ B-cytokine signaling in the spontaneously hypertensive rat, *Hypertension* 61 (2013) 622–627.