

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação (PPGCR)

PIETRA PETRICA NEVES

**O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA E TREINAMENTO
FÍSICO NO MANEJO DA HIPERTENSÃO E DA LESÃO RENAL EM RATAS
MENOPAUSADAS**

São Paulo

2022

PIETRA PETRICA NEVES

**O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA E TREINAMENTO
FÍSICO NO MANEJO DA HIPERTENSÃO E DA LESÃO RENAL EM RATAS
MENOPAUSADAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho – UNINOVE para obtenção
do título de Mestre em Ciências da
Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis

São Paulo

2022

Neves, Pietra Petrica.

O papel da associação de hidroclorotiazida e treinamento físico no manejo da hipertensão e da lesão renal em ratas menopausadas. /

Pietra Petrica Neves. 2022.

62 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho -
UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Kátia de Angelis.

1. Treinamento físico. 2. Tratamento farmacológico. 3.
Hipertensão. 4. Menopausa. 5. Rim.

I. Angelis, Kátia de. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 14 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

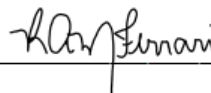
Aluno(a): PIETRA PETRICA NEVES

Título da Dissertação: "O Papel da Associação de Hidroclorotiazida e o Treinamento Físico no Manejo da Hipertensão e da Lesão Renal em Ratas Menopausadas"

Presidente: PROFA. DRA. KÁTIA DE ANGELIS LOBO D'AVILA



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. NATHALIA BERNARDES



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente a Deus por permitir mais esta importante etapa na minha vida, a minha família Célia, Giovanna, Sidnei, Nicole, Henry, Tio Antônio, Vô João e Vó Tereza.

À minha orientadora Dra. Kátia De Angelis, pela dedicação, orientação e generosidade que possibilitaram a elaboração deste trabalho.

Agradecimentos

Meus agradecimentos especialmente à minha orientadora Dra. Kátia de Angelis pelo incentivo, paciência e aconselhamento que contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico. Seu acolhimento e generosidade mostrou-se fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Nove de Julho – UNINOVE, agradeço pela infraestrutura e pela oportunidade oferecida e a bolsa de estudos.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos.

À minha família minha mãe Célia Cristina Petrica e ao meu padrasto Sidnei Alves de Araújo, pelo acolhimento e referência de estudo e trabalho.

A minha irmã gêmea Giovanna Petrica que me auxiliou e sempre estendeu a mão, por compartilhar a sua generosidade e amor em todos os momentos.

Aos meus irmãos Nicole Petrica Araújo e Henry Petrica Araújo, meus avôs Tereza de Jesus Petrica e João Batista Petrica, meu tio Antônio Petrica que me auxiliaram na estruturação psicológica deste estudo.

A todos do laboratório de fisiologia translacional, Maycon, Tânia, Danielle, Victor, Antônio, Marina, Amanda, Gabriel, Glaucivan e Douglas agradeço imensamente pelo acolhimento e sem a ajuda de todos nunca teria conseguido e serei eternamente grata.

Aos animais que possibilitaram este estudo e aos quais procurei dedicar toda prudência e devido respeito.

E, finalmente, aos membros da banca pelas suas valorosas contribuições.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código
de Financiamento 001, Processo no 88887.618093/2021-00**

RESUMO

As doenças cardiovasculares são atualmente as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. A variabilidade da pressão arterial (VPA) tem sido associada à lesão de órgãos-alvo, como os rins. A farmacoterapia associada ao treinamento físico é clinicamente recomendada para o controle da pressão arterial (PA) no manejo da HAS. **Objetivo:** Investigar os efeitos do treinamento físico combinado (TFC) associado ao tratamento com hidroclorotiazida (HCT) sobre a VPA e em parâmetros morfofuncionais, inflamatórios e de estresse oxidativo renais. **Método:** Foram utilizadas 32 ratas espontaneamente hipertensas (SHR), distribuídas em 4 grupos (n=8/grupo): ooforectomizadas sedentárias (OS), ooforectomizadas sedentárias tratadas com hidroclorotiazida (OSH), ooforectomizadas treinadas (OT) e ooforectomizadas treinadas tratadas com hidroclorotiazida (OTH). A ooforectomia foi realizada no início do estudo. Após adaptação à esteira e escada de treinamento físico, o grupo OS prosseguiu com tratamento placebo durante 8 semanas, enquanto os demais grupos com tratamento com HCT (30mg/kg na água de beber) e/ou TFC (3 dias/semana, 40-60% da capacidade máxima obtida em testes de esforço em esteira e escada). Após 8 semanas realizamos o registro da PA para análise da VPA, mediadores inflamatórios e estresse oxidativo em tecido renal. **Resultados:** Os grupos OSH, OT e OTH apresentaram menor pressão sistólica (OSH:189±13; OT:179±5; OTH:174±15 mmHg) quando comparado ao grupo OS (208±15 mmHg). Houve melhora de capacidade física nos grupos OT e OTH. A associação de terapias promoveu redução da variância da PAS. Não houve diferença entre os grupos para ureia plasmática e proteinúria, mas os grupos tratados com HCT apresentaram menores níveis de creatinina plasmática, aumento do *clearance* de creatinina e menor número de glomérulos em relação ao grupo OS. Os resultados demonstraram que o grupo OS apresentou redução nos campos com área de fibrose túbulo intersticial de 0 - 25% e aumento de campos de 51 - 100% quando comparado aos demais grupos estudados. Por outro lado, o grupo OTH apresentou aumento de campos com alterações de 0 - 25% e redução número de campos nas faixas de 26 - 50% quando comparado a todos os demais grupos estudados, além de redução dos campos de 51-100% vs. o grupo OS. O grupo OTH apresentou aumento na razão IL10/TNF-alfa renal quando comparado com os outros grupos. Houve redução de proteínas oxidadas nos grupos treinados e aumento da atividade da catalase no grupo OTH (vs. OS). **Conclusão:** Os resultados demonstraram que a combinação de hidroclorotiazida e TFC é mais eficaz do que o fármaco isolado em promover melhora da VPA, impactando em melhora de perfil inflamatório e redox em tecido renal, promovendo benefícios morfofuncionais renais adicionais o aumento do *clearance* de creatinina e redução da fibrose túbulo intersticial em ratas hipertensas ooforectomizadas.

Palavras-chave: Treinamento físico; Hidroclorotiazida; Hipertensão; Menopausa; Rim.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are currently the main causes of mortality and morbidity worldwide. Blood pressure variability (BPV) has been associated with target organ damage, such as the kidneys. Pharmacotherapy associated with physical training is clinically recommended for blood pressure (BP) control in the management of SAH. **Objective:** To investigate the effects of combined physical training (CPT) associated with treatment with hydrochlorothiazide (HCT) on BPV and on renal morphofunctional, inflammatory and oxidative stress parameters. **Method:** 32 spontaneously hypertensive rats (SHR) were used, divided into 4 groups (n=8/group): sedentary oophorectomized (OS), sedentary oophorectomized treated with hydrochlorothiazide (OSH), trained oophorectomized (OT) and trained oophorectomized treated with hydrochlorothiazide (OTH). Oophorectomy was performed at baseline. After adapting to the treadmill and physical training ladder, the OS group continued with placebo treatment for 8 weeks, while the other groups received treatment with HCT (30mg/kg in drinking water) and/or combined physical training (CPT) (3 days /week, 40-60% of the maximum capacity obtained in treadmill and stair treadmill tests). After 8 weeks, we recorded the BP to analyze the BPV, inflammatory mediators and oxidative stress in renal tissue. **Results:** The OSH, OT and OTH groups had lower systolic pressure (SOH:189±13; TO:179±5; TOH:174±15 mmHg) when compared to the OS group (208±15 mmHg). There was an improvement in physical capacity in OT and OTH groups. The combination of therapies promoted a reduction in SBP variance. There was no difference between groups for plasma urea and proteinuria, but groups treated with HCT had lower levels of plasma creatinine, increased creatinine *clearance* and reduced glomeruli than the OS group. The results showed that the OS group showed a reduction in fields with an area of tubulointerstitial fibrosis of 0 - 25% and an increase in fields of 51 - 100% when compared to the other studied groups. On the other hand, the OTH group showed an increase in fields with alterations of 0 - 25% and a reduction in the number of fields in the ranges of 26 - 50% when compared to all other studied groups, in addition to a reduction in fields of 51-100% vs. the OS group. The OTH group showed an increase in the renal IL10/TNF-alpha ratio when compared to the other groups. There was a reduction in oxidized proteins in the trained groups and an increase in catalase activity in the OTH group (vs. OS). **Conclusion:** The results showed that the combination of hydrochlorothiazide and CPT is more effective than the drug alone in promoting BPV improvement, impacting on the improvement of the inflammatory and redox profile in renal tissue, promoting additional renal morphofunctional benefits increased creatinine *clearance* and of reduction on tubulointerstitial fibrosis in oophorectomized hypertensive rats.

Keywords: Physical training; Hydrochlorothiazide; Hypertension; Menopause; Kidney.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodologia experimental	25
Figura 2. Tempo máximo teste (min) nos grupos estudados	34
Figura 3. Carga Máxima/peso corporal (g/g) nos grupos estudados	34
Figura 4. Pressão Arterial Sistólica (PAS) nos grupos estudados	35
Figura 5. Variância PAS (mmHg ²) nos grupos estudados	36
Figura 6. Modulação simpática vascular (BF PAS) nos grupos estudados	36
Figura 7. Creatinina plasmática (mg/dL) nos grupos estudados	37
Figura 8. <i>Clearance</i> de creatinina nos grupos estudados	38
Figura 9. Quantificação de glomérulos (mm ²) nos grupos estudados	39
Figura 10. Fibrose túbulo intersticial nos grupos estudados	40
Figura 11. Cortes histológicos representativos de fibrose túbulo intersticial nos grupos estudados corados com tricômio de Masson com aumento de lente objetiva de 20x	40
Figura 12. TNF-alfa em tecido renal nos grupos estudados	41
Figura 13. IL10/TNF-alfa em tecido renal nos grupos estudados	42
Figura 14. Proteínas oxidadas (Carbonilas) em tecido renal nos grupos estudados	43
Figura 15. Atividade da enzima catalase em tecido renal nos grupos estudados	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal nos grupos estudados	33
Tabela 2. Testes de esforço máximo em esteira e teste de carga máxima em escada nos grupos estudados	33
Tabela 3. Variabilidade da pressão arterial (VPA) nos grupos estudados	35
Tabela 4. Função renal nos grupos estudados	37
Tabela 5. Quantificação de glomérulos nos grupos estudados	38
Tabela 6. Mediadores inflamatórios em tecido renal nos grupos estudados....	41
Tabela 7. Estresse oxidativo em tecido renal nos grupos estudados	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AHA	<i>American Heart Association</i>
BCC	Bloqueador dos canais de cálcio
BRA	Bloqueador dos receptores da angiotensina
DCV	Doenças cardiovasculares
DRC	Doenças renal crônica
DT	Diurético tiazídico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCT	Hidroclorotiazida
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
MMP	Matriz metaloproteinases
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
SHR	Ratas espontaneamente hipertensas
SRAA	Sistema renina-angiotensina aldosterona
TF	Treinamento físico
TFA	Treinamento físico aeróbio
TFC	Treinamento físico combinado
TFR	Treinamento físico resistido
VPA	Variabilidade da pressão arterial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Hipertensão e lesão renal: epidemiologia e fisiopatologia	15
1.2 Disfunção renal na hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	17
1.3 Mecanismo de lesão cardiorrenal	18
1.4 Terapia medicamentosa.....	20
1.5 Treinamento físico no manejo da hipertensão.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Ooforectomia	26
3.2 Avaliação da capacidade física	26
3.3 Tratamento farmacológico	26
3.4 Treinamento físico combinado	27
3.5 Avaliação da função renal	27
3.6 Canulação.....	28
3.7 Medida da pressão arterial.....	28
3.8 Variabilidade da PAS	28
3.9 Eutanásia dos animais	29
3.10 Preparação de tecido renal	29
3.11 Mediadores inflamatórios	29
3.12 Estresse oxidativo	30
NADPH oxidase.....	30
Dosagem de peróxido de hidrogênio	30
Catalase (CAT).....	30
Superóxido dismutase (SOD)	31
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	31
Dosagem de proteínas oxidadas	31
3.13 Morfometria e morfologia renal	31
3.14 Análise estatística	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Peso corporal e capacidade funcional.....	33
4.2 Avaliações hemodinâmicas e autonômicas.....	35

4.3 Função renal.....	37
4.4 Avaliações de morfologia e morfometria renal	38
4.4.1 Avaliações glomerulares.....	38
4.4.2 Fibrose túbulo intersticial	39
4.5 Mediadores inflamatórios em tecido renal	41
4.6 Estresse oxidativo renal	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	49
7. Referências bibliográficas	50
Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	60
Anexo 2 – Emenda 1 aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa	61
Anexo 3 – Emenda 2 aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão e lesão renal: epidemiologia e fisiopatologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é atualmente uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo levando ao desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares e lesões em órgãos-alvo, como o rim ^(1,2). Atualmente, a HAS afeta de 10% a 20% da população adulta, sendo considerada causa da mortalidade de 5,8% da população mundial ⁽²⁾. No Brasil, a HAS se mantém como a primeira causa de doenças renais crônicas (DRC) ⁽³⁾, que é um problema de saúde com alto crescimento e com alto custo para os sistemas de saúde, constituindo um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças coronarianas, conforme divulgado em relatório da *American Heart Association* – AHA ⁽²⁾.

Apesar da alta prevalência da HAS, DRC e doença renal terminal na população mundial, identificar DRC como consequência da HAS é uma tarefa complexa em virtude da ausência de critérios específicos para definir o diagnóstico de hipertensão e nefropatia. A HAS entre pacientes com DRC é crescente, no entanto é observada uma baixa conscientização dessa população levando à falta de controle dos níveis de pressão arterial (PA) que, quando elevados em pacientes com DRC, estão diretamente ligados à progressão dessa doença. Assim, o paciente deve reconhecer a importância de manter o controle do nível da PA e monitorar os maus hábitos alimentares como o uso excessivo de sal ⁽³⁾.

Além disto, de acordo com a literatura pessoas do sexo feminino são suscetíveis a um maior risco de doença cardiovascular conforme o processo de envelhecimento ⁽⁴⁾. A *American Heart Association* (AHA) mostra que entre os anos de 2011 e 2014, as doenças cardiovasculares têm maior prevalência no sexo masculino na faixa etária mais jovem, já a partir da faixa etária dos 65 anos a prevalência entre as mulheres é mais alta, principalmente em virtude das alterações hormonais causadas pela menopausa ^(4,6). Além disto, na pós-menopausa é notado o aumento da pressão arterial (PA) por conta das mudanças dos níveis de hormônios sexuais. De fato, o estrogênio tem sido

relatado com efeito protetor no sistema cardiovascular, levando a vasodilatação e inibindo o processo de remodelação vascular frente a modulação do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) e do sistema simpático ^(7,8). Neste sentido, Ferreira et al. (2020) conduziram um estudo que teve como objetivo a avaliação da sensibilidade barorreflexa, da modulação autonômica cardiovascular e do estresse oxidativo, comparando ratos machos e ratas durante as fases não ovulatórias e ovulatórias e após ooforectomia; os autores mostraram que níveis reduzidos de estrogênio como na fase ovulatória do ciclo estral e após a ooforectomia foram associados a aumento da PA e redução da sensibilidade barorreflexa ⁽¹⁰⁾.

De acordo com Parati et al. (2012), que conduziram um estudo sobre VPA, risco cardiovascular e risco de progressão da doença renal, trabalhos da literatura demonstram que as alterações na VPA não são diretamente associadas com os níveis médios da PA, e com isso antecipam o desenvolvimento e a progressão de lesão renal ⁽¹⁹⁾. As oscilações da PA são complexas, podem ocorrer em curtos ou longos períodos, e são associadas a alguns fatores ambientais, genéticos, neuro centrais e comportamentais. Assim, estudos que buscam correlacionar esses fatores com a HAS têm sido de extrema importância para a investigação e o tratamento de lesões em órgãos-alvo e DRC ⁽¹¹⁾.

O aumento da VPA está associado diretamente a progressão dos danos cardíacos, renais e vasculares aumentando como consequência o risco de doenças cardiovasculares. Em adição, a elevação da VPA representa um importante indicador de risco quando observado em indivíduos com maior risco comparando com indivíduos de risco moderado e baixo para doenças cardiovasculares (DCV). Estudos recentes observaram que a redução dos valores de PA de pacientes hipertensos tem como consequência a redução de riscos de DCV ⁽⁹⁾. No entanto, embora seja sabido que HAS constitui um fator de risco importante para DRC, os fatores que explicam como a hipertensão pode lesar órgãos-alvo, como o rim, ainda não foram completamente mapeados.

1.2 Disfunção renal na hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A HAS apresenta relação bilateral com a DRC, e atualmente é uma das principais causas dessa doença. Associadas, essas duas doenças agravam drasticamente o risco cardiovascular, com isso a mortalidade por DCVs aumenta significativamente conforme a gravidade da DRC ⁽¹⁴⁾. Neste sentido, a formação de aterosclerose pode ser uma consequência da elevação da PA, pois facilita o acúmulo de placas de cálcio, lipídeos algumas substâncias tendo como consequência ocorrência de hipertensão renovascular e nefropatia isquêmica ^(14,15). A isquemia glomerular e a esclerose glomerular são fatores que podem explicar o desenvolvimento de DRC em virtude da progressão do estreitamento vascular e da perda da autorregulação e transmissão para o capilar glomerular, respectivamente ⁽¹³⁾.

Vale destacar, que as ações dos esteroides ovarianos têm como um dos alvos os vasos sanguíneos, induzindo a produção de óxido nítrico provocando vasodilatação. Além disso, podem causar alterações no metabolismo de lipídeos, levando a diminuição dos riscos de alterações cardiovasculares. Em adição, os estrogênios levam ao aumento do fluxo sanguíneo e a redução da fragilidade capilar e da concentração de endotelina, que é um vasoconstritor. Após a mulher entrar no período menopausa ou realizar a ooforectomia, nota-se maior ocorrência de aterosclerose ⁽¹⁹⁾. Adicionalmente, vários estudos relatam que o estrogênio possuiria a capacidade de diminuir os riscos de altas concentrações de urêmicas, como constatado em mulheres saudáveis após avaliações prévias na pós-menopausa e logo após reposição hormonal nota-se obtenção de uma maior taxa de filtração glomerular ^(16,17). A metabolização adequada do fármaco hidroclorotiazida tem como dependência a função renal normal e depende também da quantidade de toxicidade vinda do acúmulo do fármaco, podendo levar a insuficiência renal. Com isso, a dosagem medicamentosa em portadores de doença renal crônica tende a ser um processo difícil, por conta das alterações no metabolismo intestinal, hepático e renal. Nesse quadro do paciente é observada a redução das taxas de excreção renal de medicamentos. Estudos apontam que independente do medicamento ser dosado com base na taxa de filtração glomerular de cada indivíduo, reações adversas como intoxicações ainda se mostram frequentes ⁽¹⁸⁾.

1.3 Mecanismo de lesão cardiorrenal

O rim é o órgão do corpo responsável pela manutenção do volume e da composição da urina e do líquido extracelular, fazendo papel regulador. No glomérulo inicia-se a formação da urina, onde 20% dos componentes do plasma entram no rim através da artéria renal por conta da pressão hidrostática do sangue nos capilares glomerulares. Os componentes restantes do plasma que não foram filtrados circulam ao longo dos capilares glomerulares, atingindo arteríola eferente, assim seguindo para a circulação capilar peritubular ⁽⁹⁾. O rim também é responsável pelo transporte passivo de vários solutos vindos do epitélio, como no caso da ureia. É um dos órgãos no qual é relevante e evidente a relação entre a função e a estrutura ⁽¹⁹⁾. Além do mecanismo de autorregulação, muitas vezes necessários para que haja outras formas de realizar um controle estrito da circulação renal, dispondo de hormônios e peptídeos que auxiliam em tal função. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) regula funções essenciais, como a manutenção da pressão arterial tendo então como principal função a regulação da pressão arterial e garantir o balanço hídrico ⁽⁹⁾.

O efeito prejudicial associado à DRC é a ativação incessante do sistema SRAA ao longo do tempo, resulta na diminuição da perfusão do sangue em resposta à condição de vasoconstrição e a estenose vascular ^(20,21). Além disto, a última década houve um grande progresso na compreensão dos sistemas cardiovasculares, renais e neurais e suas relações com a HAS. Por meio dos estudos conduzidos foram descobertos novos sistemas, entre os quais inflamação, hormônios, microRNAs e ambientes estressores, que guardam relação com o desenvolvimento de lesão em órgãos-alvo em decorrência da HAS ⁽²⁵⁾. Quando associadas, HAS e DRC tem um papel fundamental de causa ou consequência. Estudos com diferentes modelos de experimentação animal onde fica estabelecido o papel que a HAS tem de induzir lesões graves em órgãos-alvo, como os rins ⁽²³⁾.

De acordo com Irigoyen *et al.* (2016), os primeiros estudos que tentaram correlacionar a variabilidade da pressão arterial no decorrer do dia com a mortalidade e lesão nos órgãos-alvo consideraram análises feitas em períodos curtos. Além dos maus hábitos alimentares, fatores ambientais e genéticos também podem influenciar o desenvolvimento de HAS, e a combinação desses

dois tipos de fatores pode agravar ainda mais o aumento da PA ⁽²³⁾. Há ainda diversos fatores fisiopatológicos, como a ativação incorreta do (SRAA), a ativação excessiva do sistema simpático e do sistema nervoso, a manipulação atípica pelo rim, o estresse oxidativo e a inflamação que leva a produção de moléculas vasoativas e, como consequência, alteração na função e na estrutura de vasos sanguíneos ⁽²²⁾.

As últimas evidências encontradas em estudos indicam que além dos riscos de mortalidade, valores elevados e/ou alta da variabilidade da PA estão ligados integralmente com a evolução e progressão dos danos cardíacos, vasculares e renais. As oscilações da PA são complexas, podem ocorrer em curtos ou longos períodos, e são associadas a alguns fatores ambientais, genéticos, neuro centrais e comportamentais. Assim, estudos que buscam correlacionar esses fatores com a HAS têm sido de extrema importância para a investigação e o tratamento de lesões em órgãos-alvo e DRC ⁽²³⁾.

Neste sentido, o estresse oxidativo tem uma função muito bem descrita na HAS e ocorre devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou a diminuição de defesas antioxidantes. Estudos buscam relacionar hipertrofia, remodelação e dano tecidual, procurando demonstrar o papel central do estresse oxidativo na hipertensão e seus principais desfechos. As defesas antioxidantes e a produção de EROs podem causar um desequilíbrio no organismo levando a queda da biodisponibilidade de óxido nítrico, uma ativação e alteração vascular pela ativação da matriz metaloproteinases (MMP) ⁽²⁶⁾.

Adicionalmente, a inflamação é uma alteração marcante na insuficiência renal. Diversos mecanismos como estresse oxidativo, anemia e uremia, e outros fatores, que contribuem para a progressão da doença renal e dano da função renal no estado urêmico, aumentam o risco de infecções; e em pacientes renais em tratamento de hemodiálise, a inflamação crônica leva a complicações como as doenças cardiovasculares. Em uma revisão sistemática da literatura, os artigos analisados demonstram uma relação direta entre a IL-6 com a disfunção renal; portanto, a IL-6 é utilizada como um marcador de lesão renal e pode estar relacionada com desfechos clínicos como aterosclerose e doenças cardiovasculares ⁽⁸⁰⁾.

1.4 Terapia medicamentosa

A terapia medicamentosa na HAS é composta pelas terapias farmacológicas e não farmacológicas, sendo o tratamento farmacológico uma das principais medidas, com efetividade comprovada na redução da PA feita por diferentes classes medicamentosas, com recomendação preferencial para as classes com diminuição de eventos cardiovasculares ⁽²⁷⁾.

Os diuréticos tiazídicos constituem a classe de fármaco mais utilizada no tratamento de HAS por conta de sua eficácia terapêutica e seu baixo custo. Eles agem inibindo o transporte de sódio e cloro na membrana da parte proximal do túbulo contorcido distal e com isso ocorre redução significativa do volume plasmático e extracelular. A hidroclorotiazida é um anti-hipertensivo que além da ação anti-hipertensiva pode ser utilizada no tratamento de doenças renais crônicas, insuficiência cardíaca e cirrose hepática ⁽²⁷⁾.

Segundo a recente diretriz para manejo de PA elevada em adultos ⁽²⁷⁾, preconiza-se que o tratamento inicial anti-hipertensivo deva incluir um diurético tiazídico (DT), um bloqueador dos canais de cálcio (BCC), um inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA) ou um bloqueador dos receptores da angiotensina (BRA). Contudo, em adultos com DRC acima de 18 anos, existe recomendação moderada que os iECA ou BRA sejam adotados como terapia inicial ou complementar ^(28,29), com ressalva a pacientes com mais de 75 anos os DT e BCC podem ser considerados novamente como uma opção. Em adultos hipertensos, a Hidroclorotiazida (fármaco do tipo DT) é reconhecida como um dos medicamentos anti-hipertensivos mais eficazes quando se trata de redução de PA, onde após meta-análise comparativa, foi observado que chega a reduzir a PAS -19,30 mmHg com uso de Hidroclorotiazida ⁽²⁹⁾. Enquanto pesquisas já associaram o uso de DT a efeitos cardioprotetores adicionais como redução de insuficiência cardíaca, estudos atuais comprovam que os DT em baixa dosagem trazem um melhor desfecho final para adultos ⁽²⁹⁾, tanto em mortalidade quanto morbidade.

Em 2015 houve uma grande mudança no manejo da hipertensão arterial. O *Sprint Research Group* ⁽²⁸⁾ verificou em 9.361 pacientes que, aqueles que foram medicados de maneira intensiva com o intuito de manter uma pressão

arterial sistólica (PAS) inferior a 120 mmHg, apresentaram menos eventos cardiovasculares fatais e não fatais em comparação a pacientes recebendo o tratamento padrão para HAS. Porém tal terapêutica resultou em efeitos colaterais provindos do aumento da dosagem da medicação anti-hipertensiva, como hipotensão, síncope e insuficiência renal aguda, reforçando o conceito que terapias não medicamentosas tem um papel importante como complemento ao tratamento da HAS.

Quando utilizada de maneira correta a hidroclorotiazida diminui de forma satisfatória a pressão arterial e se utilizadas em doses menores quando associadas, possuem excelente ação com outros fármacos anti-hipertensivos. Os tiazídicos tem uma excelente ação associados aos inibidores da enzima conversora da angiotensina II bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II bloqueadores dos canais de cálcio (BCC). Contudo, em adultos com doenças renais crônicas existe um alerta de recomendação moderada, ou seja, adotados como terapia inicial ^(27,30).

1.5 Treinamento físico no manejo da hipertensão

A Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda o treinamento físico aeróbico (TFA) como exercícios para prevenção e tratamento da HAS, com grau de recomendação I e Nível de evidência A. Porém, o treinamento físico resistido (TFR) também tem sido bastante estudado, sendo eficaz em reduzir a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) em pacientes hipertensos e pré-hipertensos. Os ensaios que analisam o TFR ainda são escassos, porém o TFA E TFR são recomendados para o tratamento da HAS e quando comparadas essas duas modalidades de treinamento, apesar de serem efetivas na redução da PA ^(27,31).

Vale destacar que em 1992, a inatividade física foi estabelecida pela AHA como um fator de risco para as DCVs. Os profissionais da saúde foram encorajados a prescrever atividade física para a manutenção da saúde de seus pacientes ⁽³¹⁾. Em 2004, um estudo da INTERHEART ⁽³²⁾ apontou que fatores de risco como o sedentarismo, correspondem a maior parcela de risco para o infarto agudo do miocárdio em todo mundo, sugerindo novas abordagens de prevenção. Santa Rosa et al. (2020) conduziram um estudo sobre a importância de um estilo

de vida ativo na variabilidade da frequência cardíaca e em marcadores de estresse oxidativo sistêmicos em filhos de pais hipertensos, concluindo que o estilo de vida fisicamente ativo foi capaz de atenuar os prejuízos observados de reduzida VFC e de aumento de estresse oxidativo, que podem estar associados ao desenvolvimento da HAS, nesta população ⁽²⁶⁾.

Atualmente, a Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda o treinamento físico aeróbio (TFA) como forma preferencial de exercícios para prevenção e tratamento para HAS, com Grau de recomendação I e Nível de evidencia A ⁽³²⁾. Contudo, o treinamento físico resistido (TFR) também tem sido bastante estudado, sendo eficaz em reduzir a PAS e a pressão arterial diastólica (PAD) em pacientes hipertensos e pré-hipertensos ⁽³³⁾.

Os efeitos do exercício na população hipertensa atualmente estão sendo observado em estudos e é possível afirmar que o exercício aeróbio ou combinado é igualmente eficaz para reduzir a PAS comparando com os medicamentos anti-hipertensivos. Naci Aci *et al.* (2019) realizaram uma meta-análise de no qual foi possível observar que, diferente dos medicamentos anti-hipertensivos, o efeito do exercício aumenta conforme a elevação da PAS ⁽³⁴⁾. Esses resultados levaram outros autores a compreender a razão de trabalhos anteriores que incluíam o treinamento físico não terem obtido o mesmo resultado, observando que esses estudos normalmente incluem pessoas com PA normal e/ou pré-hipertensas ⁽³⁵⁾

Vale ressaltar que o TF também tem sido recomendado no manejo da DRC como uma medida conservadora que, quando associada ao tratamento farmacológico, dieta e modificações do estilo de vida, promovem uma diminuição da progressão da disfunção renal e dos sintomas, além de prevenir complicações, no entanto poucos estudos avaliaram os efeitos de um protocolo de treinamento combinado (aeróbico + resistido), principalmente com associação da terapia farmacológica, para controle de PA e manejo das HAS e do dano renal⁽³⁵⁾.

O treinamento físico combinado de moderada intensidade é capaz de reduzir PA em idosos hipertensos medicados, em mulheres na menopausa e em modelos animais de síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2. Em adição, tanto em humanos como em modelos animais, há resultados que o treinamento

físico combinado pode melhorar a função vascular, diminuir biomarcadores plasmáticos associados a risco cardiovascular, aumentar a capacidade física e promover melhor controle autonômico e reduzir o perfil inflamatório e o EO. Neste sentido, Huang et al. avaliaram pacientes com doença renal em estado terminal e verificaram que houve melhoria da eficiência da hemodiálise, redução da PAS e uma melhora do condicionamento físico com a aplicação desta abordagem não farmacológica ^(36,37).

Com relação a mulheres hipertensas na pós-menopausa um programa de 12 semanas de treinamento físico combinado (TFC) foi suficiente para alcançar redução da PA e melhora da capacidade funcional ⁽³⁸⁾. Em modelo experimental, Da Silva Dias et al. (2019) demonstraram que a menopausa é um potente fator de risco para doenças cardiometabólicas, porém há um impacto positivo do treinamento físico aeróbico iniciado na fase da menopausa em parâmetros hemodinâmicos, autonômicos e de estresse oxidativo em tecido cardíaco e renal ⁽⁴⁶⁾.

Shimojo *et al.* (2018), em um modelo de experimentação animal de menopausa, obtiveram redução dos níveis de PA e da ativação simpática em ratas SHR em resposta ao TFC em ratas ooforectomizadas, avaliaram também parâmetros inflamatórios nos tecidos cardíacos e renais e estresse oxidativo ⁽³⁸⁾. Em conjunto, trabalhos sugerem que o TFC pode agregar benefícios do TFA e TFR, mas estudos adicionais são necessários para a averiguação dessa hipótese. Desta forma, esse projeto foi desenhado a fim de investigar se o TFC é capaz de maximizar os efeitos do tratamento farmacológico com hidroclorotiazida na redução da PA e da VPA, atenuando possíveis prejuízos morfofuncionais renais.

Neste estudo desenvolvemos com a hipótese que a associação de terapias farmacológicas e não farmacológicas induzem uma melhora expressiva da VPA, acentuando uma melhora da VPA, principalmente sobre o perfil anti-inflamatório e de EO no tecido renal, resultando em uma melhor redução dos da PA e da função renal em ratas SHR quando comparados com terapias isoladas. O envolvimento de tais mecanismos em eventuais benefícios destas terapias, tem como resultado a busca por intervenções precisas no manejo da população com HAS e suas possíveis complicações renais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Investigar os efeitos do treinamento físico combinado (TFC) associado à terapia farmacológica com hidroclorotiazida sobre a VPA e parâmetros morfofuncionais, inflamatórios e de estresse oxidativo renais em um modelo experimental de HAS e menopausa.

2.2 Objetivos específicos

Investigar e comparar as adaptações induzidas pelo TFC de moderada intensidade associado ou não ao tratamento com diurético tiazídico em ratas SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) ooforectomizadas sobre as seguintes variáveis:

- Capacidade física;
- PA;
- Modulação autonômica vascular (VPA e modulação simpática vascular);
- Função renal: creatinina plasmática, *clearance* de creatinina, ureia plasmática e proteinúria;
- Morfologia e morfometria renal;
- Mediadores inflamatórios em tecido renal: fatores de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10);
- Estresse oxidativo em tecido renal: catalase (CAT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas oxidadas, atividade da NADPH oxidase, peróxido de hidrogênio, atividade da catalase e superóxido dismutase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética CEUA UNIFESP: 7611290618. Foram utilizadas 32 ratas SHR, sendo distribuídas em 4 grupos (n=8/grupo): ooforectomizadas sedentárias (OS), ooforectomizadas sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida (OSH), ooforectomizadas treinadas (OT) e ooforectomizadas treinadas tratadas com Hidroclorotiazida (OTH) (Figura 1).

A ooforectomia foi realizada nos dias iniciais do estudo. Após adaptação à esteira e escada de treinamento, as ratas do grupo OS seguiram com o tratamento placebo durante 8 semanas, enquanto as dos demais grupos com tratamento com anti-hipertensivo (30mg/kg de Hidroclorotiazida, diluídos na água de beber) e/ou treinamento físico combinado (3 dias/semana, 40-60% da capacidade máxima obtida no teste de esforço em esteira e escada).

Ao final das 8 semanas, foram realizados os registros da PA para análise da VPA. Adicionalmente, uma amostra de urina foi coletada em gaiola metabólica. Por fim, conduzimos a eutanásia de todas as ratas, ocasião em que foram coletadas amostra de plasma para análise da função renal e rins para avaliação de parâmetros morfológicos, morfométricos, medidores inflamatórios e marcadores de estresse oxidativo em tecido renal.

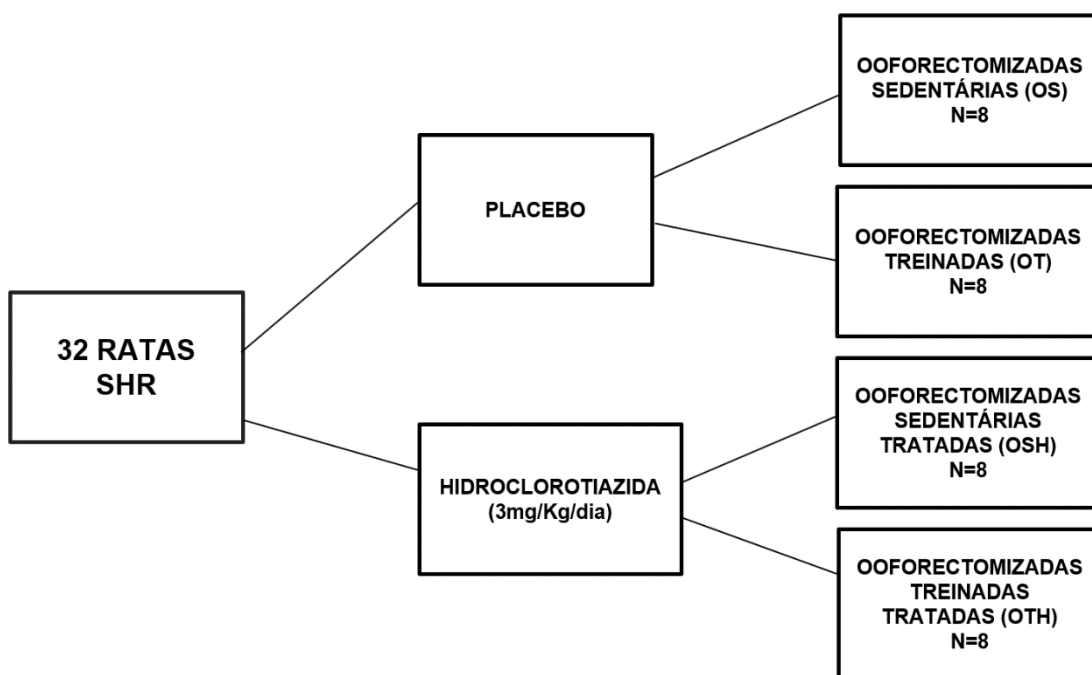


Figura 1. Metodologia experimental

3.1 Ooforectomia

A ooforectomia dos animais foi realizada com três meses de idade. Administrada, via subcutânea, uma dose analgésica de Meloxicam (1 mg/kg, 30 minutos antes da cirurgia). Doses via intraperitoneal de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) foram administradas para anestesia. Na cirurgia, o oviduto será seccionado e os ovários removidos ⁽⁶²⁾. Os animais receberam uma dose intramuscular de penicilina (10000 U/kg). Após o procedimento, foram administradas uma dose subcutânea de Meloxicam (1 mg/kg) a cada 24 horas e de Tramadol (20 mg/kg) de 8/8 horas, por 3 dias, para efeitos analgésicos.

3.2 Avaliação da capacidade física

Foi realizado o teste de esforço em esteira para determinação do esforço aeróbio máximo. Após 3-5 dias de adaptação (10 minutos/sessão a 0,3 km/h), os animais o teste com velocidade inicial de 0,3 km/h e incrementos de mesma magnitude a cada três minutos, até a exaustão. Ao final, obtivemos o tempo de teste e a velocidade máxima atingida por cada animal. Já o teste de esforço em escada foi realizado em escada adaptada com degraus verticais de 0,5 cm de altura/degrau. Não foram utilizados recursos de recompensa ou estimulação elétrica para execução da escalada. Na extremidade superior da escada há uma caixa (20cm³) para descanso (2 minutos). Para determinação da carga máxima, admite-se que o animal deverá realizar seis escaladas, tendo a escalada inicial uma carga relativa de 75% do peso corporal. Adicionando 15% do peso corporal a cada subida após o descanso, até que o animal não consiga prosseguir carregando o peso ⁽³⁶⁾.

Na 4^a e 8^a semana, todos os grupos submetidos à avaliação indireta de PA e testes de esforço em esteira e escada.

3.3 Tratamento farmacológico

O medicamento (30 mg/kg de hidroclorotiazida) administrado por via oral (diluído em água de beber) durante 5 dias (fase de adaptação). Na sequência, realizada a medida de PAS por pletismografia de cauda para checagem dos valores entre os grupos. Na sequência, os animais foram tratados durante 8

semanas sendo o consumo aferido e ajustado semanalmente, com medidas de PAS por pletismografia a cada 4 semanas. A escolha pela hidroclorotiazida como tratamento medicamentoso baseou-se na efetividade comprovada em reduzir a mortalidade cardiovascular, bem como a PA, com grande aceitação e alto grau de recomendação na prática clínica.

3.4 Treinamento físico combinado

O TFC realizado durante 8 semanas com duração entre 40-60 minutos e intensidade progressivas, 3 sessões/semana, considerando as atuais recomendações para a prática de exercícios por indivíduos hipertensos ⁽²⁷⁾. A elaboração do treinamento físico em ratos foi realizada levando em consideração a experiência e os resultados prévios do nosso grupo de pesquisa com experimentação animal ^(41,42). As sessões foram iniciadas pelo TFA em esteira adaptada (~30-40 min) e seguidas do TFR dinâmico em escada (~20-30 min, 15-20 escaladas com intervalo de 1 minuto) ambos com intensidade moderada (40-60% da capacidade máxima obtida nos testes físicos em esteira e escada, respectivamente).

3.5 Avaliação da função renal

Durante a 7ª semana de protocolo, os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas (Nalgene, Ugo Basile, Itália) por 24 horas, onde foram pesados no início e no fim, com livre acesso a água e comida durante esse período. Ambos mensurados, assim como o débito urinário e fecal. A amostra de urina, em conjunto com a amostra de sangue coletada no momento da eutanásia, ambos armazenados em freezer à -80°C para posterior medição das concentrações de creatinina e ureia. Os níveis de creatinina no plasma e na urina medidos pelo método de Jaffé. O acúmulo de ureia no plasma foi determinado com o método colorimétrico enzimático utilizando um kit específico (*Labtest Diagnostics*, Lagoa Santa, Brasil). A medição de proteínas na urina foi realizada com urina de 24 horas coletada em gaiola metabólica utilizando o método de Bradford ⁽⁴³⁾.

3.6 Canulação

Após as 8 semanas de controle, tratamento farmacológico e/ou TFC, os animais receberam uma dose intraperitoneal de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) como anestesia e foram colocados em decúbito dorsal para realização de pequena incisão próxima ao pescoço para implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao VE para registro direto da PA e na veia jugular para infusão das drogas. Após isso, as extremidades mais calibrosas das cânulas passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele ⁽⁴⁴⁾. As cânulas são confeccionadas com tubos de Policloreto de Vinila (Abbott) equivalente ao polietileno PE10 e PE50. Doses subcutâneas de Tramadol (5 mg/kg) e Dipirona (50 mg/kg) administradas para analgesia (8/8 horas).

3.7 Medida da pressão arterial

No dia seguinte à canulação com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa. Esta extensão está conectada a um transdutor eletromagnético (*Blood Pressure XDCR, Kent© Scientific, Litchfield, CT, EUA*) que fica conectado a um pré-amplificador (*Stemtech BPMT-2, Quintron Instrument© Inc, Milwaukee, EUA*). Sinais de PA foram gravados durante 30 minutos em microcomputador equipado com sistema de aquisição de dados (*Windaq, 2Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA*), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, em uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal ⁽⁴⁵⁾.

3.8 Variabilidade da PAS

A VPA foi avaliada por meio da variabilidade da PAS no domínio do tempo (variância) e da frequência usando a transformada rápida de Fourier. Séries temporais da PAS divididas em segmentos de 350 batimentos com sobreposição de 50%. As séries temporais da PAS decompostas pelo método autorregressivo, utilizando o recurso de *Levinson-Durbin* e o critério de Akaike para a escolha da ordem do modelo ⁽⁴²⁾. Os componentes oscilatórios dos espectros quantificados

em faixas de baixa frequência (*low frequency* – LF) e alta frequência (*high frequency* – HF). A potência do espectro foi calculada para cada componente reconhecível nas faixas de LF e HF, sendo a potência expressa como a intensidade de LF e HF. Os segmentos que apresentaram oscilações muito lentas (<0,1 Hz), que contribuem para mais de 70% da variabilidade total, seguiram considerado não estacionários e descartados. A sensibilidade espontânea dos pressorreceptores será obtida pelo índice α , metodologia que analisa a correlação temporal e linear entre o intervalo RR e a variabilidade da PAS ⁽⁴¹⁾.

3.9 Eutanásia dos animais

A eutanásia ocorreu no dia seguinte ao término da análise hemodinâmica. Todos os animais foram previamente pesados. Com os animais já canulados, foi aplicada a anestesia endovenosa de Cetamina seguida de decapitação. Amostras de sangue e tecido renal coletadas e congeladas para avaliações posteriores.

3.10 Preparação de tecido renal

Os rins foram homogeneizados durante 30 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mmol/L em isopropanol e na quantidade de 10 μ L/mL de KCl adicionado. Em seguida foram homogeneizados, centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm, em centrífuga refrigerada entre 0 e 4°C e o sobrenadante congelado em freezer a -80°C para as dosagens em análises posteriores ⁽⁴⁶⁾.

3.11 Mediadores inflamatórios

As dosagens de interleucinas e TNF alfa foram realizadas pelo método ELISA em microplacas (96 poços) sensibilizadas com o anticorpo para a proteína de interesse, aderido à parede dos poços da placa por um substrato imunoabsorvente. Feito o bloqueio prévio de ligações inespecíficas e posterior incubação das amostras experimentais, contendo a proteína (antígeno) a ser

dosada. Foi realizada a incubação com anticorpo ligado a enzima anticorpo secundário conjugado a peroxidase, e posterior reação com cromógeno. Na mesma placa, realizamos a curva-padrão, que foi usada para o cálculo da quantidade de proteína por poço. A absorbância medida em aparelho leitor de ELISA a 450 nm e 550 nm. Utilizando kits específicos para ratos: Rat TNF α , Rat IL-6 e Rat IL-10 (R&D Systems).

3.12 Estresse oxidativo

NADPH oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi avaliada com homogeneizado de tecido renal e avaliada pela produção de superóxido determinado por meio de ELISA. Para realização do ensaio foi utilizado buffer fosfato 50mM contendo EDTA 2mM e sucrose 150mM, NADPH 1,3mM e 10 μ l de amostra de tecido renal ⁽⁴⁷⁾.

Dosagem de peróxido de hidrogênio

Alíquotas de 70 μ l de homogeneizado de tecido renal foram incubadas por 30 min em uma solução contendo buffer dextrose, 0,28 mmol/l de vermelho de fenol e 5mg de HRP. Após este período de incubação, 0,5 mol/l de NaOH foi adicionado e os valores de absorbância da solução medidos a 610 nm. Os resultados são expressos em nmol H₂O₂ grama de tecido ⁽⁴⁸⁾.

Catalase (CAT)

Para a realização das medidas de CAT utilizamos uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Em seguida adicionados 980 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de homogeneizado de tecido renal na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir adicionados 10 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e monitorada a diminuição da absorbância à 240 nm no espectrofotômetro ⁽⁴⁸⁾.

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 5 μ L de homogeneizado de tecido renal, 980 μ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 10 μ L de pirogalol a 24 mmol/L, 5 μ L de CAT a 30 μ mol/L. Esta curva obtida é utilizada como branco. Também é realizado uma curva padrão utilizando duas concentrações distintas de 21 SOD (0,72U e 0,144U), será obtida a equação da reta para realização dos cálculos ⁽⁴⁹⁾.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para que ocorra a reação, foi adicionado a 0,25mL de homogeneizado, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000 rpm. Retirada 0,5mL do sobrenadante e a adicionado 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reagiu com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Em seguida, realizada a leitura da absorbância a 535 nm em espectrofotômetro ⁽⁵⁰⁾.

Dosagem de proteínas oxidadas

A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas em tecido renal com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina ⁽⁵¹⁾.

3.13 Morfometria e morfologia renal

Os rins direitos de todas as ratas foram coletados e pesados em balança analítica e, em seguida, seccionados em corte longitudinal e mergulhados em solução de Bouin (etanol saturado com ácido pícrico 75%, formaldeído 20% e ácido acético glacial 5%), onde permanecerão por 24 horas. Após o período de fixação, as peças desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à

temperatura de 56°C, segundo a metodologia preconizada por Michalany ⁽⁵²⁾. Secções histológicas de 5 µm de espessura coradas utilizando a técnica de tricoma de Masson para análises de morfologia geral, como dano tecidual e quantificação glomerular.

A captura de imagens realizada com o auxílio de um sistema computadorizado, constituído de um microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss) adaptado a uma câmara de alta resolução conectados a um computador. A área e contagem glomerular determinados por morfometria computadorizada (Nikon, NIS-Elements), com 20 campos sendo analisados em cada lâmina (aumento de 20x). A porcentagem da área com alterações morfológicas no interstício renal será estimada com auxílio do software de análise de imagens ImageJ, desenvolvido pelo *National Institutes of Health* – NIH ⁽⁵³⁾. Na análise morfológica túbulo-intersticiais, os campos serão divididos em três faixas de alteração morfológica: 0 – 25% (+), 26% - 50% (++) e 51 – 100% (+++) do campo avaliado.

3.14 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram testados quanto a distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. Utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do post hoc de Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado de $p < 0,05$. Nas avaliações histológicas os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (2 animais por grupo: média de 40 campos por animal), os dados foram testados quanto a esfericidade pelo teste de Mauchly e comparados por ANOVA, seguido do post hoc de Student-Newman-Keuls.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal e capacidade funcional

Não houve diferença de peso corporal entre os grupos estudados ao final do protocolo (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Peso corporal (g)	238±6	230±9	233±7	220±9

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas sedentárias tratadas com hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas treinadas; OTH - Ooforectomizadas treinadas tratadas com hidroclorotiazida.

Ambos os grupos treinados (OT e OTH) apresentaram um aumento em seus desempenhos no teste em esteira e em escada quando comparados com os grupos sedentários ao final do protocolo. Além disso, o grupo OTH apresentou um aumento adicional quando comparado com o grupo OT no final do protocolo no teste de carga máxima (Tabela 2;Figura 2;Figura 3)

Tabela 2. Testes de esforço máximo em esteira e teste de carga máxima em escada nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Tempo Máximo Teste (min)	23,2±1,3	21,7±2,5	26,9±3,7*#	29,5±1,6*#
Carga Máxima/peso corporal (g/g)	1,8±0,2	1,8±0,2	2,1±0,2*#	2,8±0,5*#+

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * P < 0,05 vs OS; # p < 0,05 vs. OSH; + p < 0,05 vs. OT.

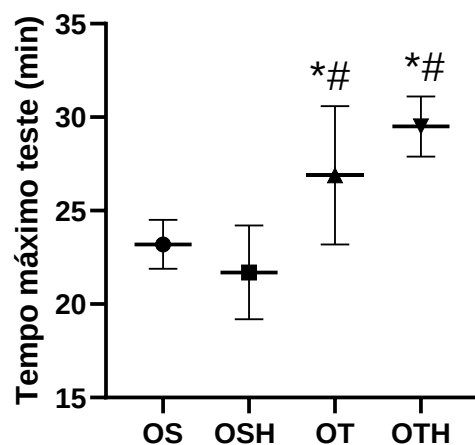


Figura 2. Tempo máximo teste (min) nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; # $p < 0,05$ vs. OSH.

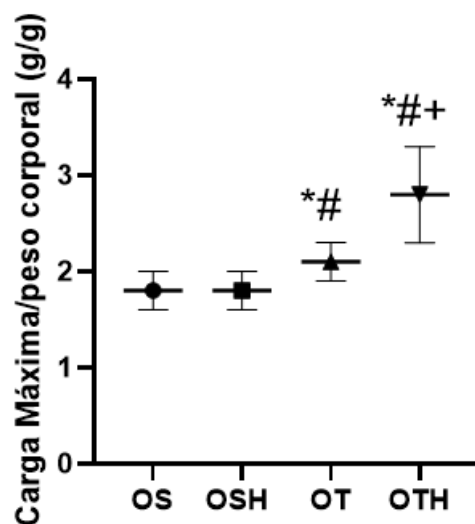


Figura 3. Carga Máxima/peso corporal (g/g) nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; # $p < 0,05$ vs. OSH; + $p < 0,05$ vs. OT.

4.2 Avaliações hemodinâmicas e autonômicas

Com relação aos parâmetros hemodinâmicos, o grupo sedentário tratado com hidroclorotiazida (OSH: $189,5 \pm 13,2$ mmHg) e os grupos treinados (OT: $179,3 \pm 15,5$ e OTH: $174,1 \pm 15$ mmHg) apresentaram menores valores de pressão arterial sistólica quando comparados ao grupo de ooforectomizadas sedentárias (OS: $207,6 \pm 15$ mmHg) (Figura 4).

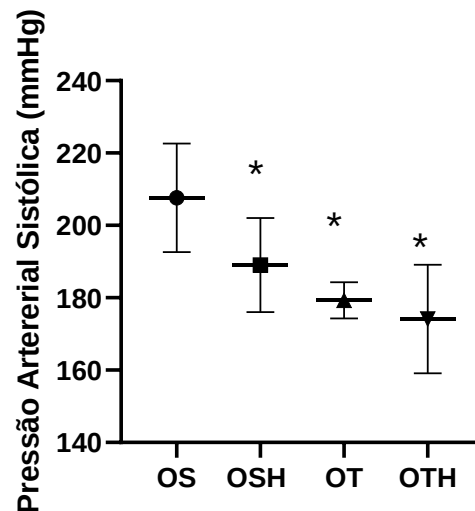


Figura 4. Pressão Arterial Sistólica (PAS) nos grupos estudados

Valores representam média $\pm$ desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS.

Além disso, a associação das terapias (grupo OTH) promoveu redução da variância da PAS e da modulação simpática vasomotora em comparação aos grupos OS e OSH (Tabela 3; Figura 5; Figura 6).

Tabela 3. Variabilidade da pressão arterial (VPA) nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Variância PAS (mmHg²)	60,1 $\pm$ 13,1	51,0 $\pm$ 11,5	33,5 $\pm$ 13,2	30,3 $\pm$ 10,5*#
BF PAS (mmHg²)	18,8 $\pm$ 6,1	15,8 $\pm$ 5,5	6,9 $\pm$ 6,0	4,6 $\pm$ 2,4*#

Valores representam média $\pm$ desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; # $p < 0,05$ vs. OSH.

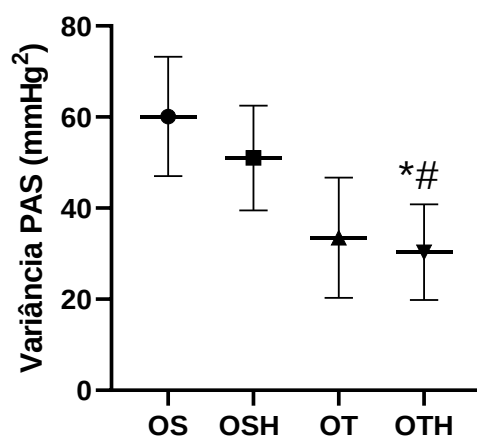


Figura 5. Variância PAS (mmHg²) nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS; # p < 0,05 vs. OSH.

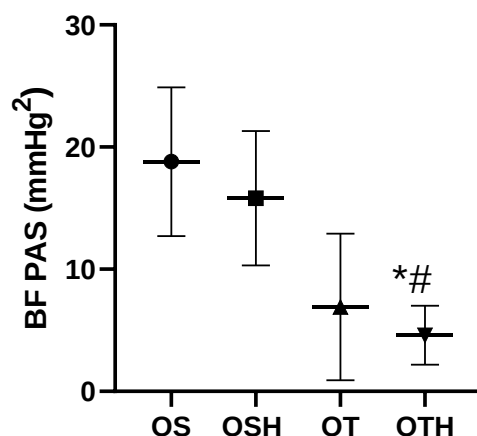


Figura 6. Modulação simpática vascular (BF PAS) nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS; # p < 0,05 vs. OSH.

4.3 Função renal

Nas avaliações de função renal, os grupos tratados com hidroclorotiazida (OSH e OTH) apresentaram redução da creatinina plasmática e aumento no *clearance* de creatinina quando comparados com o grupo OS (Figuras 7 e 8). Não houve diferença na ureia plasmática e na proteinúria entre os grupos estudados (Tabela 4; Figura 7; Figura 8).

Tabela 4. Função renal nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Ureia plasmática (mg/dL)	33,79±5,87	35,68±4,77	32,34±10,19	30,80±5,14
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,49±0,06	0,35±0,08*	0,36±0,05	0,32±0,07*
<i>Clearance</i> de creatinina (ml/min/Kg)	6,0±1,2	10,2±3,4*	8,54±2,53	11,1±2,8*
Proteinúria (mg/24h)	22,9±4,3	19,1±4,6	18,0±3,3	20,1±3,6

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS.

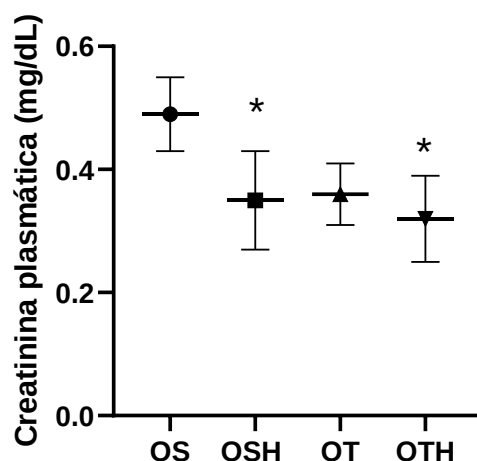


Figura 7. Creatinina plasmática (mg/dL) nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS.

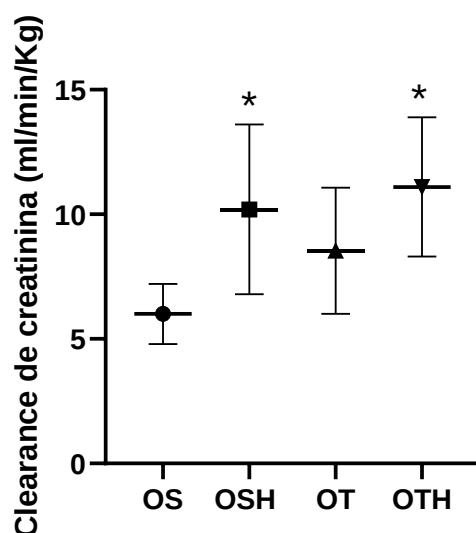


Figura 8. Clearance de creatinina nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS.

4.4 Avaliações de morfologia e morfometria renal

4.4.1 Avaliações glomerulares

O grupo OS apresentou um aumento nas análises de quantificação glomerular quando comparado com os demais grupos (Tabela 5, Figura 9).

Tabela 5. Quantificação de glomérulos nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Glomérulo / mm ²	12,9±0,8	10,3±0,7*	9,8±0,9*	9,7±0,6*

Valores representam média±erro padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; + $p < 0,05$ vs. OT.

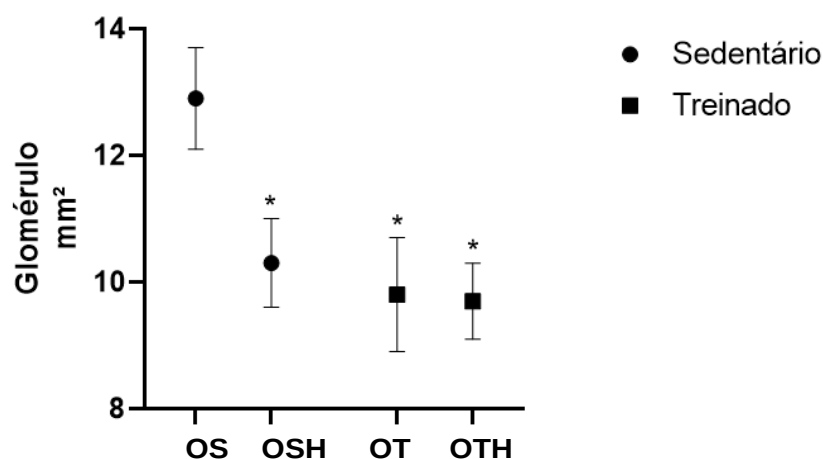


Figura 9. Quantificação de glomérulos (mm²) nos grupos estudados

Valores representam média ± erro padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; + $p < 0,05$ vs. OT.

4.4.2 Fibrose túbulo intersticial

Para análise de fibrose túbulo intersticial os campos foram divididos em 3 faixas considerando a alteração morfológica: 0 – 25%, 26 – 50% e 51 – 100% (Figura 11).

Os resultados demonstraram que o grupo OS apresentou redução nos campos com área de fibrose túbulo intersticial de 0 - 25% e aumento de campos de 51 – 100% quando comparado aos demais grupos estudados, além de aumento na faixa de 26 – 50% em relação ao grupo OTH. Não houve diferença entre os grupos OT e OSH nos campos analisados de 0 – 25% e 26 - 50% de áreas com fibrose túbulo intersticial. O grupo OTH apresentou aumento de campos com alterações de 0 – 25% em relação aos demais grupos e redução número de campos nas faixas de 26 – 50% quando comparado a todos os demais grupos estudados. Os grupos tratados apresentaram menor número de campos com fibrose túbulo intersticial de 51-100% em relação ao grupo OS (Figura 10).

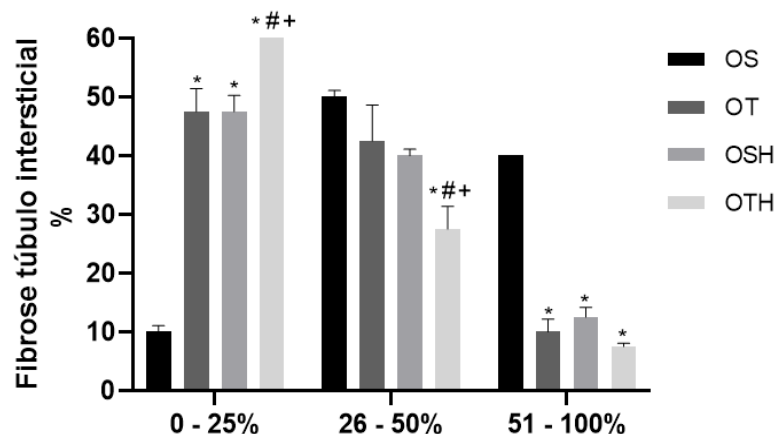


Figura 10. Fibrose túbulo intersticial nos grupos estudados

Valores representam média±erro padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS; # $p < 0,05$ vs. OSH; + $p < 0,05$ vs. OT. Para análise de fibrose túbulo intersticial os campos foram divididos em 3 faixas considerando a alteração morfológica: 0 – 25%, 26 – 50% e 51 – 100%.

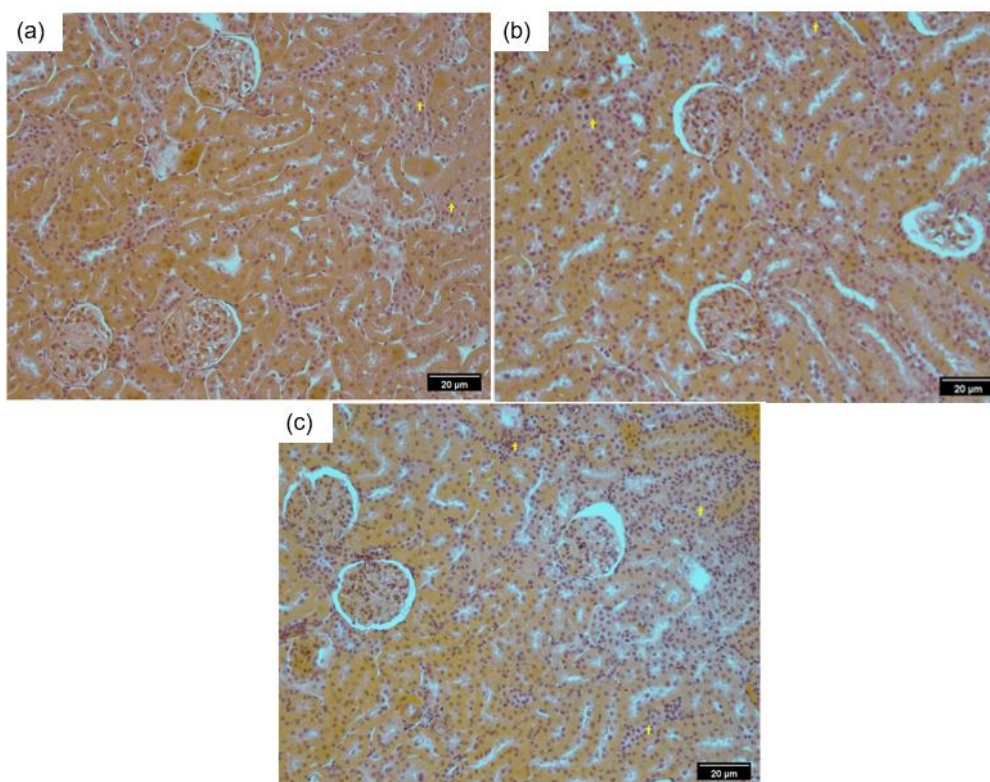


Figura 11. Cortes histológicos representativos de fibrose túbulo intersticial nos grupos estudados corados com tricômio de Masson com aumento de lente objetiva de 20x. (a) fibrose túbulo intersticial 0 – 25%; (b) fibrose túbulo intersticial 26 – 50%; (c) fibrose túbulo intersticial 51 – 100 %. + fibrose túbulo intersticial.

4.5 Mediadores inflamatórios em tecido renal

Com relação aos mediadores inflamatórios em tecido renal os grupos treinados (OT e OTH) apresentaram valores reduzidos de TNF- α em relação aos grupos sedentários. Não houve diferença entre os grupos para IL-6. O grupo treinado tratado com hidroclorotiazida (OTH) apresentou aumento de IL-10 e na razão IL10/TNF-alfa quando comparado com os outros grupos (Tabela 6; Figura 13; Figura14).

Tabela 6. Mediadores inflamatórios em tecido renal nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
TNF-α (pg/ml)	46,79 $\pm$ 16,70	41,55 $\pm$ 10,32	33,87 $\pm$ 6,98*#	31,80 $\pm$ 5,32*#
IL-6 (pg/ml)	83,87 $\pm$ 32,94	90,26 $\pm$ 15,22	93,22 $\pm$ 13,32	106,71 $\pm$ 22,72
IL-10 (pg/ml)	52,80 $\pm$ 23,23	45,10 $\pm$ 10,58	59,93 $\pm$ 10,39	78,11 $\pm$ 17,34*#+
IL10/TNF-alfa	1,18 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,27	1,69 $\pm$ 0,15	1,99 $\pm$ 0,07*#+

Valores representam média $\pm$ desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * P < 0,05 vs OS; # p < 0,05 vs. OSH; + p < 0.05 vs. OT.

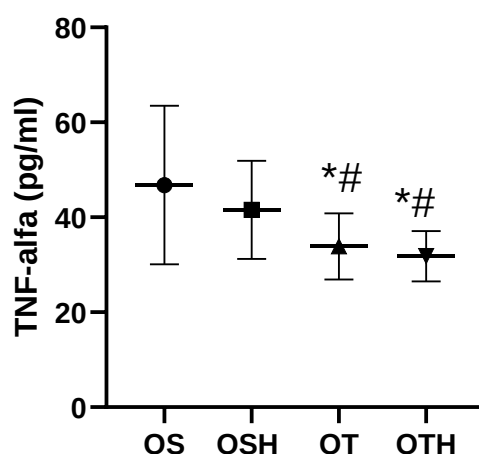


Figura 12. TNF-alfa em tecido renal nos grupos estudados

Valores representam média $\pm$ desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS; # p < 0,05 vs. OSH; + p < 0.05 vs. OT.

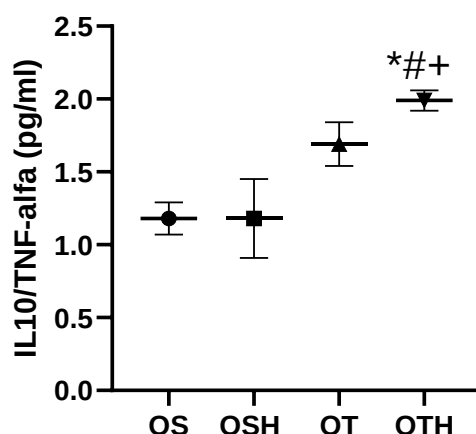


Figura 13. IL10/TNF-alfa em tecido renal nos grupos estudados

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS; # p < 0,05 vs. OSH; + p < 0.05 vs. OT.

4.6 Estresse oxidativo renal

Nas análises de estresse oxidativo renal ambos os grupos treinados apresentaram redução de proteínas oxidadas (carbonilas) e apenas a combinação fármaco com TFC (OTH) promoveu um aumento da atividade da catalase comparado com o grupo OS (Tabela 7; Figura 14; Figura 15).

Tabela 7. Estresse oxidativo em tecido renal nos grupos estudados

	OS	OSH	OT	OTH
Carbonilas (nmol/mg proteína)	5,35±0,58	4,28±0,76	4,32±0,49*	4,48±0,42*
TBARS (μmol/mg proteína)	1,87±0,63	1,14±0,33	1,15±0,30	1,43±0,36
NADPH oxidase (nmol/mg proteína)	0,18±0,03	0,16±0,04	0,18±0,04	0,18±0,02
Peróxido de hidrogênio (μM/g tecido)	2,01±0,19	1,95±0,46	1,61±0,65	2,14±0,39
Catalase (nmol/mg proteína)	2,16±0,30	3,50±0,81	3,71±0,49	3,87±0,69*
Superóxido dismutase (USOD/mg proteína)	6,99±0,25	9,73±1,18	9,79±0,90	8,92±1,46

Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * p < 0,05 vs. OS.

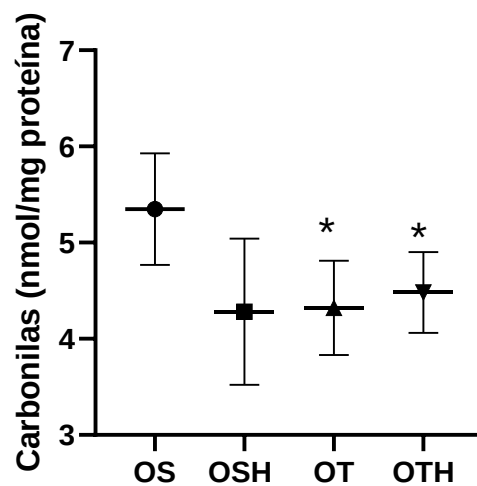


Figura 14. Proteínas oxidadas (Carbonilas) em tecido renal nos grupos estudados
Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS.

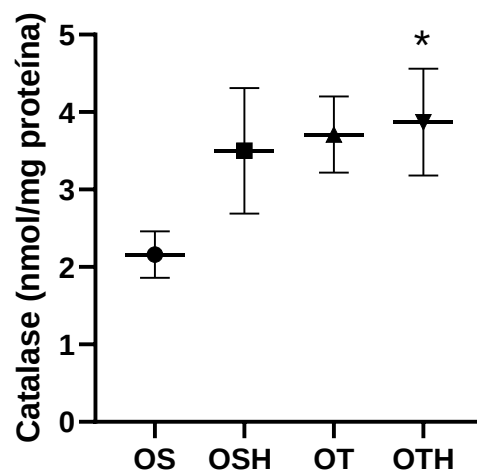


Figura 15. Atividade da enzima catalase em tecido renal nos grupos estudados
Valores representam média±desvio padrão. OS - Ooforectomizadas Sedentárias; OSH - Ooforectomizadas Sedentárias Tratadas com Hidroclorotiazida; OT - Ooforectomizadas Treinadas; OTH - Ooforectomizadas Treinadas tratadas com Hidroclorotiazida. * $p < 0,05$ vs. OS.

5. DISCUSSÃO

Apesar de haver muitos estudos clínicos e experimentais evidenciando os benefícios do treinamento físico aeróbico (TFA) associado a terapias medicamentosas, ainda há dúvidas na literatura se a associação dos efeitos dos tratamentos farmacológicos com o treinamento físico combinado (TFC), seguindo as recomendações de diferentes *guidelines*, resulta em benefícios para a população hipertensa. Neste sentido, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos do TFC associado ao tratamento com hidroclorotiazida sobre a VPA e em parâmetros morfofuncionais, inflamatórios e de estresse oxidativo renais. Os principais resultados demonstraram que na capacidade funcional os grupos treinados (OT e OTH) apresentaram aumento em seu desempenho quando comparados com o grupo de sedentárias (OS) no teste em esteira, e o grupo treinado + hidroclorotiazida (OTH) apresentou um aumento adicional no teste de carga máxima em escada. Nos parâmetros hemodinâmicos, os grupos OSH, OT e OTH apresentaram menores valores de PAS quando comparados com o grupo OS. Em adição, a partir da comparação dos grupos OS e OSH pode-se verificar que a associação das terapias (grupo OTH) promoveu redução da variância da PAS e da modulação simpática vasomotora. Nas avaliações de função renal, os grupos tratados com hidroclorotiazida (OSH e OTH) apresentaram redução da creatina plasmática e aumento no *clerance* de creatinina quando comparados com o grupo OS. Houve redução dos campos com fibrose túbulo-intersticial grave (51-100%) nos grupos tratados em relação ao grupo OS, assim como redução dos campos com fibrose moderada (25-50%) somente no grupo associação (OTH) quando comparado ao grupo OS. Nos mediadores inflamatórios em tecido renal, os grupos treinados apresentaram valores reduzidos de TNF-alfa e o grupo OTH apresentou aumento na IL-10 e na razão IL10/TNF-alfa quando comparados com os outros grupos. Já em parâmetros de estresse oxidativo renal os grupos treinados apresentaram redução de proteínas oxidadas (carbonilas) e a combinação do treinamento físico com hidroclorotiazida (grupo OTH) promoveu um aumento da atividade da catalase quando comparados com o grupo OS.

Vale destacar que a combinação de tratamento farmacológico e treinamento físico foi explorada neste estudo, através de um modelo

experimental de hipertensão e privação hormonal ovariana, simulando a condição de pós-menopausa no sexo feminino, população com maior prevalência de HAS, com o intuito de investigar principalmente se o TFC poderia modular mecanismos relacionados à fisiopatologia da HAS. Os principais resultados demonstraram que na capacidade funcional os grupos treinados (OT e OTH) apresentaram aumento em seu desempenho quando comparados com o grupo de sedentárias (OS) no teste em esteira, e o grupo treinado + hidroclorotiazida (OTH) apresentou um aumento adicional no teste de carga máxima em escada.

Segundo a recente diretriz para manejo de PA elevada em adultos ⁽²⁷⁾, preconiza-se que o tratamento inicial anti-hipertensivo deva incluir um diurético tiazídico (DT), um bloqueador dos canais de cálcio (BCC), e um inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA) ou bloqueador dos receptores da angiotensina (BRA) ⁽²⁷⁾.

Os principais medicamentos indicados para controle da PA, entre os quais a hidroclorotiazida, tem demonstrado capacidade de reduzir a PA, com grau de recomendação I e níveis de evidências que comprovam a redução de mortalidade. A hidroclorotiazida tem como mecanismo de ação a inibição da reabsorção de cloreto de sódio (NaCl) no néfron renal, especificamente no túbulo contorcido distal e age aumentando a reabsorção de cálcio resultando em uma maior quantidade de íons Na^+ e Cl^- excretados pelo rim ^(28,29).

Levando em consideração os efeitos adversos da HAS nos rins, com pouca aderência de tratamento e com alto índice na população mundial, é de extrema importância compreender as adaptações nas terapias recomendadas pelas diretrizes nacionais e internacionais ⁽⁸⁶⁾.

Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, cujo objetivo foi investigar os efeitos do TFA ou do treinamento físico resistido (TFR) no controle autonômico e danos oxidativos renais, observou-se que ambos os tipos de treinamento físico demonstraram ser eficazes na redução do estresse oxidativo nos tecidos cardíaco e renal associado a melhora do controle autonômico da circulação em ratas ooforectomizadas com síndrome metabólica ⁽⁷⁷⁾. Além disso, Da Palma et al. (2016) demonstraram que não apenas o TFA de intensidade moderada como também o TFR dinâmico de intensidade moderada reduziu a

PA em ratas hipertensas ooforectomizadas, além de induzirem atenuação nas disfunções autonômicas associadas à melhora do perfil de estresse oxidativo cardíaco ⁽⁷⁸⁾. Os resultados obtidos na presente pesquisa sugerem que a associação de TFC e tratamento farmacológico pode promover mais benefícios cardiorrenais adicionais em ratas pós-menopausa do que as terapias isoladas, sugerindo assim um importante papel da combinação dessas terapias.

Na literatura não há dúvidas que os diuréticos tiazídicos tem um papel importante no controle da PA e, conseqüentemente, na redução da mortalidade. Em pacientes tratados com hidroclorotiazida parece haver uma melhora em relação a sensibilidade barorreflexa e diminuição da VPA, além disso essas melhoras estão relacionadas com redução da lesão em órgãos alvos como os rins. Assim, como era esperado, os animais tratados com hidroclorotiazida no presente estudo apresentaram redução da PAS, melhora nos aspectos morfofuncionais renais, como aumento da *clearance* de creatinina e menores incidências de áreas com fibrose túbulo intersticial, sendo essas alterações acompanhadas também de menor variância da PAS e da modulação simpática vascular. Em adição, o TFC associado a hidroclorotiazida promoveu melhor controle de parâmetros autonômicos, importantes indicativos de melhora da VPA no modelo experimental considerado, que associa hipertensão e menopausa. Vale ressaltar que a VPA é um índice diretamente relacionado ao risco de mortalidade por doenças cardiovasculares e lesões de órgãos alvos como os rins ⁽⁶³⁾.

De acordo com Shecaira et al. (2022) a disfunção autonômica cardiovascular, caracterizada por hiperatividade simpática, traz prejuízo na sensibilidade dos barorreceptores ou aumento da VPA, estando ou não associada a elevação da PA, e desempenha importante papel no desenvolvimento e progressão do dano renal. Além disso, evidências mais recentes sugerem que a disfunção autonômica modula a inflamação e conseqüentemente o estresse oxidativo em diferentes órgãos, incluindo os rins, favorecendo lesões nesse tecido e prejuízo em sua função ⁽⁸³⁾.

Diversos fatores fisiopatológicos, como a disfunção do SRAA, a hiperatividade do sistema nervoso simpático, a inflamação, o estresse oxidativo podem levar ao comprometimento, remodelamento e dano tecidual renal. Além

disso, disfunções nos mecanismos envolvidos na homeostase de sódio (Na^+) e consequentemente no controle volêmico, bem como no SRAA, sofrem influência de citocinas inflamatórias e das EROs⁽⁸⁷⁾. Neste sentido, a ativação do SRAA, por exemplo, promove um aumento sistêmico de EROs via NADPH oxidase, disfunção mitocondrial, redução de biodisponibilidade de NO e redução de enzimas antioxidantes⁽⁸⁸⁾.

Adicionalmente, mecanismos autonômicos, como a redução da sensibilidade barorreflexa, o aumento da atividade nervosa simpática e da variabilidade da pressão arterial associados ao aumento de inflamação e de estresse oxidativo podem levar a alterações morfofuncionais renais e a doença renal crônica. Por outro lado, vale destacar que a ativação da via anti-inflamatória colinérgica está associada a aumento da atividade vagal e inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, podendo atenuar o dano renal⁽⁸³⁾.

O aumento do tônus simpático é capaz de alterar a hemodinâmica renal levando a danos teciduais que como consequência levam a infiltração inflamatória, através das liberações de citocinas e de EROs, que contribui para a manutenção da HAS por aumentar a absorção renal de Na^+ e resistência vascular renal, em adição evidências têm demonstrado aumento de infiltração de células mononucleares em diferentes compartimentos do tecido renal em pacientes hipertensos e em diferentes modelos experimentais de HAS⁽⁸⁴⁾.

No presente estudo, nos mediadores inflamatórios em tecido renal, os grupos treinados apresentaram valores reduzidos de TNF-alfa e o grupo OTH apresentou aumento na IL-10 e na razão IL10/TNF-alfa quando comparado com os outros grupos. Além disso, no que tange aos parâmetros de estresse oxidativo renal, nossos resultados evidenciam que os grupos treinados apresentaram redução de dano oxidativo renal em proteínas oxidadas (carbonilas). Além disso, o grupo de associação de treinamento físico combinado e hidroclorotiazida OTH apresentou aumento da atividade da enzima antioxidante catalase em tecido renal quando comparado com o grupo OS.

Sabe-se na HAS existe um aumento exacerbado da atividade simpática renal, alterando a reabsorção tubular de água e sódio, o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular⁽⁸¹⁾.

Neste sentido, a redução da atividade nervosa simpática renal pode aumentar o ritmo de filtração glomerular e alterar a morfologia do rim, causando um aumento do clearance de creatinina e como consequência uma redução da creatinina plasmática ⁽⁸¹⁾. De fato, os grupos tratados com hidroclorotiazida demonstraram uma redução da modulação simpática vascular e uma diminuição da creatinina plasmática, que podem contribuir para a autorregulação do fluxo sanguíneo renal.

A fibrose túbulo intersticial está associada a doenças renais, sendo diretamente relacionada a processos inflamatórios ⁽⁹⁰⁾. Nossos resultados demonstraram que todos os tratamentos foram eficientes em reduzir as lesões graves (51-100%) em comparação ao grupo OS, e o grupo OTH apresentou aumento de campos com alterações leves (de 0 – 25%) em relação aos demais grupos e redução do número de campos com alteração moderada (26 – 50%) quando comparado a todos os demais grupos estudados, evidenciando que o TFC trouxe benefícios. Ainda considerando os resultados obtidos, a melhora da VPA observada no grupo OTH poderia estar associada a menor dano renal. De fato, nossos resultados parecem evidenciar melhora da função renal, provavelmente associada a melhor perfil anti-inflamatório e redox no grupo associação (OTH).

Por fim, a partir dos nossos resultados é possível hipotetizar uma relação entre as alterações autonômicas, a redução da PAS e os benefícios renais. Neste sentido, a melhora da VarPAS e a menor modulação simpática vascular associada à redução de inflamação sugerem participação do reflexo colinérgico anti-inflamatório ⁽⁸³⁾, impactando na redução de estresse oxidativo e dano renal e como consequência melhora da função renal no grupo de ratas hipertensas e menopausadas submetidas ao tratamento com hidroclotiazida e exercício físico.

Em conjunto, os resultados desta dissertação reforçam a importância de mulheres hipertensas na pós-menopausa adotarem um estilo de vida ativo associado ao tratamento farmacológico, visando os benefícios cardiorrenais dessa associação e consequente melhora da qualidade de vida.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados demonstraram que a combinação de hidroclorotiazida e TFC é mais eficaz do que o fármaco isolado em promover melhora da VPA, impactando em melhora em perfil inflamatório e redox em tecido renal, promovendo benefícios morfofuncionais renais adicionais (aumento do *clearance* de creatinina e redução da fibrose túbulo intersticial) em ratas hipertensas ooforectomizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The top 10 causes of death. World Health Organization. 2019. **Organização Mundial da Saúde**, 2019.
2. BARROSO, Weimar Kunz Sebba et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.
4. SULLIVAN, Jennifer C. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 4, p. R1220-R1226, 2008.
5. CASTRO, Tássia Lima Bernardino et al. Alteración de la función renal: prevalencia y factores asociados en pacientes de riesgo. **Revista Cuidarte**, v. 11, n. 2, 2020.
6. DUBEY, Raghvendra K. et al. Sex hormones and hypertension. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 3, p. 688-708, 2002.
7. BENJAMIN, Emelia J. et al. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67-e492, 2018
8. RAMAKRISHNAN, Gomathi. Changes in collateral blood flow and neuroprotective efficacy of transient aortic occlusion during acute ischemic stroke. 2014.
9. AIRES, Margarida de Mello. Fisiologia. In: Fisiologia. 2018. p. 1352-1352.
10. FERREIRA, Maycon Junior et al. Ovarian status modulates cardiovascular autonomic control and oxidative stress in target organs. **Biology of sex differences**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.
11. JEFFERS, Barrett W.; ZHOU, Duo. Relationship between visit-to-visit blood pressure variability (BPV) and kidney function in patients with hypertension. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, n. 4, p. 697-707, 2017.

12. NEVES, Precil Diego Miranda de Menezes et al. Inquérito brasileiro de diálise 2019. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 43, p. 217-227, 2021.
13. UDANI, Suneel; LAZICH, Ivana; BAKRIS, George L. Epidemiology of hypertensive kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 1, p. 11-21, 2011.
14. CAETANO, Edna Regina Silva Pereira; PRAXEDES, José Nery. Lesão renal na hipertensão essencial. 1998.
15. VITOLO, E. et al. Hormone replacement therapy, renal function and heart ultrasonographic parameters in postmenopausal women: an observational study. **International Journal of Clinical Practice**, v. 69, n. 6, p. 632-637, 2015.
16. VERBEECK, Roger K.; MUSUAMBA, Flora T. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction. **European journal of clinical pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 757-773, 2009.
17. JAMES, Paul A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **Jama**, v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.
18. EVERETT, Bethany; ZAJACOVA, Anna. Gender differences in hypertension and hypertension awareness among young adults. **Biodemography and social biology**, v. 61, n. 1, p. 1-17, 2015.
19. PARATI, Gianfranco; OCHOA, Juan E.; BILO, Grzegorz. Blood pressure variability, cardiovascular risk, and risk for renal disease progression. **Current hypertension reports**, v. 14, n. 5, p. 421-431, 2012.
20. BRUNET, Philippe et al. Does uremia cause vascular dysfunction. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 34, n. 4, p. 284-290, 2011.
21. TUMLIN, James A. et al. Cardiorenal syndrome type 4: insights on clinical presentation and pathophysiology from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). In: **ADQI Consensus on AKI**

Biomarkers and Cardioresenal Syndromes. Karger Publishers, 2013. p. 158-173.

22. IRIGOYEN, Maria-Cláudia et al. Hypertension, blood pressure variability, and target organ lesion. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 4, p. 1-13, 2016.

23. BERNARDES, Nathalia et al. Baroreflex impairment precedes cardiometabolic dysfunction in an experimental model of metabolic syndrome: role of inflammation and oxidative stress. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

24. KUĆMIERZ, Joanna et al. Molecular Interactions of Arterial Hypertension in Its Target Organs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9669, 2021.

25. TOUYZ, Rhian M. et al. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 36, n. 5, p. 659-670, 2020.

26. PINHEIRO, Lucas C.; OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H. Sources and effects of oxidative stress in hypertension. **Current Hypertension Reviews**, v. 16, n. 3, p. 166-180, 2020.

27. BARROSO, Weimar Kunz Sebba et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.

28. LAM, Y. W. et al. Principles of drug administration in renal insufficiency. **Clinical pharmacokinetics**, v. 32, n. 1, p. 30-57, 1997.

29. WILKE, Nancy A. et al. Energy expenditure during household tasks in women with coronary artery disease. **The American journal of cardiology**, v. 75, n. 10, p. 670-674, 1995.

30. JAMES, Paul A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **Jama**, v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014

31. NACI, Huseyin et al. How does exercise treatment compare with antihypertensive medications? A network meta-analysis of 391 randomised

controlled trials assessing exercise and medication effects on systolic blood pressure. **British journal of sports medicine**, v. 53, n. 14, p. 859-869, 2019.

32. DE SOUSA, Evitom Corrêa et al. Resistance training alone reduces systolic and diastolic blood pressure in prehypertensive and hypertensive individuals: meta-analysis. **Hypertension Research**, v. 40, n. 11, p. 927-931, 2017.

33. CORNELISSEN, Veronique A.; SMART, Neil A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American heart association**, v. 2, n. 1, p. e004473, 2013.

34. QIU, Zhenzhen et al. Physical exercise and patients with chronic renal failure: a meta-analysis. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

35. CONTI, Filipe Fernandes et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p. R1532-R1539, 2015.

36. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

37. BOVERIS, Alberto; CHANCE, Britton. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.

38. SHIMOJO, Guilherme Lemos et al. Combined aerobic and resistance exercise training improve hypertension associated with menopause. **Frontiers in physiology**, p. 1471, 2018.

39. MANRIQUE, Camila et al. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. **Medical Clinics of North America**, v. 93, n. 3, p. 569-582, 2009

40. IRIGOYEN, Maria-Cláudia et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998-1003, 2005.
41. ARGERI, Rogério et al. Sleep restriction during pregnancy and its effects on blood pressure and renal function among female offspring. **Physiological reports**, v. 4, n. 16, p. e12888, 2016
42. LLESUY, Susana F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori Journal**, v. 71, n. 3, p. 241-249, 1985
43. MARKLUND, Stefan L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. **FEBS letters**, v. 184, n. 2, p. 237-239, 1985.
44. D'AVILA, Kátia De Angelis Lobo et al. Exercise Reverses Peripheral Insulin Resistance in Trained L-NAME–Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 768-772, 1999.
45. PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.
46. DA SILVA DIAS, Danielle et al. Exercise training initiated at old stage of lifespan attenuates aging-and ovariectomy-induced cardiac and renal oxidative stress: role of baroreflex. **Experimental gerontology**, v. 124, p. 110635, 2019
47. REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. [38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1994. p. 357-363.
48. SANTA-ROSA, F. A. et al. Impact of an active lifestyle on heart rate variability and oxidative stress markers in offspring of hypertensives. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

49. KUĆMIERZ, Joanna et al. Molecular Interactions of Arterial Hypertension in Its Target Organs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9669, 2021.
50. SVINGEN, Bruce A. et al. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 13, p. 5892-5899, 1979.
51. SHIMOJO, Guilherme Lemos et al. Combined aerobic and resistance exercise training improve hypertension associated with menopause. **Frontiers in physiology**, p. 1471, 2018
52. NOONE, Chris et al. Comparative efficacy of exercise and anti-hypertensive pharmacological interventions in reducing blood pressure in people with hypertension: a network meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 27, n. 3, p. 247-255, 2020.
53. YUSUF, Salim et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **The lancet**, v. 364, n. 9438, p. 937-952, 2004.
54. EYRE, Harmon et al. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3244-3255, 2004.
55. CHOI, A. M.; ALAM, Jawed. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 15, n. 1, p. 9-19, 1996.
56. SWAN, S. K.; BENNETT, W. M. Drug dosing guidelines in patients with renal failure. **Western journal of medicine**, v. 156, n. 6, p. 633, 1992.
57. LERMAN, Lilach O. et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 541-546, 2001.

58. KAPLAN, Norman M. **Kaplan's clinical hypertension**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
59. SILVA, Vanessa S. et al. Pleiotropic effects of statins may improve outcomes in atherosclerotic renovascular disease. **American journal of hypertension**, v. 21, n. 10, p. 1163-1168, 2008.
60. RAMAKRISHNAN, Gomathi. Changes in collateral blood flow and neuroprotective efficacy of transient aortic occlusion during acute ischemic stroke. 2014.
61. KEANE, William F. Lipids and the kidney. **Kidney international**, v. 46, n. 3, p. 910-920, 1994.
62. HELLSTROM, H. R. The altered homeostatic theory: A hypothesis proposed to be useful in understanding and preventing ischemic heart disease, hypertension, and diabetes—including reducing the risk of age and atherosclerosis. **Medical hypotheses**, v. 68, n. 2, p. 415-433, 2007
63. IRIGOYEN, Maria Claudia et al. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 1111-1116, 1995
64. MEZUE, Kenechukwu et al. Blood pressure variability predicts adverse events and cardiovascular outcomes in chronic kidney disease: a post-hoc analysis of the SPRINT trial. **American Journal of Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 48-52, 2018.
65. OKADA, Hiroshi et al. Visit-to-visit variability in systolic blood pressure is correlated with diabetic nephropathy and atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 155-159, 2012.
66. PU, D. et al. Metabolic syndrome in menopause and associated factors: a meta-analysis. **Climacteric**, v. 20, n. 6, p. 583-591, 2017.

67. POORTHUIS, Michiel HF et al. Female-and male-specific risk factors for stroke: a systematic review and meta-analysis. **JAMA neurology**, v. 74, n. 1, p. 75-81, 2017.
68. INGELSSON, Erik et al. Hysterectomy and risk of cardiovascular disease: a population-based cohort study. **European heart journal**, v. 32, n. 6, p. 745-750, 2011.
69. MUKA, Taulant et al. Association of vasomotor and other menopausal symptoms with risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157417, 2016.
70. DHANDE, Isha; ALI, Quaisar; HUSSAIN, Tahir. Proximal tubule angiotensin AT2 receptors mediate an anti-inflammatory response via interleukin-10: role in renoprotection in obese rats. **Hypertension**, v. 61, n. 6, p. 1218-1226, 2013.
71. GILLIS, Ellen E.; SULLIVAN, Jennifer C. Sex differences in hypertension: recent advances. **Hypertension**, v. 68, n. 6, p. 1322-1327, 2016.
72. DI GIOSIA, Paolo et al. Gender differences in epidemiology, pathophysiology, and treatment of hypertension. **Current atherosclerosis reports**, v. 20, n. 3, p. 1-7, 2018.
73. SERRANO JR, C. et al. Doença coronária aguda e insuficiência renal crônica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 3, p. 147-151, 2008.
74. TEXTOR, Stephen C. Renal arterial disease and hypertension. **Medical Clinics**, v. 101, n. 1, p. 65-79, 2017.
75. BENJAMIN, Emelia J. et al. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67-e492, 2018.
76. LIMA-POSADA, Ixchel; BOBADILLA, Norma A. Understanding the opposite effects of sex hormones in mediating renal injury. **Nephrology**, v. 26, n. 3, p. 217-226, 2021.

77. DE OLIVEIRA BRITO-MONZANI, J., Stoyell-Conti, F. F., Shecaira, T. P., Dos Santos Ferreira Silva, M. P., da Silva Dias, D., Bernardes, N., & De Angelis, K. (2021). Aerobic or resistance training improves autonomic control of circulation in oophorectomized rats with cardiometabolic dysfunctions: Impact on renal oxidative stress. **Experimental gerontology**, 145, 111181.
78. DA PALMA, R. K., Moraes-Silva, I. C., da Silva Dias, D., Shimojo, G. L., Conti, F. F., Bernardes, N., Barboza, C. A., Sanches, I. C., da Rosa Araújo, A. S., Irigoyen, M. C., & De Angelis, K. (2016). Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. **Journal of applied physiology** (Bethesda, Md.:1985), 121(4), 1032–1038.
79. FORMIGARI, Guilherme Pedron et al. Renal protection induced by physical exercise may be mediated by the irisin/AMPK axis in diabetic nephropathy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.
80. FEISTAUER, Mirela de Aparecida Velho et al. Associação entre interleucina-6 e doença renal crônica: uma revisão sistemática. **Revista de Ciências Médicas**, v. 26, n. 3, p. 107-116, 2017.
81. DIBONA, Gerald F. Physiology in perspective: the wisdom of the body. Neural control of the kidney. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 3, p. R633-R641, 2005.
82. CARLSTRÖM, Mattias; WILCOX, Christopher S.; ARENDSHORST, William J. Renal autoregulation in health and disease. **Physiological reviews**, v. 95, n. 2, p. 405-511, 2015.
83. SHECAIRA, T.P. et al. Disfunção autonômica cardiovascular & dano renal: papel da inflamação e do estresse oxidativo. 2022.
84. MATTSON DL. Immune mechanisms of salt-sensitive hypertension and renal end-organ damage. **Nat Rev Nephrol**. maio de 2019;15(5):290–300.

85. IRIGOYEN MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. **Hypertension**. dezembro de 1995;26(6 Pt 2):1111–6.
86. IRIGOYEN MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. **Hypertension**. dezembro de 1995;26(6 Pt 2):1111–6.
87. KUCMIERZ J, Frąk W, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Molecular Interactions of Arterial Hypertension in Its Target Organs. **Int J Mol Sci**. 7 de setembro de 2021;22(18):9669.
88. ARAUJO M, Wilcox CS. Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. **Antioxid Redox Signal**. 1;20(1):74-101.
89. PAVLOV VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. **Nat Rev Endocrinol**. 8(12):743–54.
90. ZHENG M, Cai J, Liu Z, Shu S, Wang Y, Tang C, et al. Nicotinamide reduces renal interstitial fibrosis by suppressing tubular injury and inflammation. **J Cell Mol Med**.23(6):3995–4004.

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do treinamento físico combinado associado ao tratamento farmacológico nas adaptações neuroimunes em modelo experimental de hipertensão e menopausa: papel do barorreflexo", protocolada sob o CEUA nº 7611290618, sob a responsabilidade de **Maycon Junior Ferreira e equipe; Amanda Aparecida de Araujo; Danielle da Silva Dias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 09/08/2018.

We certify that the proposal "Effects of combined exercise training associated with pharmacological treatment on neuroimmune adaptations in an experimental model of hypertension and menopause: role of baroreflex", utilizing Isogenic rats, protocol number CEUA 7611290618, under the responsibility of **Maycon Junior Ferreira and team; Amanda Aparecida de Araujo; Danielle da Silva Dias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 08/09/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018 a 12/2022**

Área: **Medicina Translacional/medicina**

Origem: **Biotério da UNINOVE**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 4 meses**

N: **---**

Linhagem: **SHR**

Peso: **100 a 200 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia do Exercício da UNIFESP.

São Paulo, 09 de agosto de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

ANEXO 2 – Emenda 1 aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 06 de junho de 2019
CEUA N 7611290618

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maycon Junior Ferreira
Área: Medicina Translacional/medicina

Título da proposta: "Efeitos do treinamento físico combinado associado ao tratamento farmacológico nas adaptações neuroimunes em modelo experimental de hipertensão e menopausa: papel do barorreflexo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 004377)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 27/maio/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Sabe-se que a prevalência de hipertensão arterial (HA) aumenta em mulheres após a menopausa comparado à fase de vida reprodutiva. Tem sido demonstrado uma íntima relação entre HA e o desenvolvimento de lesão em tecidos-avulsos, incluindo renal. A hiperatividade simpática, inflamação e estresse oxidativo, condições observadas na fisiopatologia da HA, favorecem o comprometimento tecidual renal, podendo, cronicamente, levar a um quadro de perda de função. Assim, o tratamento da HA é tido como fundamental para a redução dos riscos associados à progressão da HA. Associada ao uso de terapia farmacológica, a prática de exercício físico é medida recomendada por diretrizes, haja vista os benefícios já comprovados sobre os fatores de risco associados a HA bem como sobre a redução da pressão arterial. No entanto, a combinação e eficácia de ambas terapias anti-hipertensivas no manejo da HA e fatores de risco cardiovasculares em modelo experimental de menopausa ainda são escassos, sobretudo considerando os possíveis efeitos dos tratamentos, isolados ou combinados, sobre o tecido renal. Assim, solicitamos através desta emenda a inclusão da avaliação da função renal dos animais neste protocolo. A função renal será avaliada por meio de gaiola metabólica (GM). Os animais serão colocados em GM e será permitido o acesso livre a comida e água durante a coleta. Será mensurado o consumo de água de 24 horas e volume urinário. A urina será recolhida e centrifugada a 1000g (10 minutos) para remover partículas e o sobrenadante será guardado. Amostras de urina serão armazenadas (-20°C) para análise bioquímica (Cobas Integra 700 Roche, Suíça) de creatinina, proteinúria, uremia e osmolaridade. A urina de 24 horas será recolhida após a 8ª semana do protocolo. Amostras de plasma coletadas na eutanásia dos animais, já autorizadas no presente protocolo, serão utilizadas para análise de creatina e ureia. O clearance renal será calculado baseado na creatina urinária e plasmática e no volume urinário."

Comentário da CEUA: "EMENDA APROVADA Prezado Pesquisador, frente às justificativas enviadas a inclusão da avaliação da função renal dos animais foi aprovada."

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

ANEXO 3 – Emenda 2 aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 16 de dezembro de 2021
CEUA N [7611290618](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maycon Junior Ferreira
Área: Medicina Translacional/medicina

Título da proposta: "Efeitos do treinamento físico combinado associado ao tratamento farmacológico nas adaptações neuroimunes em modelo experimental de hipertensão e menopausa: papel do barorreflexo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 009175)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 15/dezembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos, gentilmente, a inclusão da aluna Pietra Petrica Neves na proposta de pesquisa que realizará análises em tecido renal, conforme emenda 01 previamente enviada e aprovada por esta comissão. Declaramos ainda não haver alterações na metodologia experimental para atendimento dessa inclusão.".

Comentário da CEUA: "APROVADO Emenda aprovada Pesquisador adicionado: Nome: Pietra Petrica Neves Vínculo: Aluno de pós-graduação Função: Colaborador".

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo