

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa interinstitucional de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCAR/UNESP

Papel do exercício físico associado a diferentes Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (iECA) sobre o fator de crescimento endotelial de vasos – VEGF e angiogênese em ratos espontaneamente hipertensos e normotensos

Aluno: Anderson Geremias Macedo
Orientadora: Profa. Adj. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Bauru
Outubro de 2017

Anderson Geremias Macedo

Papel do exercício físico associado a diferentes Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (iECA) sobre o fator de crescimento endotelial de vasos – VEGF e angiogênese em ratos espontaneamente hipertensos e normotensos

Orientadora: Profa. Adj. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Programa de Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/ Universidade Estadual Paulista - UNESP “Júlio Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de de Doutor em Ciências Fisiológicas.

São Carlos/Bauru

Outubro de 2017

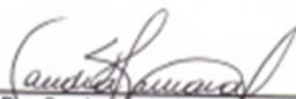


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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 Anderson Geremias Macedo, realizada em 23/10/2017:



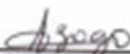
Profa. Dra. Sandra Maria do Amaral Cardoso
UNESP



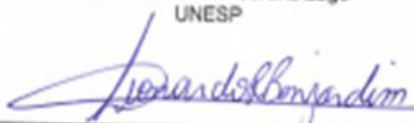
Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
USP



Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro
UNESP



Prof. Dr. Anderson Saranz Zago
UNESP



Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bohjardim
USP

Agradecimentos

A todos os professores que tiveram participação em minha formação e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências fisiológicas, PIPGCF - UFSCAR/ UNESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa estudantil.

Ao secretário Alexandre por sua atenção e disponibilidade

Aos meus companheiros e colegas de laboratório durante esses 6 anos (Paula, Aline, André, Isley, Naiara, Vinícius, Mayara, Francine, Danyelle, Leonardo, Lidieli e Lidiane)

Ao pessoal do Departamento de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela parceria para realização do trabalho (Professor Dr. Jesus e Professor Dr. André) e ao Mizael pelo auxílio.

A minha orientadora Sandra, a qual nestes 6 anos de ensinamentos me mostrou o que deveria ser feito. Terei para sempre um enorme carinho e respeito, pois sei que ela foi fundamental na minha formação acadêmica e profissional, pelos ensinamentos e dedicação. Muito obrigado pelos anos de ensinamento e convívio, sempre será um espelho profissional e pessoal!

A minha família, que sem eles jamais seria possível tudo isso. Sem dúvida é o suporte para tudo. Minha mãe Flávia, meu pai Israel e meu irmão Robson. Tudo isso só foi possível graças a esta família.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença complexa e multifatorial, considerada um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. É sabido que os níveis pressóricos elevados são mantidos por aumento de resistência vascular periférica (RVP). Dentre os fatores que contribuem para a manutenção da elevada RVP pode-se citar o remodelamento das arteríolas e a rarefação, ou redução da densidade capilar, que ocorre em vários tecidos. O treinamento físico (TF) vem sendo considerado um importante coadjuvante ao tratamento farmacológico no controle e tratamento da HA. Neste sentido, o exercício tem sido eficaz em melhorar o remodelamento vascular e promover angiogênese. Dentre as terapias farmacológicas utilizadas clinicamente, os inibidores da enzima conversora de angiotensina II (iECA) têm demonstrado grande efetividade, principalmente em reduzir mortalidade. Tem sido sugerido que, devido a algumas características bioquímicas e farmacológicas diferentes entre captopril e perindopril, possa haver algum efeito diferencial na angiogênese induzida pelo TF. Já foi demonstrado que o uso de captopril pode inibir a angiogênese induzida pelo exercício agudo ou de curta duração, no entanto, quase nada se sabe sobre a associação de captopril e perindopril em hipertensos que praticam exercício de longa duração (TF). Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do uso crônico do captopril e perindopril na angiogênese induzida pelo TF em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos e investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nestas alterações. Para tanto 48 ratos Wistar normotensos e 48 ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram submetidos a um protocolo de TF (60% capacidade física máxima, por 8 semanas) ou mantidos como sedentários. Durante as últimas 6 semanas, os animais receberam tratamento com captopril (25 mg / kg por dia, *i.p.*) ou perindopril (3 mg / kg por dia, gavagem) e os animais controles receberam a água. Foram analisados o peso corporal e valores basais de pressão arterial (PA) sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC). O músculo tibial anterior (TA) e miocárdio foram retirados para as análises morfométricas da razão capilar / fibra (C:F) e análises da produção proteica do fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF), seu receptor (VEGFR-2) e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Como o esperado, os valores de PAS, PAD e PAM estavam maiores nos SHR sedentários (+30%, +33% e +32%, para PAS, PAD e PAM, respectivamente), quando comparados aos Wistar sedentários. Tanto o TF, como ambos os tratamentos farmacológicos, reduziram de similar magnitude os valores de PA. A razão C:F no TA estava reduzida em todos os SHR sedentários, comparados aos Wistar sedentários, e esta redução estava associada aos menores níveis de VEGF (~ -26%) e eNOS (~ -27%). O TF aumentou a razão C:F nos ratos Wistar treinados comparados ao Wistar sedentário devido a um aumento na produção do VEGFR-2 (+17%) e da eNOS (+31%). Adicionalmente, o TF preveniu a rarefação no TA dos SHR, principalmente por prevenir as reduções das produções do VEGF e eNOS. O tratamento crônico com captopril ou perindopril atenuou significativamente a angiogênese nos animais Wistar, embora este efeito foi maior após tratamento com captopril (-19%), quando comparado ao perindopril (-13%). Já, nos animais SHR, o perindopril não atenuou a angiogênese induzida pelo TF, diferente dos resultados apresentados pelo captopril, que atenuou a angiogênese em 18%. Esta resposta permitiu a normalização dos níveis da eNOS, após o TF, nos ratos treinados Wistar e SHR tratados com somente com perindopril. A razão C:F do miocárdio estava reduzida em todos o SHR sedentários comparado ao Wistar sedentário. O TF aumentou a razão C:F do miocárdio nos ratos Wistar treinados (~+14%) em todos os grupos comparados aos sedentários. Da mesma forma, o TF aumentou a razão C:F nos SHR treinados, comparados aos SHR sedentários e

normalizou a quantidade de vasos em relação aos Wistar sedentário. Esta resposta também foi mediada pela maior produção da eNOS em todos os grupos treinados. Estes achados nos permitem concluir que o TF promoveu a angiogênese na musculatura esquelética e cardíaca e o uso crônico dos fármacos iECA atenuou esta resposta na musculatura esquelética. O perindopril não atenuou a angiogênese induzido pelo TF nos animais hipertensos. Assim, apesar de não haver diferenças na redução da PA nos SHR tratados com captopril ou perindopril, os resultados do presente estudo sugerem que o perindopril possa ser o melhor fármaco de escolha para pacientes hipertensos que praticam exercício físico, uma vez que não atenua a angiogênese na musculatura esquelética induzida pelo TF.

Palavras chaves: treinamento físico, hipertensão arterial, microcirculação, perindopril, captopril, músculo esquelético.

ABSTRACT

Hypertension (HA) is a complex and multifactorial disease, considered as an important risk factor for cardiovascular diseases. It is known that high blood pressure (BP) levels are maintained by increased Total peripheral resistance (TPR). Among the factors that contribute to the maintenance of high TPR, there are arterioles remodeling and rarefaction, which occurs in several tissues. Physical training (T) has been considered as an important adjunct to pharmacological treatment in the control and treatment of HA. In this sense, exercise has been effective in improving vascular remodeling and promoting angiogenesis. Among the pharmacological therapies used clinically, angiotensin II converting enzyme inhibitors (ACEi) have shown great effectiveness, mainly by reducing mortality. It has been suggested that due to some different biochemical and pharmacological characteristics between captopril and perindopril, there may be some differential effect on T-induced angiogenesis. It has been demonstrated that captopril may inhibit T-induced angiogenesis after acute exercise, but almost nothing is known about its effects after chronic exercise. Therefore, the objective of this study was to compare the effects of the chronic use of captopril and perindopril on angiogenesis induced by T in normotensive and spontaneously hypertensive rats and to investigate some of the possible mechanisms involved in these alterations. For this purpose, 48 normotensive Wistar rats and 48 spontaneously hypertensive rats (SHR) underwent T protocol (60% maximum physical capacity, for 8 weeks) or maintained sedentary. During the last 6 weeks, the animals were treated with captopril (25 mg / kg per day, i.p.) or perindopril (3 mg / kg per day, gavage) and the control animals received water. Body weight and baseline values of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean (MAP) and heart rate (HR) were analyzed. The anterior tibial muscle (TA) and myocardium were removed for the morphometric analyzes of the capillary / fiber ratio (C: F) and analyzes of the protein production of vascular endothelial growth factor (VEGF), its receptor (VEGFR-2) and enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS). As expected, the values of SBP, DBP and MAP were higher in the sedentary SHR (+ 30%, + 33% and + 32%, for SBP, DBP and MAP respectively) when compared to sedentary Wistar. Both T and pharmacological treatments reduced BP values by a similar magnitude. The C:F ratio in TA was reduced in all sedentary SHRS compared to sedentary Wistar, and this reduction was associated with lower levels of VEGF (~ -26%) and eNOS (~ -27%). Training increased C:F ratio in trained Wistar rats compared to sedentary Wistar because of increased production of VEGFR-2 (+ 17%) and eNOS (+ 31%). In addition, T prevented TA rarefaction in SHRs, mainly by preventing reductions in VEGF and eNOS production. Chronic treatment with captopril or perindopril significantly attenuated angiogenesis in Wistar animals, although this effect was greater after treatment with captopril (-19%) when compared to perindopril (-13%). In the SHR animals, perindopril did not attenuate T-induced angiogenesis. On the other hand, captopril attenuated this effect (18%). This response occurred due to normalization of eNOS levels after PT in trained Wistar and SHR rats treated with perindopril alone. The myocardial C: F ratio was reduced in all sedentary SHR compared to sedentary Wistar. T increased myocardial C: F ratio in trained Wistar rats (~ + 14%) in all groups compared to sedentary ones. Similarly, T increased C: F ratio in trained SHR compared to sedentary SHR and normalized to number of vessels compared to sedentary Wistar. This response was also mediated by increased production of eNOS in all trained groups. These findings allow us to conclude that T promoted angiogenesis in skeletal and cardiac musculature and chronic use of ACE inhibitors attenuated this response in the skeletal muscle, and perindopril did not attenuate T-induced angiogenesis in hypertensive

animals. In this way perindopril may be suggested as the best drug of choice for hypertensive patients who do exercise.

Keywords: physical training, hypertension, microcirculation, perindopril, captopril, skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento do protocolo experimental durante as 8 semanas de treinamento aeróbico na esteira (cinza), 6 semanas de tratamento com captopril ou perindopril e período de 2 dias de canulação, análises hemodinâmicas e retirada dos tecidos (vermelho). PC: Peso corporal.....24

Figura 2. Diferença entre os resultados do 3º e 1º testes de capacidade física TEM em todos os grupos, demonstrados em segundos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 8-9 cada grupo. Significância: + vs sedentário, $p < 0,05$32

Figura 3. Diferença entre os resultados do 3º e 1º testes de capacidade física em todos os grupos, demonstrados em segundos: controle, captopril e perindopril para ratos hipertensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 7-8 cada grupo. Significância: +vs sedentário, $p < 0,05$32

Figura 4. Valores da pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D) em todos os grupos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo.....33

Figura 5. Valores da pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D) em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados, nos grupos controle, captopril e perindopril. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo Significância: ^s vs wistar, * vs controle, + vs sedentário, $p < 0,05$34

Figura 6. Imagens representativas do músculo tibial (TA, 10 µm), coloridas com hematoxilina e eosina para os grupos (A) Wctr: normotenso sedentário controle; (B) Wctr: normotenso treinado controle; (C) Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; (D) Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; (E) Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; (F) Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares ao redor das fibras musculares.....36

Figura 7. Razão capilar/fibra do músculo tibial anterior (TA) em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo. Significância: + vs sedentário, * vs controle, & vs captopril, $p < 0,05$37

Figura 8. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo TA em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, em ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos em cada grupo: 7-8 animais. Significância: +vs sedentário, *vs controle & vs captopril, $p < 0,05$. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wctr: normotenso sedentário controle; Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; Wtctr: normotenso treinado controle;

Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril.38

Figura 9. Imagens representativas do músculo tibial anterior (TA, 10 µm), coloridas com hematoxilina e eosina para (A) Wistar: normotenso sedentário, (B) Shsctr: hipertenso sedentário controle; (C) Shtctr: hipertenso treinado controle; (D) Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; (E) Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; (F) Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril;; (G) Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares em volta das fibras musculares.....39

Figura 10. Razão capilar/fibra do músculo tibial anterior (TA) em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos usados: 5-7 cada grupo. Significância: ^S vs wistar, *vs controle, + vs sedentário & vs captopril, p< 0,05.....40

Figura 11. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo TA em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos em cada grupo: 6-7 animais. Significância: ^S vs wistar +vs sedentário, *vs controle, p< 0,05. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wistar: normotenso sedentário, Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; Shtctr: hipertenso treinado controle; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril.....41

.Figura 12. Imagens representativas do miocárdio (10 µm) coloridos com hematoxilina e eosina para os grupos (A) Wsctr: normotenso sedentário controle; (B) Wtctr: normotenso treinado controle; (C) Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; (D) Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; (E) Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; (F) Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril . Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares ao redor das fibras musculares.....43

Figura 13. Razão capilar/fibra do miocárdio em todos os grupos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo. Significância: + vs sedentário, p< 0,05.....44

Figura 14. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no miocárdio em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, em ratos sedentários e treinados. Número de ratos em cada grupo: 7-8 animais. Significância: +vs sedentário, p< 0,05. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wsctr: normotenso sedentário controle; Wscap: normotenso sedentário tratado com captopril; Wspe: normotenso sedentário tratado com perindopril; Wtctr: normotenso treinado controle; Wtcap: normotenso treinado tratado com captopril; Wtpe: normotenso treinado tratado com perindopril.....45

Figura 15. Imagens representativas do micrído (10 μ m), coloridas com hematoxilina e eosina parapara (A) Wistar: normotenso sedentário, (B) Shsctr: hipertenso sedentário controle; (C) Shtctr: hipertenso treinado controle; (D)Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; (E) Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; (F) Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril;; (G) Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 μ m. As setas indicam a localização dos capilares em volta das fibras musculares.....46

Figura 16. Razão capilar/fibra do miocárdio em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril.. Número de ratos usados: 5-7 cada grupo. Significância: [§] vs wistar, + vs sedentário, p< 0,05.....47

Figura 17. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo miocárdio em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos em cada grupo:6-7 animais. Significância: [§] vs wistar *vs controle p< 0,05. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wistar: normotenso sedentário, Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; shtctr: hipertenso treinado controle; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do peso corporal inicial e final do período de treinamento dos animais normotensos e hipertensos.....	30
Tabela 2. Valores de massa muscular do tibial anterior (TA) e Coração, normalizados pelo comprimento da tibia dos animais normotensos e hipertenso	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AT-1: Receptor de angiotensina II.

ECA: Enzima conversora de angiotensina II.

ANOVA: Análise de variância.

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais.

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial.

FC: Frequência cardíaca.

Flk-1: Kinase do fígado fetal.

Flt-1: Kinase tirosinase 1 semelhante a fms.

g: Gramas.

GADPH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

HA: Hipertensão arterial.

HE: Hematoxilina-eosina.

iECA: Inibidores da enzima conversora de angiotensina II.

L-NNA: Inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial.

NO: Óxido nítrico.

PA: Pressão arterial.

PAD: Pressão arterial diastólica.

PAM: Pressão arterial média.

PAS: Pressão arterial sistólica.

Razão C:F: Razão capilar por fibra.

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos.

SRA: Sistema renina angiotensina.

TA: Tibial anterior.

TEM: Teste de esforço máximo.

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

VEGFR-1: Receptor 1 do fator de crescimento endotelial de vasos.

VEGFR-2: Receptor 2 do fator de crescimento endotelial de vasos.

VEGFR-3: Receptor 3 do fator de crescimento endotelial de vasos.

Sumário

1. Introdução/revisão de literatura	15
1.1. Tratamentos da hipertensão.....	15
1.1. Tratamento farmacológico	18
1.1.2. Tratamento não farmacológico.....	19
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Materiais e métodos	23
3.1. Desenho experimental.....	24
3.2. Grupos experimentais.....	24
3.2.1. Peso corporal e teste de esforço máximo.....	25
3.3. Determinação da pressão arterial.....	26
3.3.1. Confecção das cânulas.....	26
3.3.2. Registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC).....	26
3.4. Retirada dos músculos esqueléticos e cardíacos.....	27
3.5. Análises morfométricas.....	27
3.6. Procedimentos de dosagem de proteínas e produção proteica.....	28
3.7. Métodos estatísticos.....	29
4. Resultados.....	30
5. Discussão.....	49
6. Considerações finais.....	59
7. Referências	60

1. Introdução/ revisão de literatura

A hipertensão arterial (HA) é uma doença clínica multifatorial, caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados, associados a fatores genéticos, alterações metabólicas, hormonais e estruturais (hipertrofia vascular e cardíaca) (MUNTER et al., 2002; CHEN, 2012, MANCIA et al., 2013, MALACHIAS et al., 2016)

Vários são os mecanismos envolvidos na HA e uma das principais características encontradas nesta patologia é o comprometimento da microcirculação, que colabora para o aumento da resistência vascular periférica (RVP) e, desta maneira, para o aumento da pressão arterial (PA). Este comprometimento pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1- redução da luz arteriolar, provocada por vasoconstrição ativa, proveniente de um aumento da atividade simpática (OVERTON et al., 1998); 2- hipertrofia e remodelamento dos vasos, aumentando a razão parede-luz das arteríolas (AMARAL et al., 2000; MULVANY, 2002); 3- por rarefação (redução da densidade) de capilares (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Em especial, a rarefação de capilares pode contribuir para o aumento da pressão arterial (GREENE, et al., 1989, HEAGERT, et al., 1993; LEVY, et al., 2001; AMARAL et al, 2001; AMARAL e MICHELIN, 2011).

1.1 Tratamentos da hipertensão

Devido ao grande aumento da incidência de HA na população mundial nas últimas décadas, várias estratégias, farmacológicas e não-farmacológicas, vêm sendo utilizadas na tentativa de ajustar os diferentes mecanismos que colaboram para o aumento de PA.

1.1.1. Tratamentos farmacológicos

Dentre as terapias farmacológicas, tem sido recomendados diuréticos, beta-bloqueadores, antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina II (iECA), bloqueadores dos receptores-1 de angiotensina II (AT-1), além de várias combinações (BRUGGTS et al., 2015; MANCIA et al., 2013, MALACHIAS et al., 2016). Estes fármacos têm sido eficientes em reduzir a pressão arterial tanto de humanos (DUPREZ et al., 2011) como em modelos experimentais (MORIMOTO et al., 2008).

Alguns trabalhos demonstram que estes fármacos também apresentam efeito na reatividade vascular, o que facilita a dilatação dos vasos, contribuindo para redução da PA (RODRIGO et al., 1997; GOMES-ROSO et al., 2009).

Atualmente, várias combinações de fármacos são prescritas para o melhor controle da PA nos hipertensos, no entanto, estudos têm demonstrado que, dentre as monoterapias, a classe dos iECA parece ser a mais prescrita (SHOETER et al., 2007). Neste sentido, Ferrari et al. (2005) já haviam sugerido, em sua revisão que, dentre os fármacos anti-hipertensivos, os inibidores da ECA eram muito utilizados clinicamente, por serem eficazes em reduzir a hipertrofia cardíaca e facilitar a ação da bradicinina circulante, a qual é um potente vasodilatador. Segundo Ribeiro e Florencio (2000), dentre os iECA, o captopril foi primeiro a ser liberado para utilização (desde 1981) e alguns estudos ambulatoriais, ou de rede pública de saúde, mostraram que o captopril tem sido o medicamento com maior utilização por pacientes hipertensos, na monoterapia ou combinações (VERONEZ & SIMÕES, 2008; LINARELLI et al., 2009), principalmente pela sua eficiência em reduzir PA e risco de mortalidade (CRESPO et al., 2013 e FEDOROWSKI et al., 2013). No entanto, durante os últimos 15 anos, grandes estudos clínicos longitudinais vêm sendo apresentados com o objetivo de avaliar a eficiência dos fármacos anti-hipertensivos em reduzir PA, bem como seus efeitos na mortalidade, redução de hipertrofia ventricular, entre outros (PROGRESS, 2001; TUBFULL et al., 2003; PILOTE et al., 2008; PROGRESS, 2011; VAN VARK et al., 2012). Neste sentido, Pilote et al. (2008) analisaram 43.356 pacientes que sofreram infarto e utilizaram diferentes iECA no primeiro mês de recuperação. Neste estudo, dentre os fármacos avaliados, o ramipril e o perindopril foram os mais eficazes, quando comparados ao captopril, na diminuição do risco de mortalidade desses pacientes.

Poucos estudos comparam a eficácia clínica entre o perindopril e o captopril. O estudo de Lee et al. (1989) demonstrou que o perindopril era mais eficaz em reduzir a PA de pacientes hipertensos, quando comparado ao captopril (75% vs 57%, respectivamente). Já Grandi et al. (1991) relataram que o perindopril tinha o mesmo efeito que o captopril em reduzir a hipertrofia ventricular crônica e conseqüentemente a PA de pacientes com problemas cardíacos. Desta maneira, ainda não está claro qual dos iECA pode ser considerado como o mais eficaz clinicamente.

Os inibidores da ECA é uma classe de fármaco que modula atividade da enzima ECA, qual é responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (CECONI et

al., 2010). A ECA, ou quinase II, é uma metopeptidase de dipetídio carboxilo bivalente ligada à membrana nas células endoteliais, epiteliais, neuroepiteliais e na forma solúvel no sangue, e numerosos fluidos corporais (CECONI et al., 2010). O processo de conversão ocorre quando a angiotensina I (decapeptídeo) se liga ao sítio de ligação do íon zinco da ECA, onde enzimas proteases são ativadas e dois peptídeos no terminal C da angiotensina I são clivados formando a angiotensina II (octapeptídeo) (CECONI et al., 2010). Os iECA se ligam ao sítio de ligação do íon zinco da ECA e, uma vez ocupado, impede a ligação da angiotensina I a este sítio de ligação e, conseqüentemente, a conversão para angiotensina II. Entretanto, o grupo ligante dos iECA ao íon zinco pode ser diferente entre estes fármacos, ou seja, o captopril contém o grupo sulfidril, já outras drogas, como o perindopril e enalapril, contém o grupo carboxil (BROW et al., 1998; CECONI et al., 2010). O iECA possuem lipofilicidade distinta entre si, no entanto, esta característica parece ser independente dos grupos dos iECA, pois tanto o captopril quanto o perindopril apresentam a mesma lipofilicidade (FURDERBERG, 2000). Por outro lado os iECA do grupo carboxil, tais como perindopril e ramipril são administrados, como pró-droga, forma esta que determina maior tempo de concentração plasmática e meia vida plasmática, comparado ao grupo sulfidril, administrado na forma de droga ativa. O perindopril representante do grupo carboxil apresenta uma concentração plasmática de 3-7 horas e tempo e 24 horas de meia vida plasmática, já o captopril pertencente ao grupo sulfidril o tempo de concentração plasmática são 2 horas e meia vida plasmática entre 3-4 horas, assim os efeitos do iECA do grupo carboxil parecem ser mais prolongados do que o grupo sulfidril (FERRARI, et al., 2005, BROW et al., 1998). Neste sentido, o trabalho de Risher, Doussau, Giudiceli (1989) observou que os iECA enalapril, perindopril e ramipril bloquearam em 100% atividade da ECA plasmática em animais normotensos, por outro lado este bloqueio com o captopril foi de 83%. Concordando com estes achados, Tokita et al. (1995) compararam o tratamento com captopril e perindopril na atividade da ECA. Esses autores observaram que os ratos tratados com captopril tiveram menor inibição da ECA plasmática quando comparados aos ratos tratados com perindopril, no entanto, ambos iECA inibiram a ECA tecidual nos rins. Ainda são escassos e controversos os estudos que comparam os efeitos do captopril e perindopril.

1.1.2. Tratamento não farmacológico

Outra estratégia utilizada como co-adjutante no tratamento farmacológico tradicional, são as terapias não farmacológicas. Estas terapias incluem intervenções nos diferentes fatores de risco, tais como diminuição do consumo de cigarro, diminuição da ingestão de sal e álcool, redução do peso corporal, redução do estresse e a prática regular de exercícios físicos (MANCIA, et al., 2013, MALACHIAS et al., 2016).

Já está bem estabelecido que o exercício físico promove efeitos benéficos importantes sobre a PA, tais como diminuição da atividade simpática e melhora no controle do barorreflexo (LOPES et al., 2003; WALLACE, 2003; LATERZA et al., 2007; KOKKLINOS, 2012; MANCIA et al., 2013; MALACHIAS et al., 2016). Mais especificamente na musculatura esquelética, alguns trabalhos têm demonstrado que o exercício físico aeróbio e regular reduz a razão parede-luz das arteríolas de ratos hipertensos, o que diminui a resistência vascular local e contribui para diminuição da resistência vascular periférica, além de aumentar a densidade de capilares e vênulas (AMARAL et al., 2001; MELO et al., 2003; AMARAL, et al., 2008; AMARAL, et al., 2011, FERNANDES, et al., 2012). Vários estudos na literatura têm descrito que este aumento do número de vasos, em decorrência do exercício físico, acontece de forma muito rápida e permanece enquanto durar o treinamento, variando de 1-3 dias (GUSTAFFSON et al., 1999; AMARAL et al., 2001, AMARAL et al., 2008) até 6-13 semanas (AMARAL et al., 2008; LAUGLIN e ROSSINI, 2008; HARBER-ABEL et. al., 2012). As recomendações do exercício aeróbio contínuo para indivíduos hipertensos é para intensidade leve/moderada (40 a 60% do VO₂máx.) (MALACHIAS et al., 2016).

O aumento de vasos na musculatura esquelética induzido pelo exercício físico parece ser um dos mecanismos que colabora para a diminuição da HA, uma vez que Amaral et al. (2000) mostraram que animais SHR apresentaram uma correlação inversa entre redução da PA e aumento da densidade de capilares e vênulas no músculo grácil após 13 semanas de TF. Este efeito vem sendo confirmado em humanos, pois Hansen e colaboradores (2010) verificaram que pacientes hipertensos, submetidos a 16 semanas de treinamento no cicloergômetro, apresentaram redução da PA associado juntamente com o aumento da razão capilar/fibra no músculo vasto lateral. Da mesma forma, Gliemann et al. (2015) observaram que pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, após 20 sessões

de exercícios de endurance, em esteiras e cicloergômetro, apresentaram uma redução da pressão arterial associada com aumento da razão capilar/fibra no músculo vasto lateral.

Um dos fatores determinantes para o aumento do número de vasos, tanto em humanos quanto em animais, é o fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF). Esta proteína, quando age em seus receptores específicos, estimula as enzimas metaloproteinases que degradam a membrana da célula endotelial, e estimula uma cascata de eventos intracelulares que culminam na migração das células endoteliais para o local de brotamento, dando origem à formação de novos capilares. (FERRARA, et al. 1992). O VEGF é uma glicoproteína ativa de 46-kDa, considerada um dos principais fatores mitogênicos, que aumenta a permeabilidade vascular e promove proliferação de células endoteliais (FERRARA, et al. 1992). Existem 5 diferentes isoformas de VEGF identificadas, as quais são compostas por 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente. Além disso, a família os receptores do VEGF se divide em 3 subtipos: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) e VEGFR-3 (FERRARA, 2009). Vários trabalhos têm mostrado que o VEGF está envolvido no processo de regulação da angiogênese, tanto em modelos animais como em humanos, normotensos ou hipertensos (GUSTAFFSSON et al., 1999, WAGNER et al., 2001; AMARAL et al., 2001 e 2008, FERRARA, 2009; HANSEN et al., 2010). Não só o VEGF, mas também seus receptores, podem ser modulados pelo exercício físico. Gustaffsson et al. (2007) observaram, em humanos, aumentos significativos de VEGF e de seus receptores (VEGFR1 e VEGFR2) no músculo vasto lateral de humanos após 5 dias ou 5 semanas de treinamento em cicloergômetro. Da mesma forma, tem sido comprovada a importância fundamental do VEGF na angiogênese induzida pelo treinamento físico em modelos experimentais. O estudo de Olfert et al. (2010) demonstrou que camundongos transgênicos, com deleção gênica muscular do VEGF, submetidos a 6 semanas de treinamento em esteira, não apresentaram nenhum aumento na densidade capilar quando comparados aos controles. Posteriormente, Delavar et al. (2014) observaram que este tipo de camundongo transgênico apresentou redução significativa na angiogênese no músculo flexor plantar e gastrocnêmio, quando comparado ao controle. Estes resultados confirmam os achados anteriores de nosso grupo os quais revelaram que o uso de um anticorpo anti-VEGF impedia a angiogênese induzida por estimulação elétrica ou exercício aeróbio de curta duração (AMARAL et al., 2001a e b). No entanto, ainda não está clara na literatura a contribuição do VEGF na

angiogênese induzida pelo exercício crônico. Amaral et al. (2008) demonstraram que a produção proteica de VEGF aumenta rapidamente (1-3) dias com o exercício, mas retorna para valores basais após 3 meses, mesmo na permanência de angiogênese. Concordando com estes achados, Ranjbar, Ardakanizade, Nazen (2017) verificaram que a expressão gênica do VEGF no músculo sóleo e gastrocnêmio não se alterou em ratos infartados treinados por 10 semanas em esteira. Por outro lado Fernandes et al. (2012) observaram que a produção protéica do VEGF estava aumentada no músculo sóleo após 10 semanas de treinamento de natação, tanto em animais normotensos quanto hipertensos, mas este aumento foi determinado após uma seção aguda de exercício na esteira.

Existem vários fatores que podem contribuir para o aumento do VEGF e, dentre eles tem sido destacado o óxido nítrico (HUDILICKA et al., 1999; MILKIEWICZ et al., 2005), hipóxia (OLFERT et al., 2001) e o sistema renina angiotensina (AMARAL et al., 2001). O óxido nítrico é formado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Esta enzima está localizada nas células endoteliais e é ativada a partir do aumento da concentração dos íons Ca^{++} . Uma vez ativada, a eNOS utiliza como substrato a L-arginina e produz citrulina e NO, que, por ser um gás, difunde-se facilmente do endotélio a musculatura lisa (BREDET, 1999; TALOM, et al., 2000). Sua principal função na musculatura lisa é promover a vasodilatação, aumentando assim o fluxo sanguíneo local (DENIFI et al., 2014). Além disso, alguns estudos têm mostrado o envolvimento do NO sobre a angiogênese na musculatura esquelética. Hudlicka et al. (1999) e Milkiewicz et al. (2005) demonstraram que ratos que receberam estimulação elétrica de 2 a 7 dias, juntamente com o inibidor da eNOS (L-NNA) apresentaram uma inibição do crescimento vascular quando comparado ao controle. De acordo com estes resultados, Fernandes et al. (2012) mostraram aumento da razão capilar/fibra no músculo sóleo em animais treinados acompanhado de um aumento da produção protéica da eNOS.

O sistema renina angiotensina (SRA) é fundamental ao organismo por exercer um controle hidroeletrolítico e da PA (AIRES, 2012). Além desse controle da PA, tem sido demonstrado que o SRA também está envolvido no processo no crescimento de vasos (GREENE E AMARAL, 2002; PETERSEN e GREENE, 2007). Estudos experimentais demonstraram o envolvimento da Ang II no crescimento de vasos na musculatura esquelética (AMARAL et al., 2001a; AMARAL et al., 2001b; GREENE e AMARAL, et al. 2002; BELLANY et al., 2010), uma vez que o bloqueio do SRA atenuou a produção de

VEGF e, conseqüentemente, de crescimento de vasos induzidos por estimulação elétrica ou exercício físico.

A literatura têm demonstrado resultados distintos entre os diferentes iECA sobre a angiogênese na musculatura esquelética. Alguns autores têm apontado que os inibidores da ECA tais como captopril, enalapril, lisinopril, entre outros, parecem inibir a angiogênese muscular. Fabre et al. (1999) demonstraram que o tratamento crônico com captopril não permitiu o aumento da densidade de capilares na musculatura esquelética de coelhos submetidos à cirurgia de isquemia no membro inferior. Mais recentemente, Bellamy et al. (2010) mostraram que o processo de restauração da vascularização no músculo tibial anterior (TA) de camundongos, que sofreram lesões vasculares, foi menor nos animais tratados com captopril, quando comparados ao controle. Por outro lado no miocárdio, Unger et al. (1992) demonstraram que o tratamento crônico com ramipril aumentava a capilarização, tanto com altas como baixas doses do fármaco. Concordando com esses achados, Ji et al. (2003) observaram que o tratamento com ramipril aumentava a expressão do VEGF no miocárdio e, mais recentemente, Zoja et al. (2011) verificaram o aumento do receptor do VEGF no miocárdio de ratos Zucker diabéticos tratados com ramipril. Porém, os resultados encontrados com ramipril eram específicos para musculatura cardíaca e pouco promissor na musculatura esquelética, uma vez que Costanza et al. (2002) observaram que camundongos que sofreram isquemia de membro inferior apresentaram uma redução na densidade capilar e na razão capilar/fibra quando tratados com ramipril ou losartan, ou seja, o ramipril influenciou negativamente o processo de angiogênese do membro isquêmico.

Por outro lado, tem sido demonstrado que o perindopril parece ter efeitos estimulatórios na angiogênese, tanto no miocárdio quanto na musculatura esquelética. Iazawa et al. (2002) mostraram aumentos significativos de capilares-por-miócitos em modelos de animais tratados com alta ingestão de sal e perindopril. Já no músculo esquelético, Silvestre e colaboradores (2002) e You et al. (2008) verificaram que ratos submetidos à cirurgia de isquemia nos membros inferiores apresentaram um aumento da angiogênese após tratamento com o perindopril, acompanhada de aumento da expressão da eNOS, embora a expressão do VEGF se encontrasse em níveis basais. A partir destas informações, pode-se observar que o perindopril parece não comprometer a angiogênese na musculatura esquelética ou cardíaca, ao contrário dos achados com captopril e ramipril. No

entanto, os mecanismos responsáveis pelo controle do aumento de vasos após o tratamento com perindopril ainda são poucos compreendidos.

Sabendo-se que a prática de exercício físico regular é recomendada aos pacientes hipertensos que fazem uso de iECA e que um dos mecanismos da redução da pressão arterial induzida pelo exercício físico em indivíduos hipertensos é o aumento da densidade capilar na musculatura esquelética, é importante ressaltar a necessidade do uso de determinados iECA que não atenuem a angiogênese. São escassos e controversos os estudos que combinam fármacos iECA e treinamento físico no entendimento da angiogênese. Gavin et al. (2000) demonstraram diminuição da expressão gênica do receptor do VEGF (flk-1) nos animais que realizaram exercício agudo e receberam captopril. Concordando com estes resultados, Amaral et al. (2001a, 2001b) demonstraram que o tratamento com captopril atenuou o aumento de VEGF e de angiogênese na musculatura esquelética nos animais normotensos que realizaram 3 dias de exercício ou 7 dias de estimulação elétrica. No entanto, o perindopril parece ter efeitos contrários. Minami et al. (2007) observaram que ratos espontaneamente hipertensos, treinados e tratados com perindopril, apresentaram um aumento da densidade capilar na musculatura esquelética quando comparados ao grupo somente treinado. Da mesma forma, Guo et al. (2010) mostraram que ratas fêmeas idosas exercitadas e tratadas com perindopril apresentaram um aumento na razão capilar/fibra nos músculos sóleo e gastrocnêmio, quando comparadas às ratas idosas sedentárias. Os resultados apresentados até o presente momento, apesar de escassos, têm sugerido que o perindopril parece não comprometer a angiogênese induzida pelo exercício físico. A hipótese deste trabalho é que o perindopril possa o fármaco de escolha mais apropriado, dentre os outros iECA, para hipertensos praticantes de exercício físico, uma vez que parece não atenuar a angiogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar os efeitos do uso crônico do captopril e perindopril na angiogênese induzida pelo treinamento físico em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos e investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nestas alterações.

2.2. Objetivos específicos

1. Comparar os efeitos de dois diferentes bloqueios farmacológicos do SRA (perindopril e captopril) na pressão arterial de repouso e se o treinamento físico aeróbio exerce algum efeito adicional.
2. Comparar os efeitos de dois diferentes bloqueios farmacológicos do SRA (perindopril e captopril) sobre a densidade de vasos da musculatura esquelética e cardíaca de animais normotensos e hipertensos submetidos a treinamento físico na esteira.
3. Comparar os efeitos do tratamento crônico com perindopril e captopril nos mecanismos responsáveis pela angiogênese na musculatura esquelética e cardíaca dos animais normotensos e hipertensos submetidos a um protocolo de treinamento físico aeróbio.

3. Materiais e métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências da UNESP, campus Bauru, (protocolo n 523/2014.vol.01). Foram utilizados 48 ratos normotensos (Wistar) e 48 ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 8 semanas de idade (200-250g), provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais da UNESP (Botucatu, SP, Brasil) e Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (São Paulo, Brasil) respectivamente. Os animais foram alojados em gaiolas, em grupos de 5 animais, e mantidos sob condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro de 12h, 22° C de temperatura) com acesso *ad libitum* à dieta padrão (Biobase, Brasil) e água filtrada no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

3.1. Desenho Experimental

Depois de feita a avaliação da capacidade física, os ratos normotensos e hipertensos foram divididos em 3 grupos experimentais, sedentários e treinados: 1/controle, 2/tratados com captopril e 3/tratados com perindopril. A Figura 1 representa o desenho experimental do presente estudo, destacando as 8 semanas de TF e 6 semanas de tratamento farmacológico. No final de 8 semanas, os animais foram canulados para medidas hemodinâmicas e eutanasiados no dia seguinte para retirada dos tecidos.

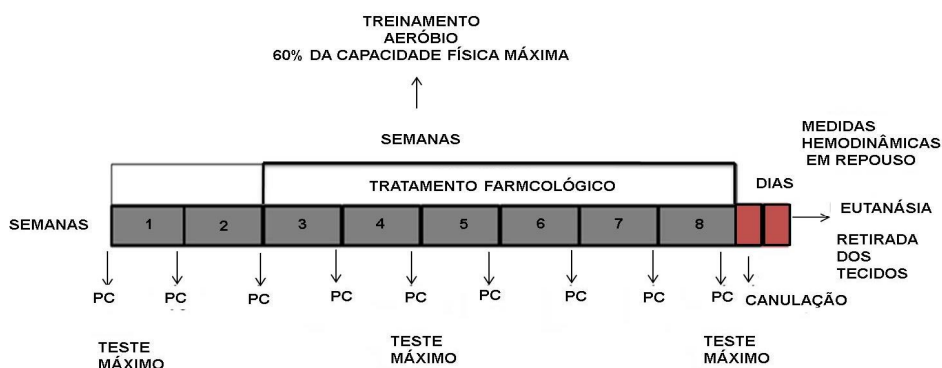


Figura 1. Delineamento do protocolo experimental durante as 8 semanas de treinamento aeróbico na esteira (cinza) , 6 semanas de tratamento com captopril ou perindopril e período de 2 dias de canulação, análises hemodinâmicas e retirada dos tecidos (vermelho). PC: Peso corporal.

3.2. Grupos experimentais

Após a determinação do PC e capacidade física, máxima os animais foram colocados em 3 grupos experimentais com PC e capacidade física semelhantes.

Grupo 1: Ratos que foram tratados com água: Grupo 1a: grupo de ratos normotensos (Wistar) sedentários controle (n=8), treinados controle (n=8) / Grupo 1b: grupo de ratos hipertensos (SHR) sedentários controle (n=8), treinados controle (n=8).

Grupo 2: Ratos que foram tratados com captopril (25mg/kg, por dia *i.p.*): Grupo 2a: grupos de ratos normotensos (Wistar) sedentários e tratados com captopril (n=8), treinados e tratados com captopril (n=8) / Grupo 2b: grupos de ratos hipertensos (SHR) sedentários e tratados com captopril (n=8), treinados e tratados com captopril (n=8).

Grupo 3: Ratos que receberam tratamento com perindopril (3 mg/kg de peso corporal, por dia, por gavagem): Grupo 3a: grupo de ratos normotensos (Wistar) sedentários e tratados com perindopril (n= 8), treinados e tratados com perindopril (n=8) / Grupo 3b: grupo de hipertensos (SHR) sedentários e tratados com perindopril (n=8), treinados e tratados com perindopril (n=8).

3.2.1. Peso corporal e teste de esforço máximo

Os animais foram pesados antes de iniciar o período do treinamento para separação dos grupos experimentais. Nas primeiras 2 semanas de treinamento todos os animais foram pesados somente 1 vez na semana, porém, após iniciar o período de 6 semanas de tratamento, os animais foram pesados a cada 2 dias para adequação da doses do tratamento farmacológico do captopril (25mg/kg) e perindopril (3 mg/kg). Após um período inicial de adaptação à esteira (5-10 dias), os ratos foram selecionados segundo sua habilidade de andar/correr em uma esteira ergométrica adaptada para ratos (10 raias suspensas de acrílico, Inbramed, Millennium). Logo após, foi avaliada a capacidade física máxima por meio de teste de esforço máximo (TEM). O teste de esforço máximo foi realizado como descrito anteriormente por Barel et. al. (2010). Em resumo, os ratos iniciaram o teste com a velocidade de 0,3 km/h e, a cada 3 min, aplicou-se um incremento de 0,3 km/h. A carga máxima foi definida a partir do momento em que os ratos pararam de correr espontaneamente. Foi demonstrada em segundos.

Os animais foram submetidos a um período de treinamento físico em esteira ergométrica durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no (TEM) conforme publicado anteriormente por Barel et.al. (2010). O teste máximo foi realizado no início (TEM-1) para a separação dos grupos, (TEM-2) para o ajuste da carga e garantia de manutenção da intensidade de treino e ao final da oitava semana (TEM-3) para verificação da efetividade do treinamento físico. Os ratos sedentários foram adaptados à esteira quinzenalmente e realizaram o TEM no mesmo momento que os treinados e permaneceram sedentários durante todo o período de treinamento físico.

3.3. Determinação da pressão arterial

3.3.1. Confeção de cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 Scientific Commodities Inc. Lake Havasu, AZ, Estados Unidos) previamente soldados a tubos de polietileno PE-10 (Scientific Commodities Inc. Lake Havasu, Az, Estados Unidos) como previamente publicado por Amaral et al., (2000).

Após o protocolo experimental os ratos foram anestesiados com ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 10 mg/kg) e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 50 mg/kg). Após localizar a artéria carótida, foi feita uma pequena incisão onde foi introduzida a parte mais fina da cânula, a qual foi preenchida com solução fisiológica heparinizada, como previamente publicado (HERRERA et al., 2016). A outra extremidade da cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Após o procedimento de fixação da cânula foi aplicado de forma cutânea no animal um analgésico (Flunixin meglumina 0,025 mg/kg *i.m.*, Scherin-Plough, Cotia, SP, Brasil).

3.3.2. Registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)

Após 24 horas do procedimento cirúrgico para colocação das cânulas. Foi realizado o registro da PA de repouso com os animais acordados e com livre movimentação. A cânula da artéria carótida foi conectada ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador, ADInstruments[®], Colorado Springs, CO, Estados Unidos) o qual foi conectado ao computador. Utilizando um software LabChartPro, foi obtida a PA pulsátil e média e a FC foi derivada diretamente pelo software a partir dos pulsos de PA.

3.4. Retirada dos músculo esqueléticos e cardíacos

Após os registros de PA, os animais foram eutanasiados, por sobrecarga de anestésicos, ANASEDAN (cloridrato de xilasina, 20mg/kg, *i.p.*) e DOPALEN (cloridrato de quetamina, 160mg/kg, *i.p.*) CEVA, Paulínia, SP, Brasil. O músculo esquelético tibial

anterior (TA) e miocárdio foram removidos, limpos em solução salina, pesados e separados para análise produção proteica ou processamento histológico.

3.5. Análises morfométricas

Os tecidos musculares foram imediatamente envolvidos por talco neutro, cobertos com *tissue tech*, colocados em microtubos de 1,5 ml com furos e mergulhados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as amostras foram armazenadas no freezer a -80° C. Todo este material coletado e congelado foi colocado no criostato (temperatura de -20°C), (Leica ®, CM 1850, Nussloch, Alemanha) para que os cortes fossem realizados. Foram feitos cortes transversais, com espessura de 10 µm, os quais foram colocados em lâminas. Foram feitas 2 lâminas por animal, com 6 cortes cada, que foram coradas pela técnica de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), como previamente publicado (HERRERA et al., 2016). Para tanto as lâminas foram retiradas do freezer -80° C e, após 10 minutos, as lâminas foram imersas na hematoxilina por aproximadamente 60s. Em seguida foram deixadas por 10 minutos submersas com água de torneira e, mergulhadas na eosina por 50 s. Logo após foram lavadas rapidamente e imersas em álcool etílico 70% (3 minutos), 80% (3 minutos), 90% (3 minutos) e 100 % (3 minutos) para o processo de desidratação e, em seguida, as lâminas foram imersas no xilol por 5 minutos até o procedimento de montagem. Cada lâmina foi montada com uma lamínula, fixada pelo *enttalan* e depois de algumas horas, já estavam prontas para as análises.

Antes da realização das análises morfométricas a identificação das lâminas foram tampadas a fim de garantir uma análise cega destas lâminas Para realização das análises morfométricas, 5 a 6 imagens (4080 x 3072 µm²) foram capturas pelo programa DP controler, nas objetivas de 20x ou 40x, utilizando o microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão). Foi utilizado o programa Imagen Pro Plus 6.2 e a razão capilar/fibra foi obtida pela razão entre a quantidade de capilares e fibras identificadas na imagem, como previamente descrito (Herrera et al., 2006).

3.6. Procedimento de dosagem de proteínas e produção proteica.

As amostras de 50 mg dos músculos TA e miocárdio foram homogeneizadas em slumção de ensaio de radioimunoprecipitação RIPA (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) contendo 0,5 M de Tris-HCl, pH 7,4, NaCl 1,5 M, ácido deoxicólico 2,5%, 10% de NP-40, EDTA a 10 mM, utilizando um homogeneizador (IKA, Staufen, Germany). Imediatamente antes da homogeneização, um coquetel de inibidores de protease (0,1%; Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) e 1% de fluoreto de fenil metilsulfonil (PMSF) foi adicionado às amostras. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 4° C a 11.200 g e o sobrenadante foi armazenado no freezer a -20° C.

A concentração das proteínas foi determinada utilizando a técnica de Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay, Padrão II, Hercules, California Usa). Foi utilizado a protein assay com a concentração de 1,44mg/ml, para a confecção da curva foram utilizados 9 poços com as concentrações crescentes utilizando o *protein assay* com a dosagem: 0,25µl ,0,50µl ,1µl ,2µl ,4µl ,6µl ,8µl ,10 µl os poços foram completados com quantidades específicas de água destilada onde o volume final foi de 150 µl. Após este procedimento em cada poço da curva foi adicionado mais 150 µl de Baradford resultando em um volume final de 300 µl em cada poço. Os valores de absorbância foram determinados usando um leitor de placas (BMG Labtech, spectro star nano, Ortenberg, Germany) pelo programa SPECOTRO star Nano. Em seguida, as amostras contendo 50-80µg de proteína foram separadas utilizando géis de 10% de poliacrilamida com uma coluna contendo marcardor de peso molecular entre 10 kDa a 250 kDa. Estes géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (190 mM de glicina, 25 mM Tris, 20% de metanol, pH 8,3). A carga de proteína igual em cada amostra foi confirmada utilizando-se 0,5% de coloração Ponceau. As membranas foram bloqueadas com 1,5% de soro de albumina bovino em soro fisiológico tamponado com Tween (TBS-T) durante 2 minutos utilizando o sistema SNAP-ID® 2.0 (Millipore, Darmstadt, Germany). Em seguida, as foram lavadas por 3 vezes com TBS-T e incubadas por 10 minutos com anticorpos primários diluídos em 3% de soro de albumina bovino: anticorpo monoclonal de camundongo anti VEGF humano (#554539, BD Pharmingen, San Diego, California, USA, 1:1.000), anticorpo policlonal de coelho anti VEGFR-2 humano (#9698, Cell Signaling Technology, 1:500) e anticorpo policlonal de camundongo anti eNOS humano (#610927, BD Pharmingen, San Diego, California, USA, 1: 500), e anticorpo policlonal de coelho anti GADPH human (# sc-25778, Santa Cruz

Biotchechology, Inc, Dallas, Texas, USA 1:1.000). As membranas foram lavadas por 3 x com TBS-T, logo após as lavagens, foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos com 1 % de soro de albumina bovino por 10 minutos: VEGFR-2 e GADPH (IgG anti-coelho 1:1.000) e VEGF e eNOS (anti-camundongo 1:1.000). O anticorpo foi detectado usando a reação de quimiluminescência (Super Signal Pico, Pierce' Rockford, Illinois, USA) e as membranas foram expostas a um filme de radiografia (Fuljifilm, Fuji Photo Fil Co. 26-30, Minato Ku, Tohyo, Japão). As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation, Beta 4.02; Rockway, New Jersey, USA).

3.7. Métodos estatísticos.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparar o peso corporal inicial e final do período de treinamento. Para comparação dos grupos de animais normotensos e hipertensos separadamente, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois caminhos, sendo 1 caminho o exercício e outro caminho ao tratamento farmacológico. Para comparação entre os grupos de animais hipertensos e grupo controle (Wistar) foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um caminho. O *post-hoc* de Tukey foi utilizado nos grupos que apresentaram diferenças significativas. Para todas as análises foi usado o programa de computador Sigma Sat 3.1 foi utilizado para os experimentos de comparação entre os grupos O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4.Resultados

A Tabela 1 ilustra o peso corporal dos animais normotensos e hipertensos durante o período de treinamento físico. Pode-se observar que todos os grupos apresentaram valores de peso corporal maior no final do treinamento físico, quando comparado com o início do TF. Portanto o peso corporal durante as 8 semanas foi semelhante entre os grupos de animais normotensos (Wsctr: + 42%, Wtctr: +40%, Wscap: +39%, Wtcap: +37%, Wspe: +38% e Wtpe: +37%) e animais hipertensos (Shsctr: +25%, Shtctr: +25%, Shscap: +22%, Shtcap: +26%, Shspe: +23% e Shtpe: +25%).

Tabela1. Valores do peso corporal inicial e final do período de treinamento físico dos animais normotensos e hipertensos

	Início (g)	Final (g)
Wsctr	278 ±12	395 ±10 [#]
Wtctr	286 ± 9	391 ± 7 [#]
Wscap	281 ± 10	386 ± 7 [#]
Wtcap	279 ± 6	384 ± 8 [#]
Wspe	279 ± 8	386 ± 7 [#]
Wtpe	283 ± 10	388 ± 8 [#]
Shsctr	240 ± 6	301 ± 9 [#]
Shtctr	244 ± 7	304 ± 6 [#]
Shscap	237 ± 10	291 ± 7 [#]
Shtcap	236 ± 7	297 ± 8 [#]
Shspe	239 ± 8	294 ± 9 [#]
Shtpe	246 ± 7	308 ± 8 [#]

Wsctr: normotenso sedentário controle; Wtctr: normotenso treinado controle; Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril. Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shtctr: hipertenso treinado controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril. Teste t de student, [#] vs início.

A tabela 2 representa a massa muscular do TA e coração dos animais normotensos e hipertensos normalizados pelo tamanho da tibia e pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos normotensos ou hipertensos, mostrando que nem o tratamento farmacológico, nem o treinamento físico promoveram qualquer mudança no peso muscular do TA e miocárdio dos animais.

Tabela 2. Valores de massa muscular do tibial anterior (TA) e miocárdio, normalizados pelo comprimento da tibia dos animais normotensos e hipertensos.

	TA (mg/cm)	Miocárdio (mg/cm)
Wsctr	168 ± 4	266 ± 5
Wtctr	173 ± 5	268 ± 5
Wscap	173 ± 3	263 ± 5
Wtcap	166 ± 3	271 ± 6
Wspe	173 ± 2	258 ± 4
Wtpe	177 ± 4	259 ± 7
Shsctr	122 ± 5	282 ± 8
Shtctr	122 ± 4	264 ± 11
Shscap	120 ± 3	265 ± 12
Shtcap	121 ± 4	263 ± 6
Shspe	126 ± 4	270 ± 8
Shtpe	128 ± 4	261 ± 7

Wsctr: normotenso sedentário controle; Wtctr: normotenso treinado controle; Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril. Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shtctr: hipertenso treinado controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril.

As Figura 2 e 3 ilustram a capacidade física dos animais ao final do protocolo de TF representado os valores de delta entre o 3° e o 1° TEM, nos grupos sedentários e treinados. Pode-se observar, na figura 2, que o TF aumentou significativamente a capacidade física dos grupos normotensos treinados, comparado com os seus respectivos grupos sedentários (-40s vs +405s; -36s vs +387s; -63s vs +396s, para controle, captopril e perindopril, respectivamente $p < 0,05$). O tratamento farmacológico não alterou a capacidade física dos animais.

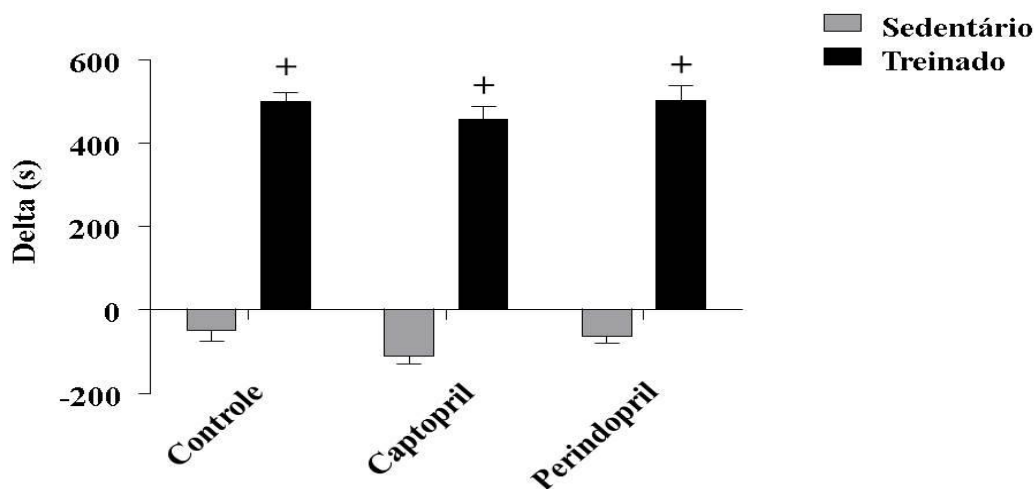
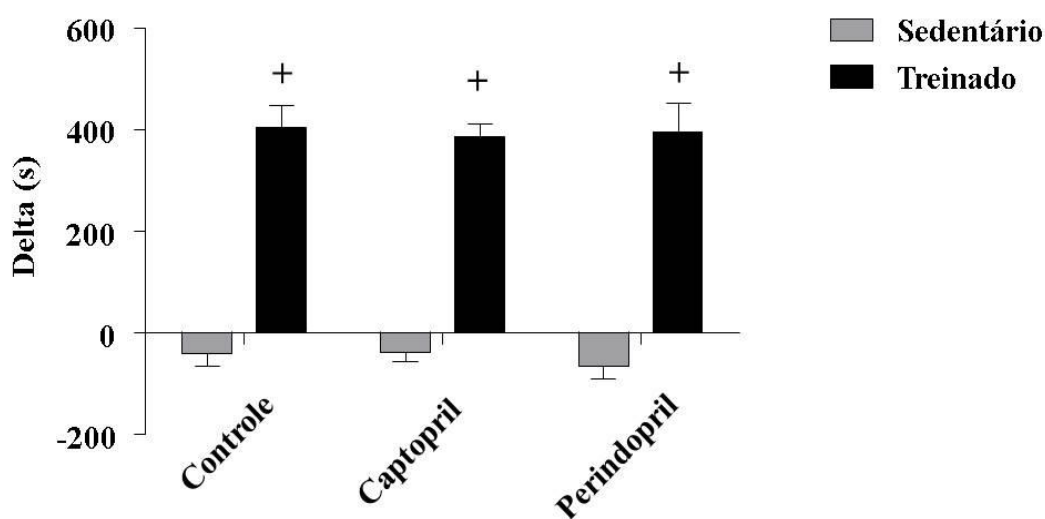


Figura 2. Diferença entre os resultados do 3º e 1º testes de capacidade física TEM em todos os grupos, demonstrados em segundos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 8-9 cada grupo. Significância: + vs sedentário, $p < 0,05$.

Da mesma forma, pode-se observar na figura 3 os valores de delta de segundos nos grupos hipertensos treinados foram maiores que seus respectivos sedentários (-48s vs +500s; -108s vs +457; -62 vs + 503s, para controle, captopril e perindopril, respectivamente $p < 0,05$). A capacidade física foi semelhante entre os grupos, independente do tratamento farmacológico.



Fi

Figura 3. Diferença entre os resultados do 3º e 1º testes de capacidade física em todos os grupos, demonstrados em segundos: controle, captopril e perindopril para ratos hipertensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 7-8 cada grupo. Significância: +vs sedentário, $p < 0,05$.

A eficácia dos bloqueios farmacológicos foi avaliada após protocolo experimental. Os animais normotensos controles apresentaram aumento de 18% na PAS após infusão de angiotensina I, pois esta angiotensina I provavelmente foi convertida em angiotensina II aumentando a PAS nos animais controles. Entretanto, os animais tratados com captopril ou perindopril apresentaram um aumento da PAS de 2%, que não foi significativo, isto ocorreu devido ao tratamento crônico com os iECA diminuíram a atividade da ECA..

A Figura 4 representa os valores hemodinâmicos ao final do protocolo experimental: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD), (C) pressão arterial média (PAM) e (D) frequência cardíaca (FC) dos animais

normotensos. Pode-se observar que todos os valores hemodinâmicos foram semelhantes entre os grupos.

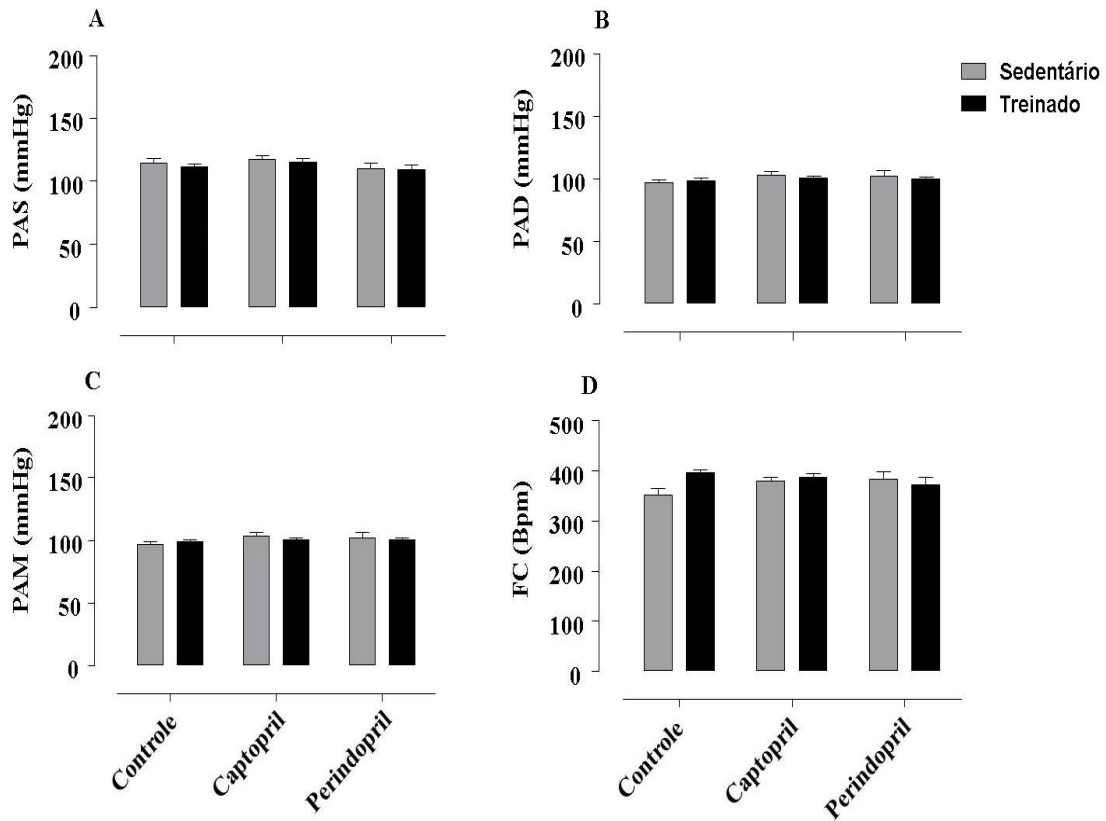


Figura 4. Valores da pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D) em todos os grupos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo.

A Figura 5 ilustra os resultados da PAS (painel A), PAD (painel B), PAM (painel C) e FC (D) nos animais hipertensos. Os animais hipertensos sedentários controles exibiram um aumento significativo das variáveis hemodinâmicas quando comparados aos animais normotensos sedentários: PAS (148 ± 6 vs 114 ± 4 mmHg, $p < 0,05$), PAD (128 ± 3 vs 96 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e PAM (135 ± 6 vs 102 ± 6 mmHg, $p < 0,05$). O tratamento com captopril reduziu significativamente a PA dos animais hipertensos sedentários (108 ± 10 vs 148 ± 6 mmHg; 87 ± 10 mmHg vs 128 ± 3 mmHg; 93 ± 10 vs 135 ± 5 mmHg, para PAS, PAD e PAM, respectivamente $p < 0,05$) comparados aos animais hipertensos sedentários controles. Da mesma forma, o tratamento com perindopril reduziu significativamente a PA dos animais hipertensos sedentários (101 ± 3 vs 148 ± 6 mmHg;

79 ± 5 vs 128 ± 3 mmHg; 87 ± 4 vs 135 ± 5 mmHg, para PAS, PAD e PAM, respectivamente p<0,05) quando comparados aos animais hipertensos sedentários controles. O TF foi eficaz em reduzir a PA nos animais hipertensos treinados do grupo controle, quando comparados aos seus respectivos sedentários: PAS (106 ± 3 vs 148 ± 6 mmHg, p<0,05), PAD (90 ± 3 vs 128 ± 3mmHg, p<0,05), PAM (95± 4 vs 135± 6 mmHg, p<0,05). Pode-se observar na Figura 5 que o TF não teve efeito adicional aos tratamentos farmacológicos nos animais hipertensos e treinados. A FC se manteve semelhante em todos os grupos analisados.

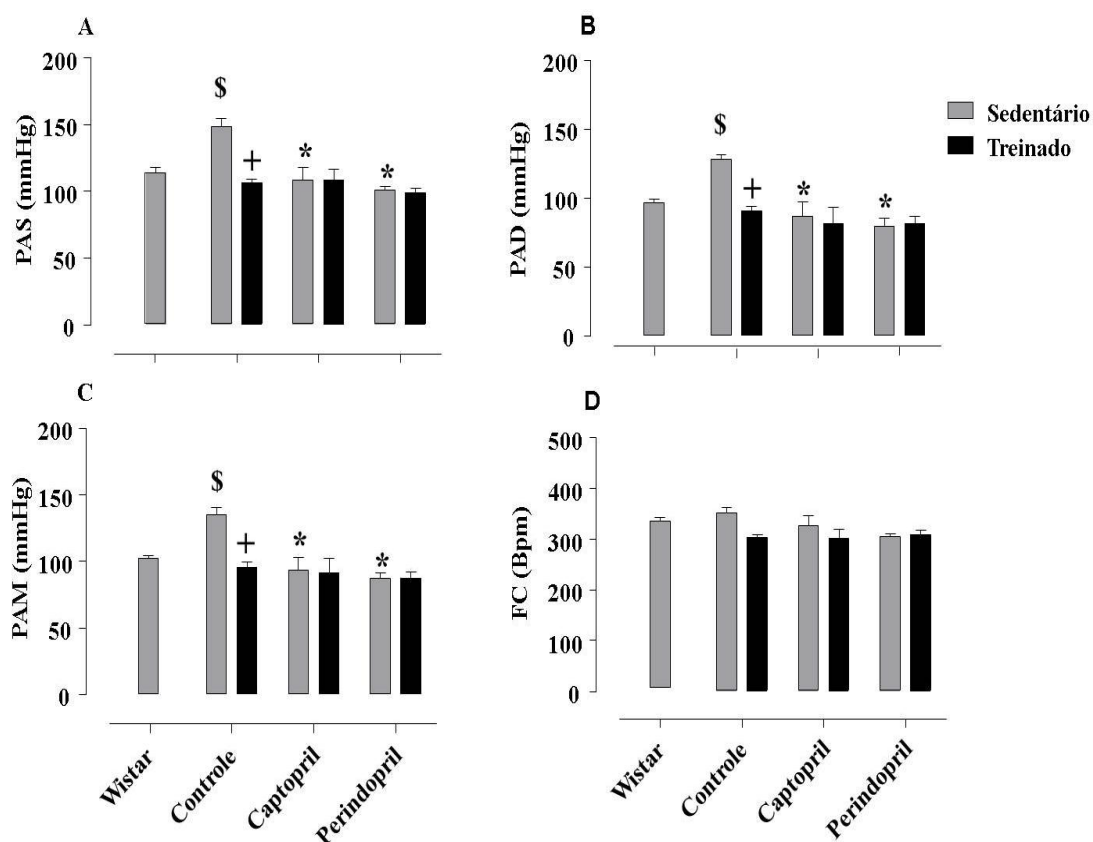


Figura 5. Valores da pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D) em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados, nos grupos controle, captopril e perindopril. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo Significância: \$ vs wistar, * vs controle, + vs sedentário, p< 0,05.

A figura 6 ilustra um cortes transversal do músculo TA, corados com hematoxilina e eosina, representativos nos grupos normotensos sedentários (A,C,E) e treinados (B,D,F), controles (A e B), tratados com captopril (C e D) ou perindopril (E e F). As imagens

sugerem que houve aumento de capilares (representado pelas setas) em todos os grupos treinados, no entanto, houve uma atenuação nos grupos tratados com iECA.

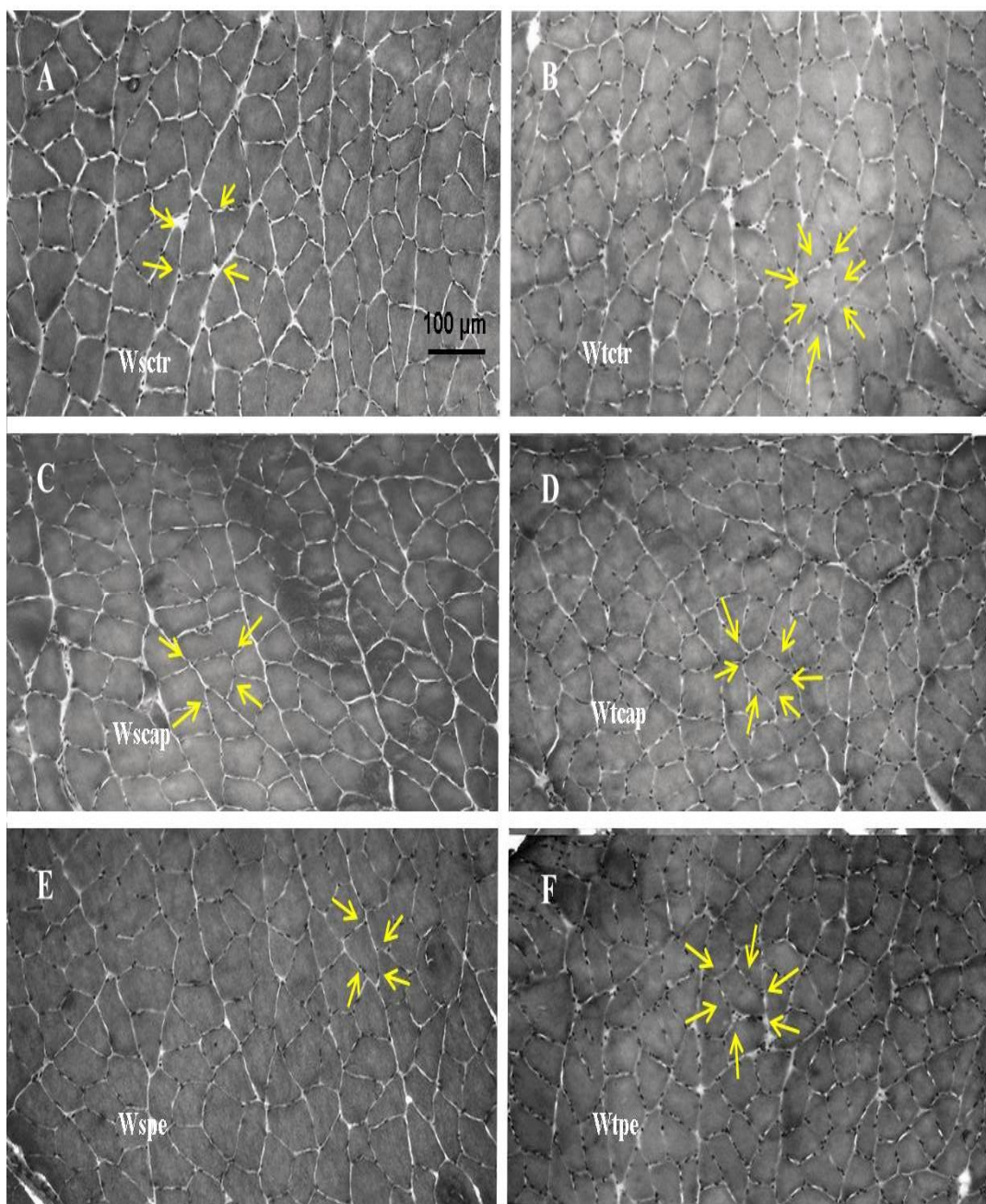


Figura 6. Imagens representativas do músculo tibial (TA, 10 µm), coloridas com hematoxilina e eosina para os grupos (A) Wstr: normotenso sedentário controle; (B) Wtctr: normotenso treinado controle; (C) Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; (D) Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; (E) Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; (F) Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares ao redor das fibras musculares.

A Figura 7 demonstra a análise quantitativa dos capilares no TA. Pode-se observar que o tratamento farmacológico não alterou a razão C:F nos grupos sedentários em relação ao grupo controle. Por outro lado, pode-se observar que o TF promoveu aumento significativo de (+34%) no grupo treinado controle, (+15%) no grupo treinado e tratado com captopril e (+21%) no grupo treinado e tratado com perindopril, comparados aos seus respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$).

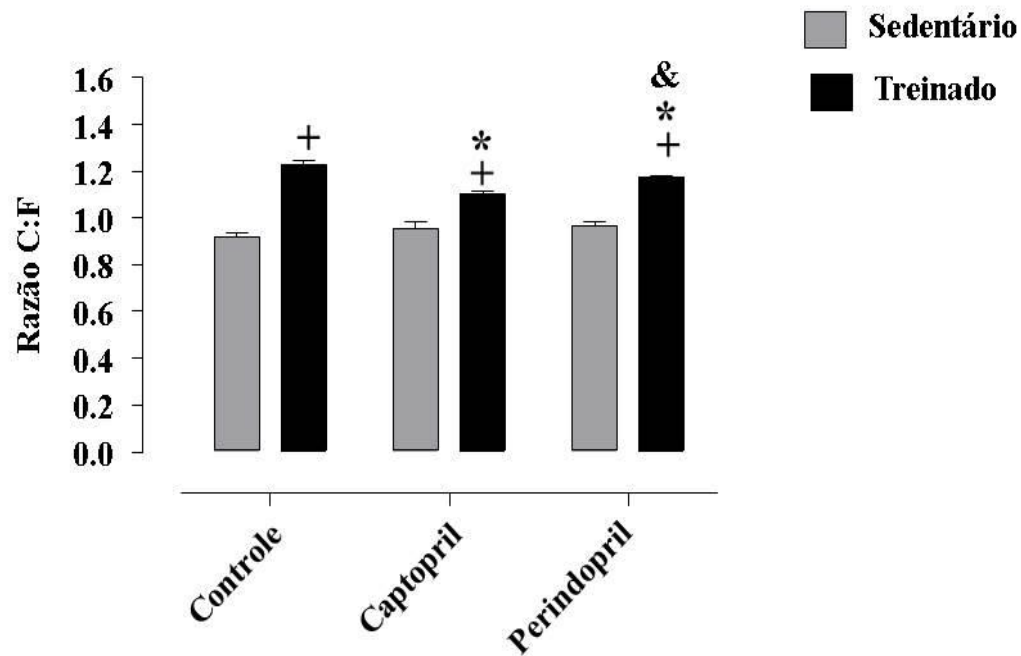


Figura 7. Razão capilar/fibra do músculo tibial anterior (TA) em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo. Significância: + vs sedentário, * vs controle, & vs captopril, $p < 0,05$.

A Figura 8 ilustra os resultados da análise densitométrica das proteínas VEGF (painel A), VEGFR-2 (painel B) e eNOS (painel C), as quais estão envolvidas no processo de angiogênese no músculo TA nos grupos normotensos e as imagens dos blots representativos de cada grupo. Pode-se observar que o tratamento farmacológico não alterou a produção de nenhuma das proteínas analisadas, nos animais sedentários a proteína VEGF não mudou, nem com o tratamento dos iECA e nem com o treinamento físico. Por outro lado, a produção do receptor de VEGF (VEGFR-2) aumentou significativamente apenas no grupo treinado controle (17%). Este aumento foi completamente inibido pelo tratamento com captopril e perindopril em ambos os grupos

treinados e tratados. O treinamento físico aumentou significativamente a produção da proteína eNOS em todos os grupos treinados (+31%, + 18% e + 32%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente), quando comparado a seus respectivos sedentários ($p < 0,05$). No entanto, o aumento da eNOS no grupo treinado e tratado com captopril foi menor quando comparado aos grupos treinado controle e treinado tratado com perindopril (-14% e 13%, respectivamente, $p < 0,05$). Já, o grupo treinado e tratado com perindopril apresentou valores semelhantes ao grupo treinado controle.

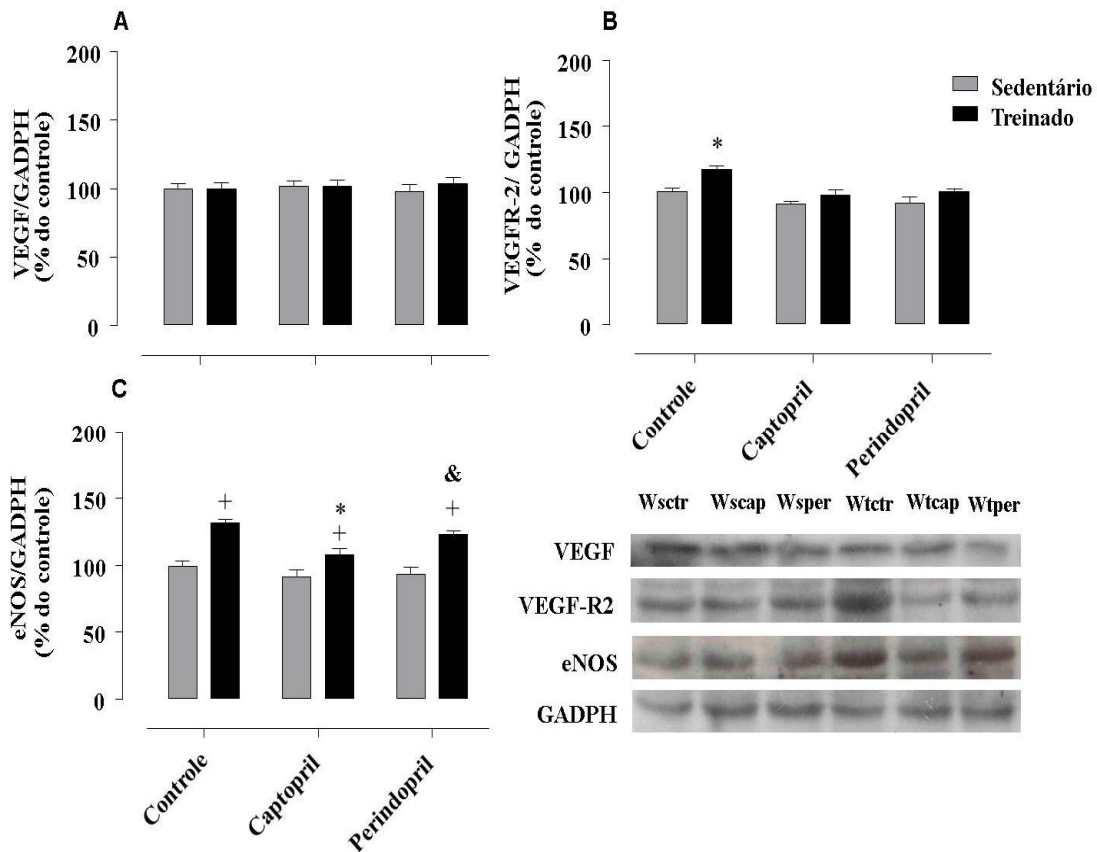


Figura 8. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo TA em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, em ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos em cada grupo: 7-8 animais. Significância: +vs sedentário, *vs controle & vs captopril, $p < 0,05$. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wsctr: normotenso sedentário controle; Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; Wsper: normotenso sedentário e tratado com perindopril; Wtctr: normotenso treinado controle; Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; Wtper: normotenso treinado e tratado com perindopril.

A figura 9 representa os cortes transversais do músculo TA corados com hematoxilina e eosina em todos os grupos wistar sedentário (A), hipertensos sedentários e tratados com captopril ou perindopril (B,D,F) e treinados controle e tratados com captopril ou perindopril (C,E,G). Pode-se observar que o SHR sedentários (B,D,F) possuem menos

capilares que os wistar (A) e o TF aumentou o número de capilares por fibra muscular em todos os grupos hipertenso treinados (C,E,G). Porém as imagens sugerem que houve aumento de capilares (representado pelas setas) que o tratamento com o captopril houve uma atenuação no treinado e tratado (E).

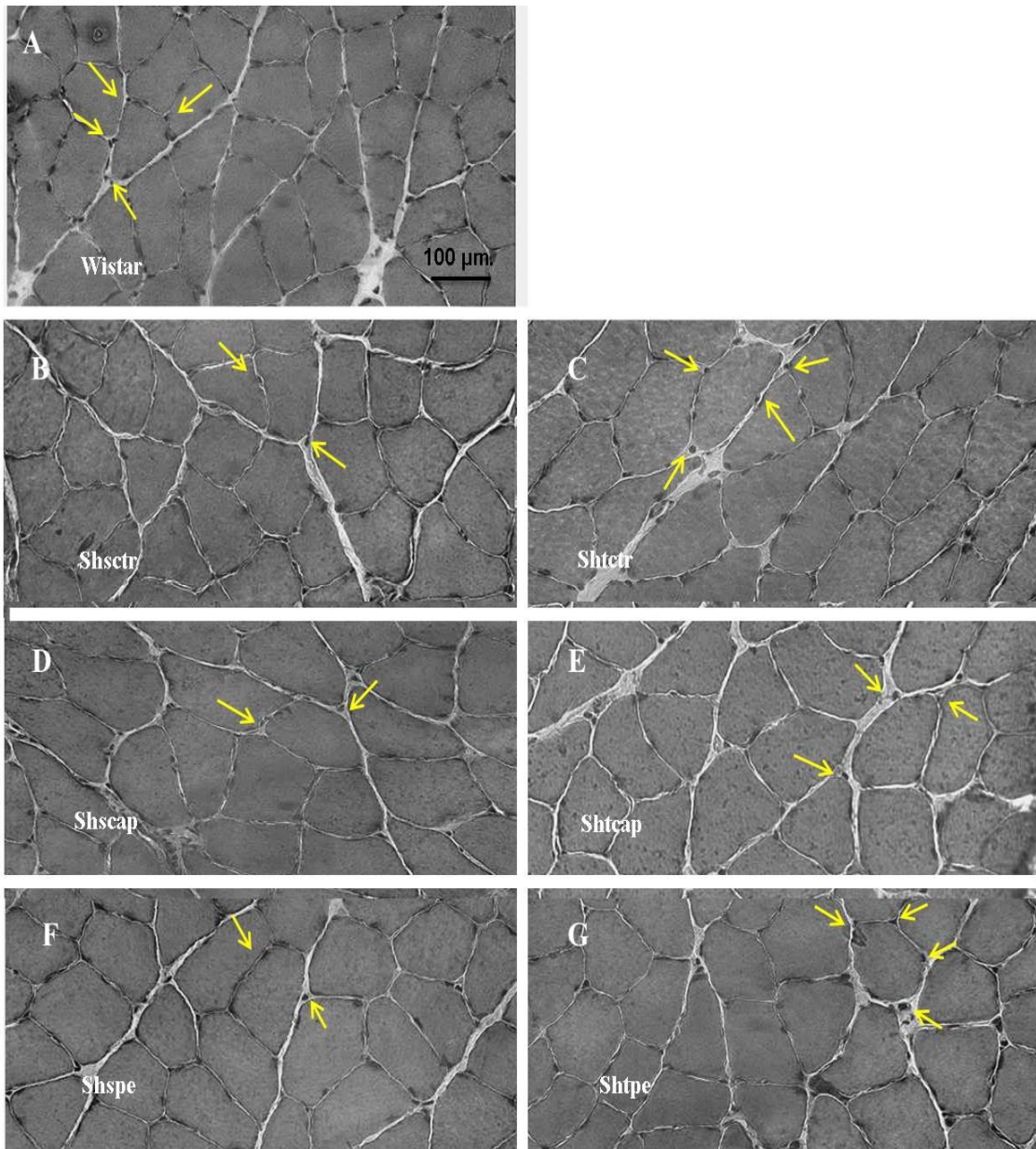


Figura 9. Imagens representativas do músculo tibial anterior (TA, 10 μm), coloridas com hematoxilina e eosina para (A) Wistar: normotenso sedentário, (B) Shsctr: hipertenso sedentário controle; (C) Shtctr: hipertenso treinado controle; (D) Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; (E) Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; (F) Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; (G) Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 μm. As setas indicam a localização dos capilares em volta das fibras musculares.

A Figura 10 demonstra a razão C:F do músculo TA nos animais hipertensos, sedentários e treinados e os animais wistar sedentário, que foram usados como controle normal. Observa-se que todos os grupos hipertensos sedentários, tanto controle, como os tratados com captopril ou tratado com perindopril apresentaram uma redução da razão C:F (-30%, -36% e -31%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente) quando comparados ao grupo wistar sedentário ($p < 0,05$). Por outro lado, todos os grupos hipertensos treinados apresentaram aumento nesta razão C:F (+47 %, +29% e 48%, para controle, tratado com captopril e tratado com perindopril, respectivamente) comparados ao seus respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$). Além disso, o TF foi capaz de prevenir a redução da razão C:F somente nos grupos hipertenso controle e hipertenso treinado e tratado com perindopril. Já, o tratamento com captopril atenuou o aumento em 18% da razão C:F observado após TF quando comparado ao grupo treinado controle.

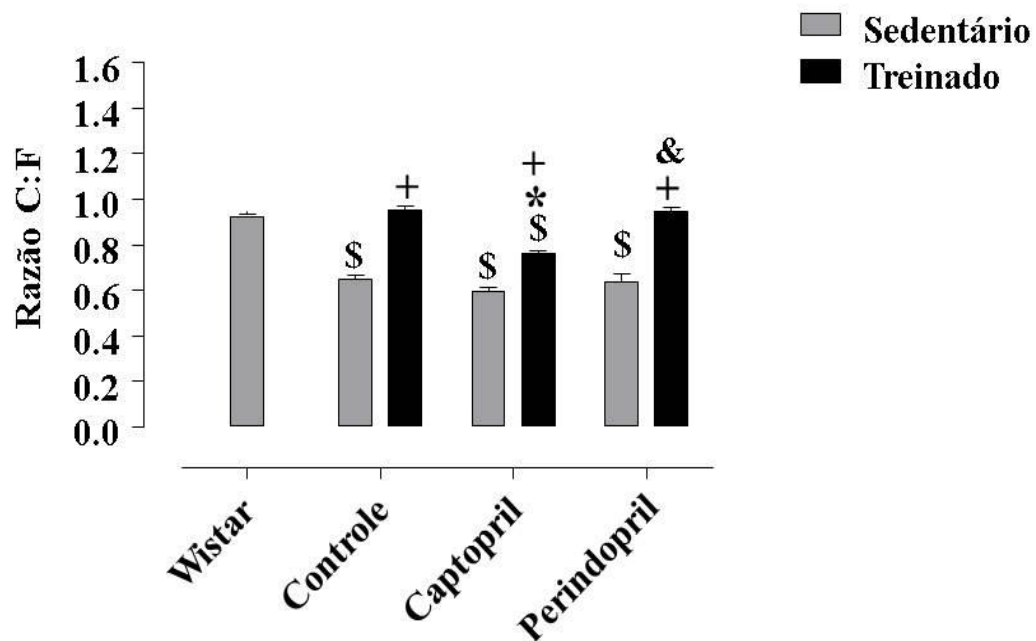


Figura 10. Razão capilar/fibra do músculo tibial anterior (TA) em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos usados: 5-7 cada grupo. Significância: \$ vs wistar, *vs controle, + vs sedentário & vs captopril, $p < 0,05$.

A Figura 11 ilustra os resultados da análise densitométrica das proteínas VEGF (painel A), VEGFR-2 (painel B) e eNOS (painel C), as quais estão envolvidas no processo

de angiogênese no músculo TA nos grupos normotensos e as imagens dos blots representativos de cada grupo. Conforme observado na Figura 11, a produção do VEGF encontrava-se reduzida significativamente nos grupos hipertenso sedentário controle, hipertenso sedentário tratado com captopril e sedentário tratado com perindopril (-27%, -26% e -26%, respectivamente) quando comparados ao grupo normotenso sedentário (Wistar, $p < 0,05$). O treinamento físico foi eficaz em aumentar a produção do VEGF em todos os grupos hipertensos treinados (+38%, +34% e +36%) comparados aos seus respectivos grupos hipertensos sedentários ($p < 0,05$), além disso, foi capaz de evitar a redução do VEGF em todos os grupos hipertensos treinados comparados com o grupo wistar sedentário. A produção do VGFR-2 foi semelhante em todos os grupos analisados. Já, a proteína eNOS encontrava-se com sua produção diminuída nos grupos hipertenso sedentário controle (-27%), hipertenso sedentário e tratado com captopril (-31%) e no hipertenso sedentário e tratado com perindopril (-23%) quando comparados ao grupo normotenso sedentário ($p < 0,05$). A produção da eNOS também aumentou com o TF grupos hipertensos (+50% +23% e +38%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente, $p < 0,05$), comparados aos seus respectivos grupos hipertensos sedentários. Entretanto, os animais hipertensos treinados e tratados com captopril apresentaram um aumento da produção de eNOS significativamente menor (-27%) que os animais controles ou tratados com perindopril, como pode-se observar na Figura 11.

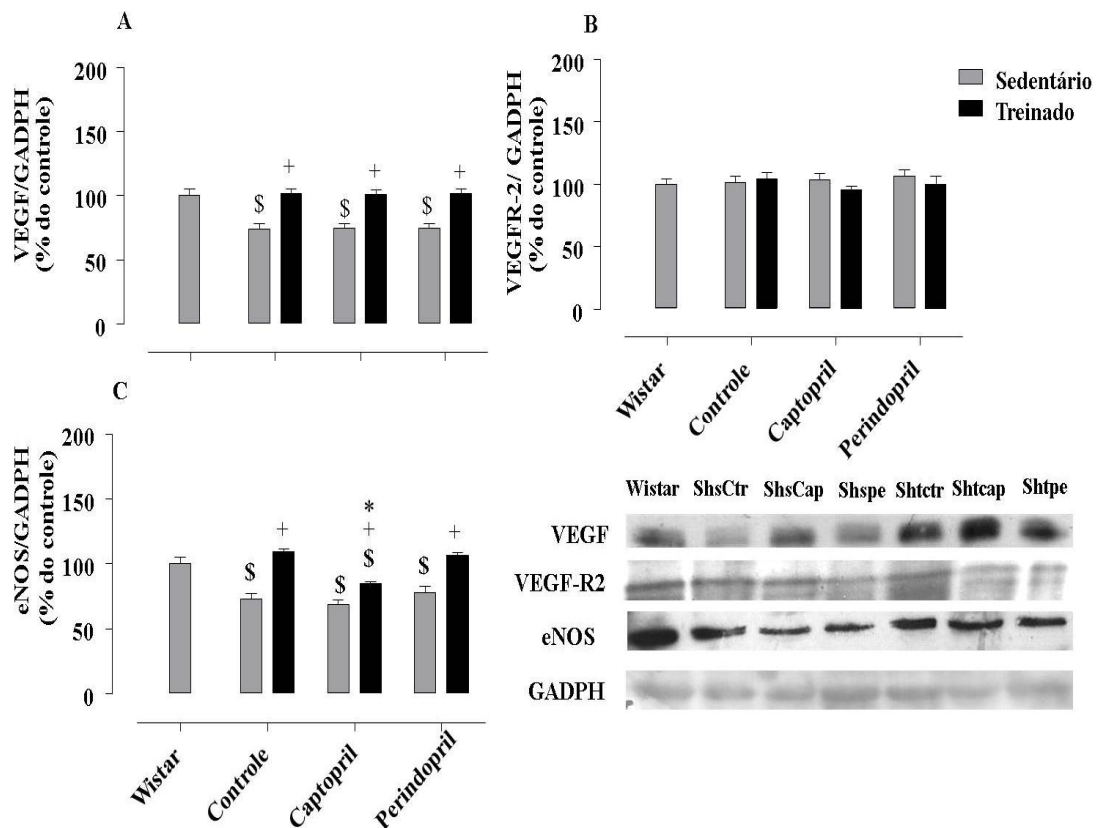


Figura 11. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo TA em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos em cada grupo: 6-7 animais. Significância: ^{\$} vs wistar +vs sedentário, ⁺vs controle, $p < 0,05$. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wistar: normotenso sedentário, Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; Shtctr: hipertenso treinado controle; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril.

A figura 12 ilustra os cortes transversais do miocárdio corados com hematoxilina e eosina em todos os grupos normotensos sedentários e treinados, controle e tratados com captopril ou perindopril. As setas das figuras indicam os capilares em torno da fibra muscular. Pode-se observar que os grupos treinados (B,D,F) apresentam um aumento no número de capilares em relação aos grupos sedentários (A,C,E). Aparentemente os tratamentos farmacológicos não alteram o número de capilares.

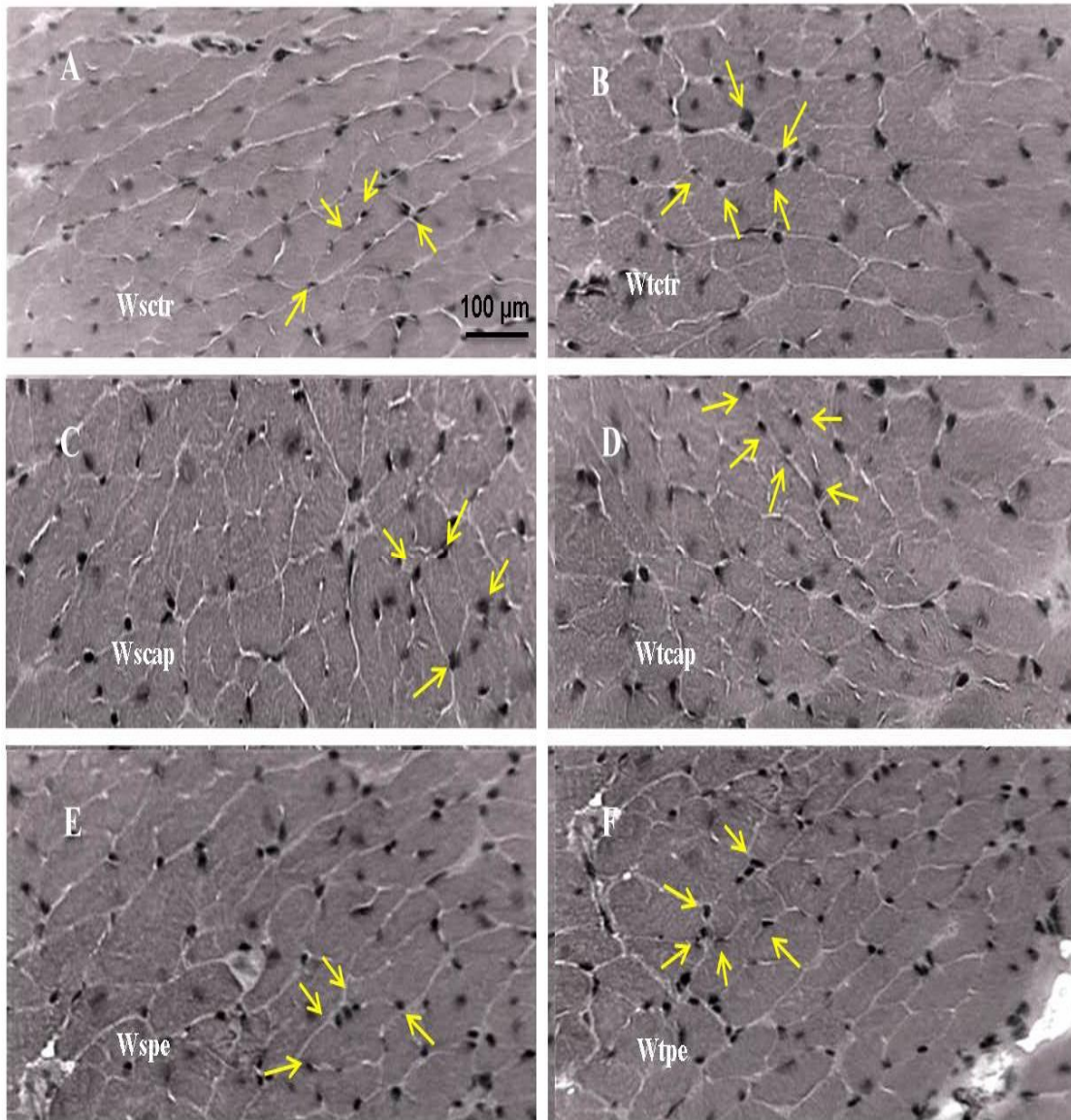


Figura 12. Imagens representativas do miocárdio (10 µm) coloridos com hematoxilina e eosina para os grupos (A) Wsctr: normotenso sedentário controle; (B) Wtctr: normotenso treinado controle; (C) Wscap: normotenso sedentário e tratado com captopril; (D) Wtcap: normotenso treinado e tratado com captopril; (E) Wspe: normotenso sedentário e tratado com perindopril; (F) Wtpe: normotenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares ao redor das fibras musculares.

A Figura 13 representa a razão C:F no miocárdio dos animais normotensos. O tratamento farmacológico com captopril ou perindopril não promoveu qualquer alteração nesta variável nos animais treinados ou sedentários. Pode-se observar que todos os animais normotensos treinados exibiram aumento da razão C:F no miocárdio (+15%, 15% e 12%,

para controle, captopril e perindopril, respectivamente), quando comparado aos sedentários ($p < 0,05$).

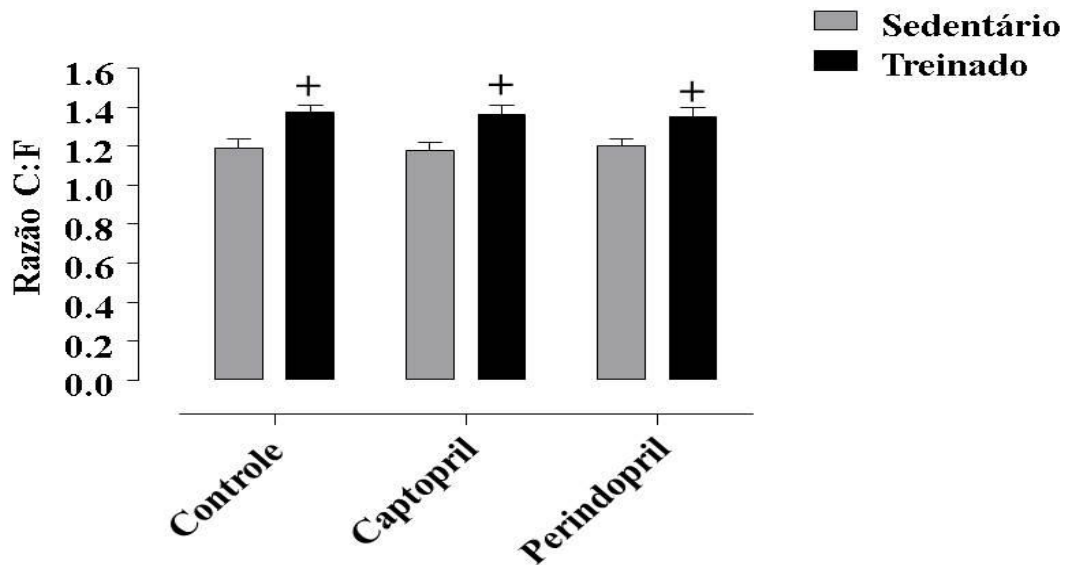


Figura 13. Razão capilar/fibra do miocárdio em todos os grupos: controle, captopril e perindopril para ratos normotensos sedentários e treinados. Número de ratos usados: 5-6 cada grupo. Significância: + vs sedentário, $p < 0,05$.

A Figura 14 ilustra o resultado das análises densitométricas das proteínas VEGF (painel A), VEGFR-2 (painel B) e eNOS (painel C) envolvidas no processo de angiogênese, no miocárdio dos grupos normotensos sedentários e treinados, tratados com captopril ou perindopril. Nem o tratamento farmacológico, nem o TF determinaram alterações significativas na produção de VEGF ou de seu receptor VEGFR-2 no miocárdio dos animais normotensos. Pode-se observar, na Figura 14, que os tratamentos farmacológicos não determinaram alterações na produção proteica da eNOS, no entanto, TF determinou aumento significativo da produção proteica em todos os grupos analisados (+26%, +21% e +28%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente, $p < 0,05$), comparados com seus respectivos sedentários.

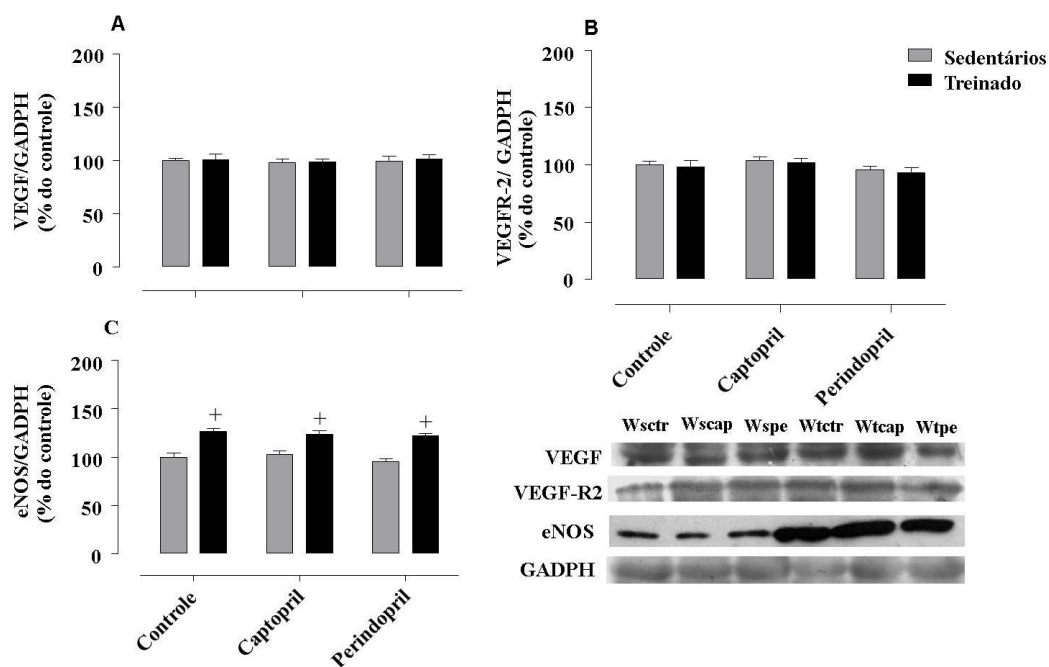


Figura 14. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no miocárdio em todos os grupos: controle, captopril e perindopril, em ratos sedentários e treinados. Número de ratos em cada grupo: 7-8 animais. Significância: +vs sedentário, $p < 0,05$. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wsctr: normotenso sedentário controle; Wscap: normotenso sedentário tratado com captopril; Wspe: normotenso sedentário tratado com perindopril; Wtctr: normotenso treinado controle; Wtcap: normotenso treinado tratado com captopril; Wtpe: normotenso treinado tratado com perindopril.

A figura 15 ilustra representa os cortes transversais do miocárdio corados com hematoxilina e eosina em todos os grupos wistar sedentário (A), hipertensos sedentários controle e tratados com captopril ou perindopril (B,D,F) e treinados controle e tratados com captopril ou perindopril (C,E,G). Pode-se observar que o SHR sedentários (B,D,F) possuem menos capilares que os wistar (A) e o TF aumentou o número de capilares por fibra muscular em todos os grupos hipertenso treinados (C,E,G). E o tratamento com iECA não promoveram qualquer alteração do aumento do número de capilares.

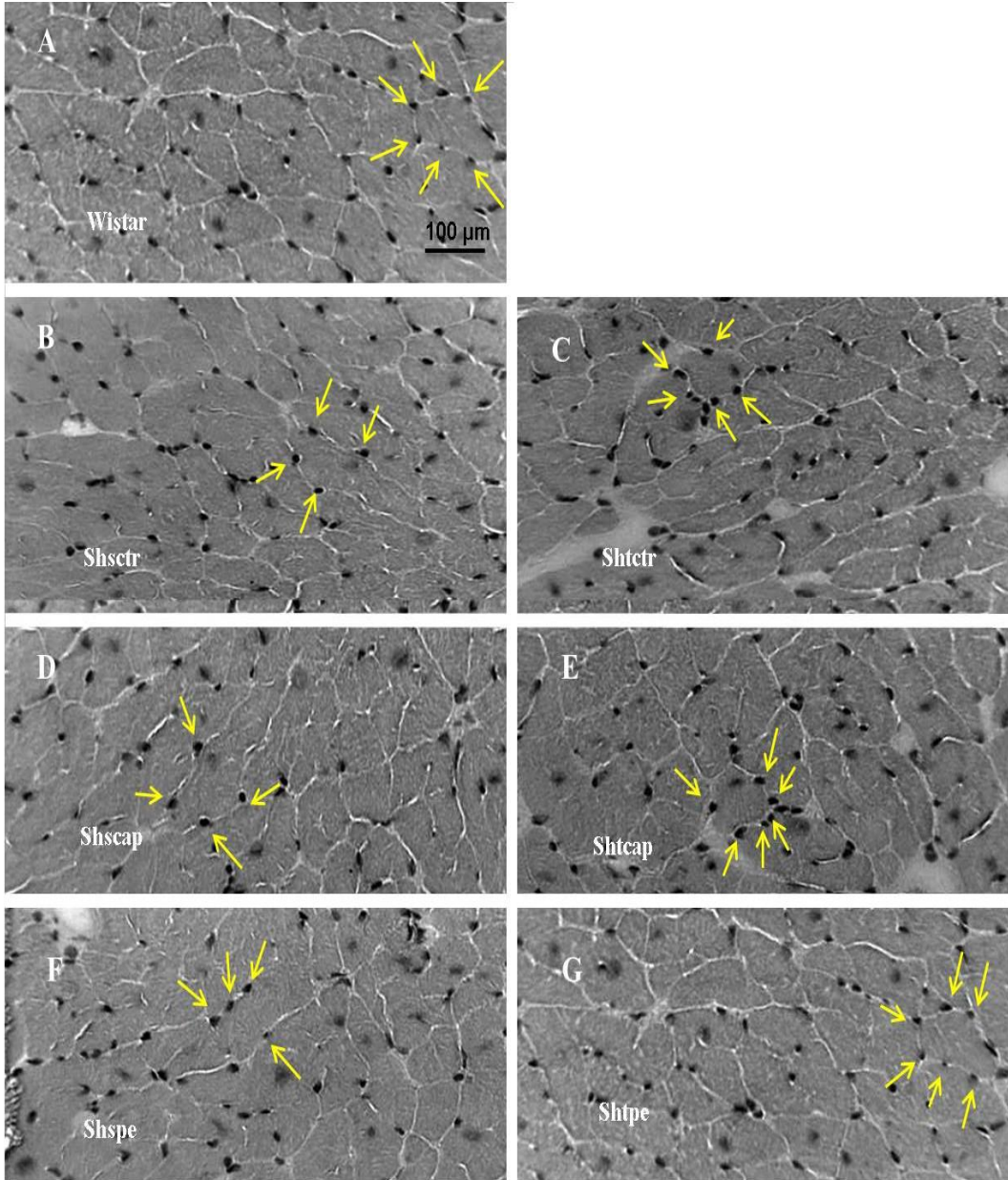


Figura 15. Imagens representativas do micário (10 µm), coloridas com hematoxilina e eosina parapara (A) Wistar: normotenso sedentário, (B) Shsctr: hipertenso sedentário controle; (C) Shtctr: hipertenso treinado controle; (D)Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; (E) Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; (F) Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; (G) Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril. Escala 100 µm. As setas indicam a localização dos capilares em volta das fibras musculares.

Como pode se observar na Figura 16, a razão C:F no miocárdio estava reduzida em todos os grupos hipertensos sedentários (-24%, -24% e -23%, para controle, captopril e perindopril respectivamente, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo normotenso sedentário. Entretanto, todos os grupos hipertensos treinados apresentaram aumento significativo da razão C:F (+29%, +28% e +30%, para controle, captopril e perindopril respectivamente, $p < 0,05$) quando comparados aos respectivos hipertensos sedentários. A Figura 16 revela ainda que a razão C:F dos animais hipertensos treinados foi semelhante aquela encontrada nos animais normotensos sedentários (Wistar)

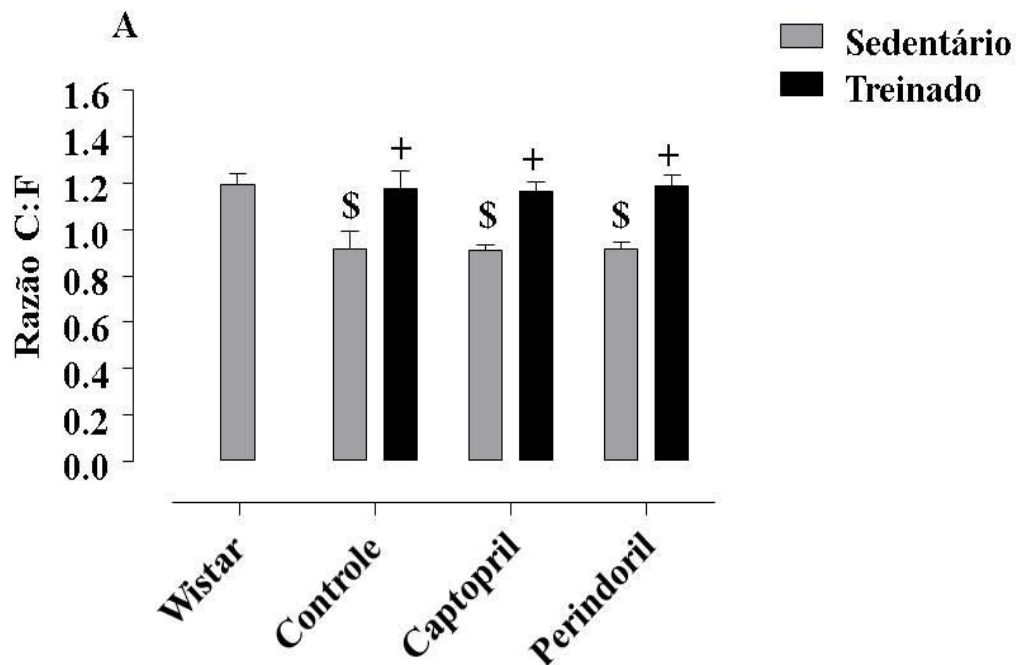


Figura 16. Razão capilar/fibra do miocárdio em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril.. Número de ratos usados: 5-7 cada grupo. Significância: \$ vs wistar, + vs sedentário, $p < 0,05$.

A Figura 17 ilustra o resultado das análises densitométricas das proteínas VEGF (painel A), VEGFR-2 (painel B) e eNOS (painel C) envolvidas no processo de angiogênese no músculo miocárdio em todos os grupos analisados. Pode-se observar que a produção proteica de VEGF estava reduzida em todos os grupos hipertensos (-18%, -19%, -21%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente $p < 0,05$), comparados ao grupo normotenso sedentário. O TF foi eficaz em aumentar significativamente a produção de

VEGF em todos os grupos, de forma semelhante (+25%, +27% e +33%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente, $p < 0,05$), quando comparados aos sedentários hipertensos. Os valores de VEGF nos animais hipertensos treinados foram semelhantes aos dos animais normotensos sedentários. A produção proteica do VEGFR-2 não foi influenciada nem pelo tratamento farmacológico nem pelo TF. A produção proteica da eNOS encontrava-se reduzida nos grupos hipertensos sedentários (-25%, -20% e -19%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente $p < 0,05$) quando comparada ao grupo normotenso sedentário. Já o TF determinou aumento significativo da produção proteica de eNOS em todos os grupos (+30%, +24% e +26%, para controle, captopril e perindopril, respectivamente, $p < 0,05$).

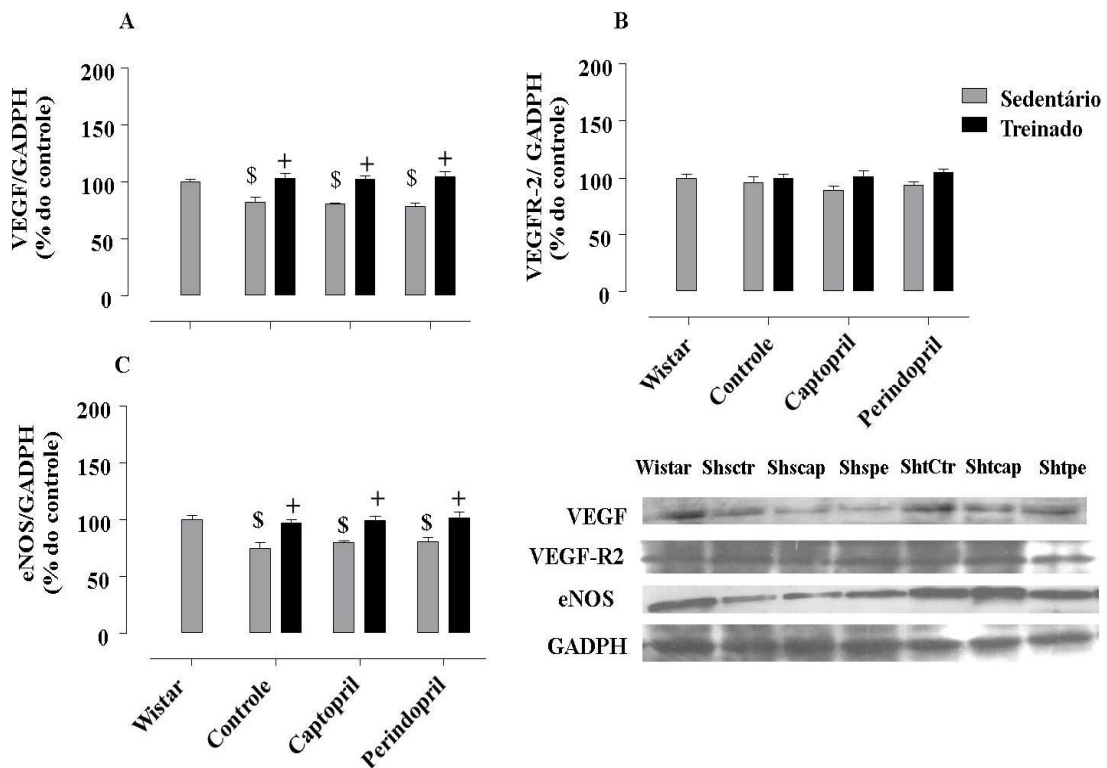


Figura 17. Análise densitométrica do VEGF (A), VEGFR-2 (B) e eNOS (C) dos níveis das proteínas normalizado pelo GADPH no músculo miocárdio em todos os grupos: normotenso sedentário, hipertensos sedentários e treinados controle, captopril e perindopril. Número de ratos em cada grupo: 6-7 animais. Significância: $^{\$}$ vs wistar * vs controle $p < 0,05$. Blots representativos do VEGF, VEGFR-2, e eNOS para Wistar: normotenso sedentário, Shsctr: hipertenso sedentário controle; Shscap: hipertenso sedentário e tratado com captopril; Shspe: hipertenso sedentário e tratado com perindopril; shtctr: hipertenso treinado controle; Shtcap: hipertenso treinado e tratado com captopril; Shtpe: hipertenso treinado e tratado com perindopril.

5. Discussão

Os principais achados deste estudo foram que o TF regular aeróbio reduziu a PA dos animais hipertensos e aumentou significativamente a razão capilar/fibra nos músculos esquelético e cardíaco e o uso crônico do captopril atenuou a angiogênese induzido pelo TF na musculatura esquelética. Por outro lado, o perindopril não atenuou a angiogênese induzida pelo TF. Esta resposta diferenciada entre captopril e perindopril parece depender da produção da eNOS.

Já é sabido que o SRA é responsável pelo controle da homeostase de sódio e água, mas não estão claros os efeitos dos inibidores do SRA tais como os iECA sobre o PC. Os poucos estudos que existem sobre os efeitos destes fármacos sobre o PC sugerem que não há efeitos diretos, o que foi confirmado pelos resultados do presente estudo, uma vez que nem o captopril, nem o perindopril interferiram no ganho de PC após 8 semanas de sedentarismo ou treinamento físico (HABOUZIT et al., 2009; GUO et al., 2010; RAKUSAN et al., 2010; MINAMI et al., 2007). No presente estudo, o tratamento farmacológico com captopril e perindopril também não alterou a massa do músculo TA e do miocárdio nos ratos normotensos ou hipertensos, sedentários ou treinados. Embora o estudo de Guo et al. (2010) tenha demonstrado que o tratamento crônico com perindopril em ratas Wistar idosas sedentárias e treinadas possa ter reduzido a área de secção transversa dos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio, outros achados na literatura não confirmam esta resposta (AMARAL, PAPANÉK, GRENE, 2000; MINAMI et al., 2007; HABOUZIT et al., 2009; GARCIARENA et al., 2009; RAKUSAN et al., 2010).

A incidência da HA na população mundial vem aumentando significativamente, com isso, várias estratégias farmacológicas e não farmacológicas vêm sendo utilizadas como forma de prevenção ou tratamento da HA. Dentre as várias estratégias farmacológicas existentes, os iECA vêm recebendo atenção devido a sua potente ação em reduzir a hipertrofia ventricular, facilitar a ação da bradicinina circulante e assim reduzir a PA e mortalidade (PROGRESS, 2001; TUBFULL et al., 2003; FERRARA, 2005; PILOTE et al., 2008; PROGRESS, 2011; VAN VARK et al., 2012). Pilote et al. (2008) compararam os efeitos de diferentes iECA no primeiro mês de recuperação após infarto e demonstraram que o ramipril e o perindopril foram os mais eficazes quando comparados ao captopril na diminuição do risco de mortalidade desses pacientes. Esta diferença de efetividade pode ser explicada devido às características bioquímicas e farmacológicas entre os grupos destes fármacos, ou seja, o grupo dos carboxil, como por exemplo, o perindopril,

o terminal ligante ao sítio de ligação do íon zinco da ECA parece ter maior afinidade quando comparado ao terminal ligante do grupo dos sulfidril, como por exemplo, o captopril (BROW et al., 1998, CECONI et al. 2010). Além disso, as formas de administração são distintas entre as classes dos iECA: o grupo carboxil é administrado como pró-droga, a qual permite um maior tempo de concentração plasmática e meia vida plasmática, quando comparado a forma de administração como droga ativa, do grupo do sulfidril, deste modo os efeitos do perindopril parecem ser mais prolongado quando comparado ao captopril (FERRARI, et al., 2005, BROW et al., 1998).

Apesar destas diferenças, a presente investigação demonstrou que o tratamento com captopril ou perindopril não promoveu nenhuma alteração na PAS, PAD, PAM e FC nos grupos normotensos sedentários, mas reduziu a PA dos ratos hipertensos na mesma magnitude. Anteriormente, Shamra e Kasevarao (1989), utilizando uma dosagem maior de captopril (40 mg/kg e 80 mg/kg) quando comparado ao nosso presente estudo (25mg/kg), haviam demonstrado que o tratamento com captopril, por 5 semanas, reduzia a PAM de animais normotensos. Mais recentemente, Guo et al. (2010) observaram que o tratamento por 6 meses com perindopril reduziu a PAS de ratas normotensas idosas, entretanto os níveis PAS das ratas do grupo controle encontravam-se acima dos valores basais medidos no presente estudo (em torno de 155 mmHg). Além de serem também maiores que os valores normativos para classificação de normotensão (VII DBH, 2016). Apesar de alguns autores sugerirem uma maior eficácia do perindopril, comparado ao captopril na inibição da ECA (Risher, Doussau, Giudiceli, 1989; Lee et al., 1989 e Tokita et al., 1995), os estudos relacionados a este assunto ainda são controversos e os mecanismos não estão totalmente esclarecidos. Os resultados do presente trabalho demonstraram que ambos os tratamentos, com captopril ou perindopril, foram eficazes em reduzir a PA nos animais hipertensos, que se apresentava elevada quando comparada aos animais normotensos. Os valores de PA dos animais hipertensos tratados com iECA estavam semelhantes aos valores de PA dos animais normotensos, confirmando a eficácia de ambos os tratamentos com captopril e perindopril no controle de PA, como demonstrado por Canby et al. (1989) e Dong et al (2002).

Exercício físico programa regular de exercício físico aeróbio, complementado com exercícios resistidos, vem sendo considerado como coadjuvante no controle e tratamento da HA (MANCIA et al, 2013; VII DBH, 2016). Já está bem estabelecido que o exercício físico crônico promove ajustes importantes no organismo, os quais contribuem para a

redução dos valores pressóricos, tais como diminuição da atividade simpática, redução da razão parede/luz das arteríolas da microcirculação, redução da hipertrofia ventricular e prevenção da rarefação, tanto em humanos como em modelos animais (AMARAL et al., 2000; LOPES et al., 2003; WALLACE, 2003; LATERZA et al., 2007; HANSEN et al., 2010; AMARAL & MICHELINI, 2011; KOKKLINOS, 2012; FERNANDES et al., 2012; MANCIA et al., 2013; HERRERA et al., 2016). O TF não alterou os níveis pressóricos do grupo normotenso controle, concordando com os resultados previamente publicados do nosso grupo (AMARAL et al., 2000; 2001; HERRERA et al., 2016). No entanto, 8 semanas de exercício aeróbio na esteira, a 60% da capacidade física máxima, conforme recomendação da VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão de 2016 foi eficaz em diminuir a PAS, PAD e PAM (-29%, -30% e -30% respectivamente) nos SHR treinados, quando comparados aos SHR sedentários, os quais apresentavam a PA significativamente maior que os animais normotensos sedentários. Estes resultados estão de acordo com a literatura e confirmam a efetividade do TF em reduzir a PA nos animais hipertensos (AMARAL et al., 2000, LATERZA et al., 2007; AMARAL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012).

A efetividade do TF em nosso estudo foi confirmada pelo aumento significativo da capacidade física máxima dos animais treinados, tanto os normotensos como hipertensos, confirmando os resultados previamente publicados pelo nosso grupo utilizando este protocolo de TF em esteira (AMARAL et al., 2008; BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; HERRERA et al., 2016). O tratamento com captopril ou perindopril não afetou a eficácia do TF em aumentar a capacidade física nos animais. Estes resultados estão de acordo com trabalhos na literatura onde mostraram que o tratamento crônico com iECA não reduziu a capacidade máxima ou a captação máxima de oxigênio em animais normotensos ou hipertensos (MINAMI et al., 2007; HABOUZIT et al., 2009; GUO et al., 2010).

Os resultados do presente estudo demonstram que tanto o TF como os tratamentos com a ECA foram efetivos em reduzir a PA dos ratos hipertensos, no entanto não houve nenhum efeito adicional sobre a PA. Concordando com estes achados, Rebelo, Schreckenber, Schluter (2012) mostraram que o tratamento crônico com o captopril não modificou PAS e PAD no grupo de ratas hipertensas treinadas e tratadas comparadas ao seu grupo controle. Em indivíduos hipertensos, o tratamento crônico com captopril também não influenciou o efeito hipotensivo agudo do exercício resistido na PAS e PAD

dos pacientes (QUEIROZ et al., 2017). Estes achados sugerem que o tratamento crônico com captopril ou perindopril não traz benefícios adicionais ao efeito hipotensivo promovido pelo TF, o que favorece a indicação do uso de exercício no controle da PA, uma vez que não possui efeitos colaterais.

Uma das principais características encontradas na HA crônica é o comprometimento da microcirculação, reduzindo a densidade de capilares em vários tecidos do corpo, fenômeno este chamado de rarefação (AMARAL e al, 2000; AMARAL & MICHELLINI, 2011; FERNANDES et al., 2012). A rarefação pode contribuir para o aumento da resistência periférica local, colaborando para o aumento da PA (GREENE, et al., 1989, HEAGERT, et al., 1993; LEVY, et al., 2001; AMARAL et al, 2001; AMARAL e MICHELIN, 2011). Por outro lado, um dos principais efeitos do TF na microcirculação é o crescimento de novos vasos sanguíneos na musculatura esquelética e cardíaca a partir dos vasos já existentes, e este processo é conhecido como angiogênese (AMARAL et al., 2000; HANSEN et al., 2010). Este é importante para o aumento do consumo de oxigênio, melhora na distribuição de nutrientes e remoção de metabólitos, e isto pode ser observado tanto em animais normotensos quanto hipertensos após um período de TF, além disso, nos animais hipertensos, este aumento do crescimento de vasos também contribui para a redução da PA (AMARAL et al, 2000 e AMARAL & MICHELINI, 2011).

O envolvimento do SRA no processo da angiogênese vem sendo estudado há pelo menos 2 décadas pelo nosso grupo e tem sido evidenciado que o bloqueio do SRA, seja farmacológico (captopril, lisinopril ou losartan), fisiológico ou genético, atenua/bloqueia o aumento de vasos na musculatura esquelética induzido por estimulação elétrica ou exercício de curta duração (3 dias) (AMARAL et al., 2001a; 2001b; 2001c; GREENE e AMARAL, 2002). Trabalhos que utilizam modelos com animais isquêmicos tratados com diferentes iECA, parecem mostrar resultados distintos sobre a angiogênese na musculatura esquelética. Fabre et al. (1999) demonstraram que o tratamento crônico com captopril não permitia o aumento da densidade de capilares na musculatura esquelética de coelhos submetidos à cirurgia de isquemia no membro inferior. Por outro lado, Silvestre et al. (2002) e You et al. (2008) verificaram que ratos submetidos à cirurgia de isquemia nos membros inferiores apresentaram um aumento da angiogênese após tratamento com o perindopril.

Tendo em vista que os iECA como perindopril e captopril são fármacos anti-hipertensivos, com resultados conflitantes na literatura sobre angiogênese na

microcirculação e, sabendo que o exercício físico é recomendável para paciente hipertensos no controle da PA, o principal objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do uso crônico do captopril e perindopril na angiogênese induzida pelo TF em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos, além de investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho a comparar os efeitos crônicos do captopril e perindopril na angiogênese na musculatura esquelética e cardíaca, bem como seus mecanismos, induzidos pelo TF, em animais normotensos e hipertensos.

Os resultados do nosso trabalho revelaram primeiramente que o TF aeróbio, por 8 semanas na esteira, foi eficaz em aumentar a razão C:F no TA dos ratos normotensos e preveniu a rarefação encontrada nos SHR. A razão C:F encontrada nos animais SHR sedentários era cerca de 32% menor comparada aos Wistar. Já havíamos demonstrado anteriormente que 13 semanas de treinamento aumentava a razão C:F no músculo grácil dos animais normotensos e hipertensos treinados (AMARAL et al., 2008), esta resposta que foi confirmada posteriormente por Fernandes et al. (2012), no músculo sóleo, após treinamento de natação. Possivelmente, os estímulos mecânico (shear stress) e metabólico (hipóxia), induzidos pelo exercício, foram os responsáveis por estimular o aumento da produção de VEGF e eNOS (AMARAL et al, 2001; 2008; FERNANDES et al, 2012), além de promover um melhor balanço entre os fatores pró e anti-apoptóticos nos ratos hipertensos (FERNANDES et al, 2012).

Um dos principais objetivos deste trabalho era investigar os efeitos do tratamento crônico com captopril e perindopril sobre a angiogênese induzida pelo TF na musculatura esquelética. O tratamento crônico com iECA atenuou o aumento da razão C:F nos animais normotensos treinados, no entanto, a redução do grupo treinado e tratado com captopril foi maior (-19%) quando comparada ao grupo treinado e tratados com perindopril, que de 13%. Já, nos animais SHR treinados e tratados com captopril, a atenuação foi 18%, no entanto o perindopril não atenuou a angiogênese induzida pelo TF nos animais SHR. Nossos achados são similares a trabalhos encontrados na literatura, ou seja, Amaral et al. (2001a, 2001b) demonstraram que o tratamento com captopril atenuou a angiogênese na musculatura esquelética induzida pelo exercício agudo de 3 dias ou estimulação elétrica por 7 dias. Por outro lado, Minami et al. (2007) e Guo et al. (2010) observaram que o tratamento crônico com perindopril não atenuava o aumento da densidade capilar na musculatura esquelética em ratos SHR ou ratas wistar idosas. Estes resultados distintos

podem ser devido às diferenças bioquímicas e farmacológicas entre os fármacos, apresentadas anteriormente. O captopril pertence ao grupo sulfidril e sua forma de administração é como droga ativa. Já, o perindopril pertence ao grupo do carboxil e sua forma de administração é como pró-droga. Os fármacos administrados como pró-droga apresentam maior tempo máximo de concentração plasmática e meia vida plasmática comparada aos fármacos administrado como droga ativa. Para o perindopril, por exemplo, o tempo máximo de concentração plasmática é de 3-7 horas e o tempo de meia vida plasmática é em torno de 24 horas; já para o captopril, o tempo de concentração plasmática é de 2 horas e a meia-vida plasmática fica em torno de 3-4 horas. Desta maneira o tempo de ação do perindopril em inibir atividade da ECA e na facilitação da bradicinina circulante pode ser maior comparado ao captopril. A bradicinina é um poderoso vasodilatador e também tem um papel importante na angiogênese na musculatura esquelética por meio do receptor B2 através da eNOS (EMANUELI et al., 2001). Assim é razoável presumir que os animais treinados e tratados com perindopril tiveram maior tempo de bradicinina circulante, que contribuiu para a maior razão C:F no músculo TA comparado aos animais treinados e tratados com captopril.

O presente trabalho investigou, no músculo TA, o possível envolvimento das proteínas VEGF, VEGFR-2 e eNOS no processo de angiogênese induzida pelo treinamento físico, nos animais normotensos e hipertensos. Nos animais normotensos, 8 semanas de TF não determinou aumento nos níveis do VEGF, apesar de ter sido eficaz em aumentar o número de vasos, No entanto a produção proteica do receptor de VEGF-2 estava aumentada, assim como a produção da eNOS. Já nos animais SHR o treinamento físico preveniu a rarefação no grupo treinado controle, por meio do bloqueio da redução do VEGF e eNOS. Durante o exercício físico fatores como a hipóxia, aumento do NO irão promover o aumento da produção do VEGF estimulando o processo da angiogênese. Achados anteriores do nosso grupo mostraram que o VEGF participa no processo da angiogênese na musculatura esquelética induzida pelo TF, Amaral et al. (2001 a e b) mostraram que o uso de um anticorpo anti-VEGF impedia a angiogênese induzida por estimulação elétrica ou exercício aeróbio de curta duração. Porém a literatura ainda é controversa sobre a participação do VEGF induzido pelo TF crônico. Amaral et al. (2008) mostraram que o VEGF parece ter um efeito bifásico, pois aumenta nos primeiros dias de treinamento (1-3) dias, mas após 3 meses ele retorna ao seus valores basais. Mais recentemente, Ranjbar, Ardakanizade, Nazen (2017) observaram que a expressão gênica

do VEGF no músculo sóleo e gastrocnêmio não se alterou em ratos infartados treinados por 10 semanas em esteira. Por outro lado, Fernandes et al. (2012) demonstraram a produção protéica do VEGF estava aumentada no músculo sóleo após 10 semanas de treinamento de natação, porém este resultado ocorreu após uma sessão de exercício agudo na esteira. Apesar do VEGF, nos animais normotensos, encontrar-se em níveis basais no grupo treinado controle, a produção do seu receptor VEGF-2 encontrava-se aumentada neste grupo, possivelmente a maior quantidade de receptores do VEGF garantiram uma maior contribuição do VEGF no estímulo da angiogênese nos animais normotensos treinados controle, contribuindo para o aumento da C:F. No grupo SHR treinado, que apresentou uma prevenção da rarefação, o VEGF contribuiu para esta resposta, pois o TF preveniu a redução do VEGF. Esta resposta pode ter ocorrido por estímulos induzidos pelo exercício como hipóxia e diminuição do miRNA 16 e miRNA 21 (FERNANDES et al., 2012).

A eNOS tem papel fundamental na angiogênese na musculatura esquelética. Alguns achados na literatura Hudlicka et al. (1999) e Milkiewicz et al. (2005) observaram que ratos submetidos a estimulação elétrica de 2 a 7 dias que receberam o inibidor da eNOS (L-NNA) apresentaram uma inibição do crescimento vascular comparado ao controle. No presente trabalho, a produção da eNOS aumentou nos animais normotensos e hipertensos treinados e estes resultados foram similares a alguns estudos realizados com humanos e animais que demonstraram que o TF promoveu o aumento da produção da eNOS na musculatura esquelética (HOIER et al., 2011, FERNANDES et al., 2012). Provavelmente este aumento da eNOS ocorra pelo aumento o aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício físico, que determina aumentos na tensão de cisalhamento, e estimula a produção da eNOS. Além disso, nos animais SHR, o TF atenuou a rarefação, associada à prevenção da queda da eNOS. Esta resposta pode ter ocorrido devido a fatores induzidos pelo TF como a tensão de cisalhamento e diminuição da expressão do miRNA16 e miRNA21 (FERNANDES et al., 2012).

O tratamento crônico com captopril bloqueou o aumento da produção do VEGF-2 nos animais normotensos e este resultado está de acordo com achados anteriores, pois Gavin et al. (2000) demonstraram diminuição da expressão gênica do receptor de VEGF nos animais que realizaram exercício agudo e receberam captopril. O aumento da produção da eNOS induzida pelo TF foi atenuado pelo tratamento crônico com o captopril em (-13%) nos animais normotensos treinados e tratados e (-26%) nos animais SHR treinados e

tratados. O tratamento com perindopril promoveu respostas similares ao captopril, pois bloqueou o aumento do VEGFR-2 nos animais normotensos treinados e tratados, além de não atenuar o aumento do VEGF nos animais SHR treinados e tratados. Porém o tratamento crônico com o perindopril não atenuou o aumento da produção da eNOS induzida pelo TF nos animais normotensos e hipertensos. Esta diferença dos resultados da produção da eNOS entre os animais treinados e tratados com captopril e perindopril, parece ser mediada pela bradicinina circulante, uma vez que a bradicinina liga-se com seu receptor B2, presente na musculatura esquelética, e promove aumento da produção da eNOS.

A partir destes resultados, pode-se sugerir que, uma vez que os níveis da produção proteica do VEGF e VEGFR-2 foram semelhantes nos animais Wistar e SHR treinados e tratados com captopril ou perindopril, a menor angiogênese observada nos animais normotensos e hipertensos treinados tratados com captopril, em comparação aos tratados com perindopril, parece ser devido a um menor aumento da produção proteica de eNOS, naqueles grupos tratados com perindopril.

Tem sido demonstrado que, além do músculo esquelético, o músculo cardíaco também apresenta rarefação em ratos hipertensos. Amaral, Zorn e Michellini, (2000) mostraram que a densidade capilar no miocárdio de ratos hipertensos era menor, comparada aos ratos normotensos. Concordando com estes resultados, o presente trabalho demonstrou que a razão C:F no miocárdio dos ratos hipertensos sedentários foi menor em relação aos normotensos e esta resposta pode estar associada a proteínas e a desbalanço de fatores pró e anti-apoptóticos no miocárdio de ratos hipertensos (GARCIARENA et al., 2009).

Da mesma forma que no músculo TA, o treinamento físico promoveu o aumento da razão C:F no miocárdio dos ratos normotensos e preveniu a rarefação nos hipertensos, confirmando os resultados observados anteriormente pelo nosso grupo (AMARAL, ZORN E MICHELLINI, 2000). Esta resposta de aumento do número de vasos induzidos pelo TF pode ter sido uma resposta adaptativa pelo aumento da captação de oxigênio na musculatura ativa durante o exercício, juntamente com o aumento do fluxo sanguíneo, devido a fatores locais como a eNOS. Além disso, o exercício físico parece interferir diretamente no desbalanço de fatores pró e anti-apoptóticos do miocárdio contribuindo para o aumento da densidade capilar (GARCIARENA et al., 2009).

O tratamento com captopril ou perindopril não promoveu mudanças na C:F nos grupos sedentários tratados, tanto nos normotensos quanto hipertensos, o que vai de acordo

com estudos anteriores que mostraram que o tratamento com iECA parece não afetar a densidade capilar no miocárdio (CANDY et al., 1989; RAKUSAN et al., 2000).

Por outro lado, o presente estudo é o pioneiro em comparar os efeitos destes dois iECA sobre a angiogênese no miocárdio induzida pelo treinamento físico em animais normotensos e hipertensos. O TF restaurou os níveis de VEGF e eNOS no miocárdio, o que contribuiu para a prevenção da rarefação. Alguns estudos na literatura têm demonstrado que as proteínas VEGF e eNOS exercem importante papel controle da angiogênese no miocárdio. O estudo de Olfert et al. (2009) mostrou que camundongos *knockout* para o gene do VEGF apresentavam menor densidade capilar no miocárdio. Da mesma forma, Tang et al. (2011) mostraram que após 6 semanas de treinamento em esteira, a densidade capilar no miocárdio nos ratos infartados estava associada a maiores produções de VEGF. Já Waard et al. (2010) mostraram que camundongos infartados e com gene da eNOS deletado, apresentaram uma menor densidade capilar após treinamento, quando comparado ao camundongos controle, desta maneira sugerindo um importante papel do NO neste processo angiogênico. São escassos na literatura trabalhos comparando a produção do VEGF entre animais normotensos e hipertensos. Neste sentido, o estudo de Vilar et al. (2005) observou que os níveis de VEGF no ventrículo dos ratos hipertensos eram menores, mas não significativos comparados aos ratos normotensos. Porém o TF bloqueou esta redução nos ratos hipertensos, concordando com nossos achados. Tang et al. (2010) observaram que o treinamento físico aumentou produção do VEGF no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos infartados.

Diferentemente da musculatura esquelética, o tratamento crônico com captopril ou perindopril não influenciou a angiogênese induzida pelo treinamento físico no miocárdio, sendo esta resposta muito importante, uma vez que este órgão tem vital importância.

6. Conclusão

Os principais achados deste estudo foram que o TF regular aeróbio aumentou significativamente a razão capilar/fibra nos músculos esquelético e cardíaco e preveniu a rarefação no SHR e que o uso crônico do captopril atenuou esta resposta somente na musculatura esquelética. Por outro lado, o perindopril não influenciou a angiogênese induzida pelo TF. Uma vez que a produção de VEGF e VEGFR-2 foi semelhante antes e após TF, associados aos fármacos, a eNOS parece ter papel importante nos efeitos distintos entre estes fármacos. Assim, apesar de não haver diferenças na redução da PA nos SHR tratados com captopril ou perindopril, os resultados do presente estudo sugerem que o perindopril possa ser o melhor fármaco de escolha para pacientes hipertensos que praticam exercício físico, uma vez que não atenua a angiogênese na musculatura esquelética induzida pelo TF.

7. Referências

- AIRES M. M. Fisiologia , 4 ed . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- AMARAL, S.L.; ZORN, T.M.; MICHELINI, L.C. Exercise training normalizes wall-to-lumen of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v. 18 (11), p. 1563-72, 2000.
- AMARAL, S.L.; PAPANEK, P.E.; GREENE, A.S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-time exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 281, p. H1163-H1169, 2001(a).
- AMARAL, S.L.; LINDERMAN, J.R.; MORSE, M.M.; GREENE, A.S. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation*, v.(8), p.57-67, 2001(b).
- AMARAL, S.L.; ROMAM, R.J.; GREENE, A. Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular growth factor expression in Dahl S rats. *Hypertension*, v.37, p.386-90, 2001 (c).
- AMARAL, S.L.; SILVEIRA, N.P.; ZORN, T.; MICHELINI, L.C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v.19, p.9031-940, 2001 (d)
- AMARAL, S.L.; SANCHES, L.S.; CHANG, A.J.B.A.; ROSSINI, L.V.; MICHELINI, L.C. Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res*, v.41(5), p.424-431, 2008.
- AMARAL, S.L.; MICHELINI, L.C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. *Braz J Med Biol Res*,v.44(9), p.814-826, 2011.
- ARIMA, H.; ANDERSON, D.; OMAE, T.; WOODWARD, M.; HATA, J.; YOSHITAK, M. Effects of Blood Pressure Lowering on Major Vascular Events Among Patients With Isolated Diastolic Hypertension: The Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study (PROGRESS) Trial. *Stroke*, v.42,p.2339-2341, 2011.
- BAREL, M.; PEREZ, O.A., GIOZZET, V.A.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R.; AMARAL, S.L. Exercise training prevents hypersulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. *Eur J Appl Physiol*, v.108(5), p. 999-1007, 2010.
- BALTATU, O.C; CAMPOS, L.A.; BADER, M. Local renin-angiotensin system and the brain – a continuous quest for knowledge. *Peptides*, v. 32, n. 5, p. 1083-1086, 2011.
- BELLAMY, L.M.; ADAM, P.W.; LISIO, M.; PARISE, G. Skeletal muscle-endothelial cell cross talk through angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.299, p. c-1402-1409, 2010.
- BOLTERMAN, R.J., MANRIQUES, M.C.; RUIZ, M.C.O.; JUNCOS, L.A.; ROMERO, J.C. Effects of captopril on the renin angiotensin system oxidative stress, and endothelium in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, v. 46(4), p. 943-947, 2005. BROWN, N.J.; VAUGHAN, D.E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, v.97, p.1411-1420, 1989.

- BRUGTS, J.J.; VAN VARK, L.; AKKERHUIS, M.; BERTAND, M.; FOX, K. Impact of renin-angiotensin system inhibitors on mortality and major cardiovascular endpoints in hypertension: A number-needed-to-treat analysis. *Int J Cardiol*, v.181, p.425-429, 2015.
- CANBY, C.A.; PALMER, P.J.; WALL, K.R.; TOMANEK, R.J. Effects of catopril on left ventricular structure and function SHR with established hypertension. *Basic Res Cardio*, v. 84(3), p.306-18, 1998.
- CECONI, C.; FRANCOLINI, G.; OLIVARES, A.; COMINI, L.; BACHETTI, T.; FERRARI, R. Angiotensin. Enzyme (ACE) inhibitors have different selectivity of bradykinin binding sites of human somatic ACE. *Eur J of Pharmacol*, v.577, p.1-6, 2007.
- CHEN, H.I. Hemodynamic mechanism of ventricular Hypertrophy in hypertension. *J Chin of Physiol*, v. 55 (6), p.369-379, 2012.
- DUPREZ, D.; FERDINAND, K.; PURKAYASTHA, D.; REIGCH, S.; WRIGHT, R. Ambulatory blood pressure response to triple therapy with an angiotensin-receptor blocker (ARB), calcium-channel blocker (CCB) and HCTZ versus dual therapy with an ARB and HCTZ. *Vasc Health Risk Manag*, v.7, p.701-8, 2011.
- EMANUELI, C.; MINASI, A.; CHAO, J.; CHAO, L.; SALI, M.B et al. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*, v. 103, p. 125-132, 2001.
- FERRARA, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*, v.20 (4), p. 156-63, 2009.
- FERRARI, R.; PASANI, G.; NOTARSTEFANO, P.; CAMPO, G.; GARDINI, E.; CECONI, C. Specific properties and effect of Perindopril in controlling the Renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*, v.18, p.142S-154S, 2005.
- FERNANDES, T.; MAGALHAES, F.C.; ROQUE, F.R.; PHILLIPS, M.I.; OLIVEIRA, E.D. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing Angiogenic and Apoptotic factors: role of MicroRNAs-16,21 and-126 exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing. *Hypertension*, v. 59, p. 513-520, 2012.
- FURBERG, C.D. Class effects and evidence-based medicine. *Clin Cardiol*, v.23 (suppl.IV), p IV15-IV19, 2000.
- GARCIARENA, C.D.; PINILLA, O.A.; NOLLY, B.M.; LANGUES, R.P.; ESCUDERO, E.M.E.T. et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rats conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, v.53, p.708-714.
- GAVIN, T.P.; SPECOTOR, D.A.; WAGNER, H.; BREEN, E.C.; WAGNER, P.D. Effect of captopril on skeletal muscle angiogenic growth factor responses to exercise. *J Appl Physiol*, v.88, p. 1690-1697, 2000.
- GAVIN, T.P.; DREW, J.L.; KUBIK, J.; POFAHL, W.; HICKNER, C.R. Acute resistance exercise increased skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiol (Oxf)*, v.191, p.139-146, 2007.
- GLIEMANN, L.; BUSS, R.; NYBERG, M.; HOPPELER, H.; ODRIOZOLA, A.; THANING, P.; HELLSTEN, Y. et al. Capillary growth, ultrastructure remodeling and

exercise training in skeletal muscle of essential hypertensive patients. *Acta Physiol (Oxf)*, v.214(2), p.210-220, 2015.

GOUZI, F.; MAURY, J.; BUGHIN, F.; BLAQUIERE, M.; AYOUB, B.; MERCIER, J. Impaired training-induced adaptation of blood pressure in COPD patients: implication of the muscle capillary bed. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, v.11, p.2349-2357, 2016.

GREENE A.S.; TONELLATO, P.J.; LUI, J.; LOMBARD, J.H.; COWLEY, A.W. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol*, v. 256, p. H126-131, 1989.

GREENE, A.S.; AMARAL, S.L. Microvascular angiogenesis and the renin angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*, v.4, p. 56-62, 2002.

GUO, Q.; MINAMI, N.; MORI, N.; NAGASAKA, M.; ITO, O.; KUROSAWA, H.; KANAZAWA, M. Effects of estradiol, angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle in old female rats. *Clin Exp Hypertens*, v. 32(2), p. 76-83, 2010.

GUSTAFSSON, T.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; JANSON, E.; SUNDBERG, J. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol*, v.206, p. H679-H685, 1999.

HANSEN, A.H.; NIELSEN, J.; SALTIN, B.; HELLSTEN, Y. Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, v.28, p.1176-1185, 2010.

HURBER-ABEL, F.A.; GERBER, M.; HOPELER, H.; BAUM, O. Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, v.112 (1), p.1555-62, 2012.

HERRERA, N.A.; JESUS, I.; SHINOHARA, A.L.; DIONÍSIO, T.J.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. *J Hypertens*, v.34(10), p.1967-76, 2016.

HEARGETY, A.M. AALKJAER, C.; BUND, S.J.; KORSGAARD, N.; MULVANY, M.J. Small artery structure in hypertension. Dual process of remodeling and growth. *Hypertension*, v. 21, p.391-397, 1993

HUDLICKA, O., BROW, M., SILGRAM, G.; SILVER, O. Inhibition of Capillary growth in chronically stimulated rat muscle by nitro-L-Arginine, Nitric Oxide Synthase inhibitor. *Microvasc Res*, v.59, 45-51, 2000

HUDLIKA, O. BROWN, M.D. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res*, v 46 (5): 504-512, 2009.

YZAWA, H.; MIYACHI, M.; FURUKAMA, M.; TAKAHASHI, K.; TAKATSU, M.; TSUBOI, K. Angiotensin-converting enzyme inhibition promotes coronary angiogenesis in the failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *J Card Fail*, v.17 (12), p.1041-50, 2011.

- JI, X.; TAN, B.K.; ZHU, Y.C.; LINZ, W.; ZHU, Y.Z. Comparison of cardioprotective effects using ramipril and Dan Shen for the treatment of acute myocardial infarction in rats. *Life Sci*, v. 73(11), p.1413-26, 2003
- KOKKINOS, P. Physical activity, healths benefits, and mortality risk. *ISRN Cardiol*, 2012
- KURU, O.; SENTURK, U.K.; BLAST, E.G.; JHANT, D.C. Effect of exercise on blood pressure in rats with cronic NOS inibithion. *Eur J Appl Physiol*, v.87, p. 14104-9, 2005
- LAUGHLIN, M.H.; ROSEGUINI, B. Mechanism for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *J Physiol Pharmacol*, v. 59 (supl 7), p. 71-78, 2008
- LATERZA, M.C.; RONDON, M.U.B.; NEGRÃO, C.E. Efeito anti-hipertensivo do exercício. *Rev Bras Hyperten*, v.14(2),104-111, 2007.
- LEE, K.R.; REID, J.L.; SCOOT, M.G., HOSIE, J.; HERPIN, D.; SANTONI, J.P. Captopril versus perindopril: a double blind study in exencial hypertension. *J Hum Hypertens*,v.3 (1), p. 17-22, 1989.
- LEVY, B.L. AMBROSIO, G.; PRIES, A.R.; STRUJKER-BROUDIER, H.A.J. Microcirculationa in hypertension. A new target for treatment? *Circulation*, v. 104, p. 735-740, 2001.
- LINARELLI, M.I.; MASSAROTO, M.C.; JOAQUIM, A.P.; GUIMARÃES, L.;SANTIAGO, M.C.; LAGE, R.Análise do uso racional de medicamentos anti-hipertensivos utilizados em hospital-escola *Rev Ciênc Méd*, v.18(4), p.193-200, 2009.
- MANCIA, G.; FAGARD, R.; NARKIEWICH, K.; REDON, J.; ZANCHETTI, A.; BOHM, M. ESH/ESC Guidelines for the management or arterial hypertension. *Blood Press*, 2013.MACFADYEN, M.A; LEE, K.R.; REID, J.L. Perindopril. A review of its pharmacokintes and clinical pharmacology. *Drugs*, v.39, p.49-63, 1990.
- MINAMI, N.; LI, Y., GUO, Q.; KAWAMURA,T.; MORI, N.; NAGASAKA, M.; OGAWA, M. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle *J Hypertens*, v. 25 (6), 1241-1246, 2007.
- MILKEWISZCZ, M.; HUDLICKA, O.; BROW, M.; SILGRAN, T. Nitric Oxide, VEGF, and VEGF-2: interactions in activity-induced in angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,v.289, p. H336-346, 2005.
- MORIMOTO, S.; MAKI, K.; AOTA, Y.; SAKUMA, T. WASAKA, T. Beneficial effects of combination therapy with angiotensin II receprtor blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular endothelial function. *Hypertens Res*, v. 31 (8), p.1603-10, 2008.
- MUNTER, P.; ROCELLA, H.E.J.; WELTON, P.K. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the us population. *Hypertension*, v.30, p.897-902, 2002.
- MULVANY, M.J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*, v.17, p. 105-109, 2002.
- OLFERT, I.M.; BREEN, E.C.; MATHIEU-COSTELO, O.; WAGENR, P.D. Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, v.91(3), 1176-84, 2001

OFERT, I.M.; HOWLWTT, R.A.; WAGNER, P.D.; BREEN, E.D. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.299(4), p. R1059-67, 2010.

OVERTON, J.M.; VAN NESS, J.M.; TAKATA, J.H. Effects of chronic exercise on blood pressure in Dahl-salt-sensitive rats. *Am J Hypertens*, v.11,p.73-80, 1998.

PETERSEN, M.C.; GREENE, A.S. Angiotensin II is a critical mediator of prazosin-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Microcirculation*, v.14 (6), p.583-91, 2007.

PICON, R.V.; FUCHS, F.D.; MOREIRA, L.B.; RIEGEL, G.; FUCHS, S.C. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-Analysis. *Plos One*, v.7, p. 1-10, 2012

PILOTE, L.; ABRAHAMOVICZ, M.; EISENBERG, M. HUMPHRIES, K.; BEHOULI, H.; TU, J.V. Effect of different angiotensin-converting-enzyme inhibitors on mortality among elderly patients with congestive heart failure. *CMAJ*, v.178(10), p.1303-1311, 2008

PROGRESS. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet*, v.358, p.1033-41, 2001.

QUEIROZ, A.C.; SOUSA, C.J.; SILVA, N.D.J.; TOBALDINI, E.; ORTEGA, K.C et al. Captopril does not potentiate postexercise hypotension: a randomized crossover study. *Int J Sports Med*, v.38 (4), p. 270-77, 2017.

RAKUSAN, K.; CICUTTI, N.; MAURIN, A.; GUEZ, D.; SCHIAVI, P. The effect of treatment with low dose ACE inhibitor and/or diuretic on coronary microvasculature in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* .v.59 (2), p. 225-24, 2000.

RANJBAR, K.; ARDAKANIZADE, M.; NAZEM, F. Endurance training induces fiber type-specific revascularization in hindlimb skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Iran J Basic Med Sci*, v.20(1), p.90-98, 2017.

REBELO, R.M.C.; SCHRECKENBERG, R.; SHLUTER, K.D. Adverse cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity. *J Physiol*, v. 590 (210), p. 5389-400, 2012

RICHER, C.; DOUSSAU, M.P.; GIUDICELLI, J.F. Differential systemic and regional hemodynamic profiles of four angiotensin-I converting-enzyme inhibitors in the rat. *Cardiovasc Drugs Ther*, v.3(6), p.865-872, 1989.

RODRIGO, E.; MAESOS, R.; MUNOS-GARCIA, R.; NAVARRO, J.; CACHOFEIRO, V. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens*, v.15(6), p.613-8, 1997.

SABINO, B.; LESSA, M.A.; NASCIMENTO, A.R.; RODRIGUES, C.A.; HENRIQUES, M.D.; GARZONI, L.R.; LEVY, B.L. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. v.51 (4), p.402-9, 2008.

SCHROETER, G., FAGGIANNI, F., GOULART, F., CARLI, G. A., MARRONE, F. Terapia anti-hipertensiva utilizada por pacientes idosos de Porto Alegre/RS, Brasil. *Scie Medica*, v.17 (1), p.14-19, 2007.

- SILVESTRE, J.S.; KAMSU-KOM, N.; CLERQUE, M.; DURIEZ, M. LEVY, B.L. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 303 (3), p.1038-43, 2002.
- TOKITA, Y.; ODA, H.; FRANCO-SAENS, R.; MURLOW, P.J. Role of the tissue renin-angiotensin system in the action of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.208(4), p.391-396, 1995.
- VAN VARK, L.C.; BERTAND, M.; AKKERHUIS, H.; BRUGTS, J.J. FOX, K.; MOURAD, J.J. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158.998 patients. *Eur Heart J*, v.33, p. 2088-2097, 2012.
- VALDES, G.; ERICES, R.; CHACON, C.; CORHTORNS, J. Angiogenic, hypermeability and vasodilator network in útero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol*, v.6, p.13, 2008.
- VERONEZ, L.L.; SIMÕES, M.S.J. Análise da prescrição de medicamentos de pacientes hipertensos atendidos pelos SUS da rede municipal de saúde de Rincão-SP. *Rev Ciênc Farm Básicas Apl*, v.29 (1) 45-51, 2008.
- YOU, D.; COCHAIN, C.; LOINARD, C.; VILAR, J.; MEES, B.; LEVY, B.L.; SILVESTRE, J.S. Combination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v.325 (3), p.766-73, 2008.
- WAGNER, P.D.; MASANÉS, F.; HARRIETH, W.; SALA, E.; MITRO, O; CAMPISTOL, M. Muscle angiogenic growth factor gene responses to exercise in chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 281, p. R539-R546, 2001.
- WALLACE, J.P. Exercise in hypertension. A clinica review. *Sports Med*, v.33(8), p.585-98, 2003.
- ZANCHETTI, A.; DESCHE, P. Perindopril: first-line treatment for hypertension. *Clin Exp Hypertens A*, suppl.2, p.555-573, 1989.
- ZHUO, J.L.; MENDELSON, F.A.; OHISHI, M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT (1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*, v.39, p.634-638, 2002.
- ZOJA, C.; CATTANEO, S.; FIORDALISO, F.; LIONETTI, V.; ZAMBELLI, V.; SALIO, M. Distinct cardiac and renal effects of ETA receptor antagonist and ACE inhibitor in experimental type 2 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, v.301 (5). P. 1114-23, 2011.

