

O Enriquecimento Ambiental Promove Efeito Antioxidante no Bulbo Ventrolateral e Rins de Roedores com Hipertensão Renovascular

Environmental Enrichment Promotes Antioxidant Effect in the Ventrolateral Medulla and Kidney of Renovascular Hypertensive Rats

Luiz Eduardo Sousa,¹ Iuri Ferrari Del Favero, Frank Silva Bezerra,¹ Ana Beatriz Farias de Souza,¹ Andreia Carvalho Alzamora

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG – Brasil

Resumo

Fundamento: A hipertensão arterial é um precursor para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e renal e, além disso, está associada com o aumento dos marcadores oxidativos. O enriquecimento ambiental dos roedores melhora o desempenho em tarefas de memória, e também parece ter um efeito antioxidante sobre o hipocampo dos ratos normotensos.

Objetivos: Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre o estresse oxidativo no bulbo ventrolateral, coração, e rins de ratos com hipertensão renovascular.

Métodos: Quarenta ratos machos, tipo Fischer (6 semanas de idade), foram divididos em quatro grupos: normotensos em condições padrão (Sham-CP), normotensos em ambiente enriquecido (Sham-AE), hipertensos em condições padrão (2R1C-CP), e hipertensos em ambiente enriquecido (2R1C-AE). Os animais foram mantidos em gaiolas enriquecidas ou padrão durante quatro semanas e, por fim, todos os animais foram eutanasiados. O nível de significância foi $p < 0,05$.

Resultados: O grupo 2R1C-CP apresentou pressão arterial média maior (mmHg) 147,0 (122,0; 187,0) quando comparado com os grupos Sham-CP 101,0 (94,0; 109,0) e Sham-AE 106,0 (90,8; 117,8). Observou-se maior atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) ($49,1 \pm 7,9$ U/mg ptn) e da catalase ($0,8 \pm 0,4$ U/mg ptn) no bulbo ventrolateral do grupo 2R1C-AE, em relação à atividade da SOD ($24,1 \pm 9,8$ U/mg ptn) e da catalase ($0,3 \pm 0,1$ U/mg ptn) no grupo 2R1C-CP. No grupo 2R1C-AE, a oxidação lipídica no bulbo ventrolateral foi menor ($0,39 \pm 0,06$ nmol/mg ptn) quando comparado com o grupo 2R1C-CP ($0,53 \pm 0,22$ nmol/mg ptn). Ademais, foi observada maior atividade das enzimas superóxido dismutase nos rins dos animais 2R1C-AE ($11,9 \pm 2,3$ U/mg ptn) em relação aos animais 2R1C-CP ($9,1 \pm 2,3$ U/mg ptn).

Conclusão: O enriquecimento ambiental provocou efeito antioxidante no bulbo ventrolateral e nos rins, o que contribuiu para a redução do dano oxidante nos ratos hipertensos. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):905-912)

Palavras-chave: Ratos, hipertensão renovascular, estresse oxidativo, enriquecimento ambiental, medula ventrolateral, rins.

Abstract

Background: Arterial hypertension is a precursor to the development of heart and renal failure, furthermore is associated with elevated oxidative markers. Environmental enrichment of rodents increases performance in memory tasks, also appears to exert an antioxidant effect in the hippocampus of normotensive rats.

Objectives: Evaluate the effect of environmental enrichment on oxidative stress in the ventrolateral medulla, heart, and kidneys of renovascular hypertensive rats.

Methods: Forty male Fischer rats (6 weeks old) were divided into four groups: normotensive standard condition (Sham-St), normotensive enriched environment (Sham-EE), hypertensive standard condition (2K1C-St), and hypertensive enriched environment (2K1C-EE). Animals were kept in enriched or standard cages for four weeks after all animals were euthanized. The level of significance was at $p < 0.05$.

Results: 2K1C-St group presented higher mean arterial pressure (mmHg) 147.0 (122.0; 187.0) compared to Sham-St 101.0 (94.0; 109.0) and Sham-EE 106.0 (90.8; 117.8). Ventrolateral medulla from 2K1C-EE had higher superoxide dismutase (SOD) (49.1 ± 7.9 U/mg ptn) and catalase activity (0.8 ± 0.4 U/mg ptn) compared to SOD (24.1 ± 9.8 U/mg ptn) and catalase activity (0.3 ± 0.1 U/mg ptn) in 2K1C-St. 2K1C-EE presented lower lipid oxidation (0.39 ± 0.06 nmol/mg ptn) than 2K1C-St (0.53 ± 0.22 nmol/mg ptn) in ventrolateral medulla. Furthermore, the kidneys of 2K1C-EE (11.9 ± 2.3 U/mg ptn) animals presented higher superoxide-dismutase activity than those of 2K1C-St animals (9.1 ± 2.3 U/mg ptn).

Conclusion: Environmental enrichment induced an antioxidant effect in the ventrolateral medulla and kidneys that contributes to reducing oxidative damage among hypertensive rats. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):905-912)

Keywords: Renovascular Hypertension; Oxidative Stress; Environmental Enrichment; Ventrolateral Medulla; Kidney.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Luiz Eduardo Sousa •

Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário s/n, CEP 35400-000. Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG – Brasil

Email: luizeduardo@ufop.edu.br

Artigo recebido em 31/08/2018, revisado em 14/12/2018, aceito em 13/02/2019.

DOI: 10.5935/abc.20190166

Introdução

A hipertensão arterial é um precursor chave para o desenvolvimento de AVC, insuficiência renal, insuficiência cardíaca, disfunção endotelial e doença cardiovascular. O estresse oxidativo tem sido relacionado na patogênese da hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares.^{1,2} O desequilíbrio decorrente do excesso de compostos oxidantes, atrelado à diminuição das defesas antioxidantes, resulta em danos celulares.¹ Nos ratos hipertensos, o estresse oxidativo está relacionado à disfunção do coração, dos rins, e do cérebro.³⁻⁵ Além disso, as espécies reativas de oxigênio (EROs) no bulbo ventrolateral são os principais fatores para a hiperatividade simpática e hipertensão arterial.^{4,6}

O tronco cerebral contém estruturas complexas que controlam a pressão arterial e o reflexo cardiovascular.^{7,8} Essas regiões incluem a área pressora caudal, o bulbo caudal ventrolateral (CVLM), e a área pressora bulbo-cervical.^{7,9} A inibição e ativação desses núcleos causam repostas depressoras e pressoras, respectivamente. A face rostroventrolateral do bulbo (RVLM) é uma área importante do tônus simpático basal, sob regulação dos neurônios do CVLM através da inibição tônica e fásica.⁹ Estudos com ratos mostram que a hipertensão está associada com defesas antioxidantes mais baixas e aumento dos marcadores oxidativos, tanto no CVLM quando na RVLM.^{3,4,6,10}

Além do sistema nervoso central, o coração e os rins também estão envolvidos no controle cardiovascular.⁵ Quando a hipertensão arterial se desenvolve nos ratos com hipertensão renovascular, observa-se um desequilíbrio redox em ambos os órgãos, acompanhado de um aumento na contagem de células inflamatórias, peroxidação lipídica, e diminuição das defesas antioxidantes.⁵

O sedentarismo é um fator de risco para as doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial.¹¹ A atividade física melhora as defesas antioxidantes do bulbo ventrolateral e, dessa forma, reduz o dano oxidativo e a hipertensão.^{3,12,13} Uma maneira de aumentar a atividade motora nos animais de laboratório é através do enriquecimento ambiental. Os animais em ambientes enriquecidos apresentam mudanças neuroanômicas, químicas, e comportamentais que aumentam a memória, a função motora, as atividades sensoriais e cognitivas.¹⁴⁻¹⁶ Conseqüentemente, a neuroplasticidade aumenta, ao passo que os distúrbios neurodegenerativos e o declínio cognitivo são minimizados. O enriquecimento ambiental de roedores seguramente aumenta seu desempenho no aprendizado e nas tarefas de memória, além de melhorar a saúde e bem-estar gerais, quando comparados com animais da mesma espécie alojados da maneira tradicional.^{14,17,18} Esse enriquecimento inclui tipicamente a introdução de estímulos, tais como brinquedos, tubos, bolas, iglus, rodas para correr, ou quaisquer itens que estimulem a exploração, a interação social, as atividades sensorial e motora.

Os enriquecimentos ambientais não motores (por exemplo, sem a roda para correr) também parece ter um efeito antioxidante no hipocampo e no córtex cerebral de ratos normotensos.^{15,16} Assim sendo, o enriquecimento ambiental pode reduzir o estresse oxidativo no bulbo ventrolateral e contribuir para o controle da hipertensão. Todavia, apesar dos efeitos observados sobre a atividade cognitiva, não há

dados consistentes disponíveis sobre a maneira exata através da qual o enriquecimento influencia o estresse oxidativo no bulbo ventrolateral dos animais hipertensos. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre o estresse oxidativo no bulbo ventrolateral, coração, e rins de ratos com hipertensão renovascular.

Métodos

Experimentos com animais

Todos os experimentos com animais do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto sob o número de protocolo 2016/24. Serviram como sujeitos quarenta ratos machos adultos, tipo Fischer (6 semanas de idade; 140–170 g). A hipertensão renovascular foi induzida como descrito anteriormente.¹⁹ Resumidamente, os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina (IP). Em seguida, um clipe de prata (2R1C; diâmetro interno = 0,2mm) foi implantado na artéria renal esquerda através de incisão mediana. Os grupos normotensos (Sham) foram submetidos a procedimentos semelhantes, porém sem implantação do clipe. Quatro grupos foram formados: hipertensos mantidos em condições padrão (2R1C-CP) (n = 12), hipertensos em ambiente enriquecido (2R1C-AE) (n = 8), normotensos mantidos em condições padrão (Sham-CP) (n = 7), e normotensos em ambiente enriquecido (Sham-AE) (n = 13). O tamanho da amostra foi definido por conveniência.

Protocolo do ambiente enriquecido e condições padrão

Imediatamente após a cirurgia, os ratos foram alojados em gaiolas com ambiente enriquecido (AE) ou sob condições padrão (CP) (Figura 1). O primeiro continha seis objetos diferentes (bolas coloridas de plástico, iglu, palitos mastigáveis de madeira, tubos labirinto, tubos retos); as gaiolas foram organizadas com quatro ratos cada. Oito combinações diferentes de objetos foram usadas, com mudanças semanais para estimular a exploração. O ambiente controle consistia de gaiolas padrão (CP) idênticas àquelas usadas para alojar os sujeitos durante o período não-experimental. Todos os grupos foram mantidos na mesma sala, em prateleiras diferentes, para controlar a iluminação (ciclos de 12h de luz e 12h de escuridão), a temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade, e ruído ambiente. Ração e água de torneira foram fornecidas ad libitum. O procedimento de enriquecimento durou quatro semanas. Ao final desse período, as medições cardiovasculares foram realizadas.

Medições cardiovasculares

Ao longo dos 2 últimos dias do experimento, os ratos foram anestesiados com uretano (1,2 g/kg de peso corporal, ip; Sigma-Aldrich, EUA). Cateteres de polietileno (PE-10 conectados PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA), preenchidos com solução salina heparinizada (400 UI/mL), foram introduzidos na artéria femoral direita para medir a pressão arterial pulsátil. A pressão arterial foi registrada com frequência de amostragem de 1000 Hz e uma janela de digitalização de 20 mV de amplitude. A frequência cardíaca e a pressão arterial média

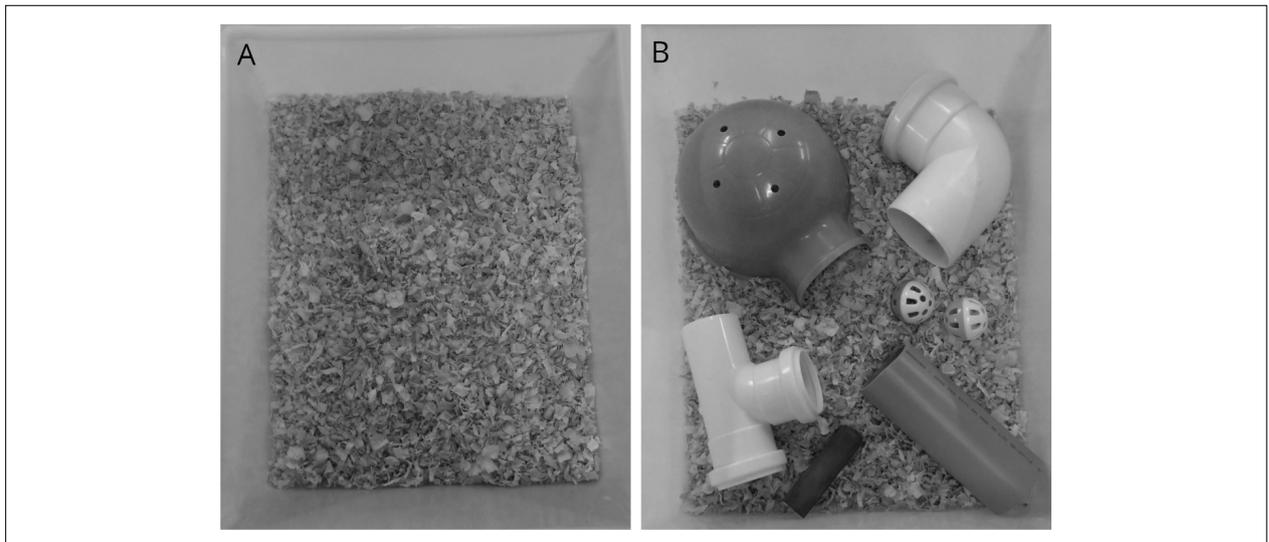


Figura 1 – Representação dos ambientes aos quais os ratos foram expostos (A) gaiola padrão (B) gaiola enriquecida.

(PAM) foram derivadas em tempo real a partir do sinal da pressão arterial pulsátil utilizando o software LabChart for Windows (ADInstruments Pty Ltd, Austrália). Os protocolos experimentais foram conduzidos em animais anestesiados. Após as medições cardiovasculares, os ratos foram decapitados e o ventrículo esquerdo foi perfundido com solução salina para remover o sangue dos tecidos. O cérebro, os corações, os rins e o bulbo ventrolateral foram dissecados, e todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C .

As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada através da capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol (absorbância de 570 nm).²⁰ A atividade da catalase foi determinada através da velocidade com que o H_2O_2 foi reduzido (absorbância of 240 nm).²¹ Os métodos de determinação de proteína carbonilada (absorbância de 370 nm) foram baseados em publicações anteriores.^{22,23} A peroxidação lipídica foi avaliada usando o método de ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (absorbância de 535 nm).²⁴ A proteína total foi quantificada usando o método Bradford.²⁵

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm DP ou mediana (valor mínimo-valor máximo). A normalidade foi testada por One-wat ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Os dados foram então analisados por ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc Newman-Keuls ou teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a pressão arterial média

Para avaliar se o enriquecimento ambiental reduz a pressão arterial nos ratos hipertensos, nós comparamos a PAM entre os quatro grupos experimentais. O grupo 2R1C-CP exibiu uma PAM significativamente maior 147,0 (122,0; 187,0) mmHg, $p < 0,05$, em comparação aos grupos Sham-CP 101,0 (94,0; 109,0) mmHg e Sham-AE 106,0 (90,8; 117,8) mmHg. A frequência cardíaca não foi significativamente diferente entre os quatro grupos (Figura 2).

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre marcadores de estresse oxidativo no bulbo ventrolateral

A atividade da superóxido dismutase no bulbo ventrolateral foi maior para o grupo 2R1C-AE em relação ao 2R1C-CP. Adicionalmente, a atividade da catalase foi maior no grupo 2R1C-AE do que em todos os outros grupos. Foi observado um aumento no valor de TBARS no grupo 2R1C-CP quando comparado com os grupos Sham, mas houve redução da atividade no grupo 2R1C-AE quando comparado com o 2R1C-CP (Tabela 1).

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre marcadores de estresse oxidativo no ventrículo esquerdo

De modo geral, a concentração de TBARS foi maior tanto nos grupos de hipertensos quanto nos grupos Sham. A atividade da catalase foi menor no grupo 2R1C-CP em relação ao Sham-AE. A proteína carbonilada e a SOD foram semelhantes entre todos os grupos experimentais (Tabela 2).

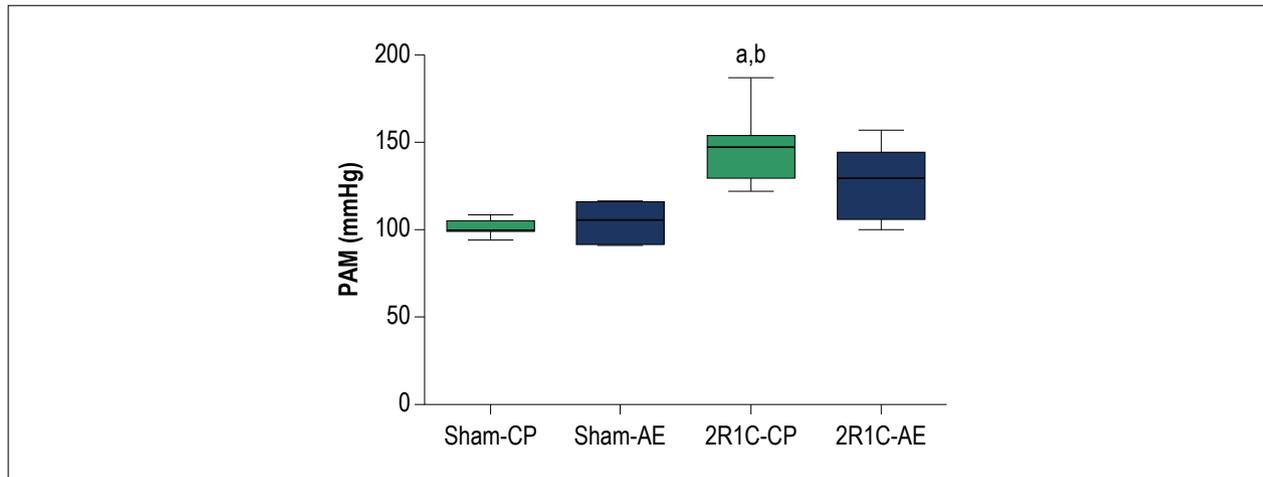


Figura 2 – Níveis basais da pressão arterial média (PAM, mmHg) nos ratos hipertensos (2R1C) e normotensos (Sham) submetidos ao enriquecimento ambiental (AE) e condições padrão (CP). Medidas diretas de PAM foram obtidas nas 4 semanas após a cirurgia 2R1C. As letras (por cima das barras) indicam diferenças significativas. (a) A diferença em relação ao grupo Sham-CP; (b) Diferença em relação ao grupo Sham-AE analisada através do teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n = 7$ em cada grupo). Os dados foram expressos como mediana (valor mínimo-valor máximo).

Tabela 1 – Efeitos do enriquecimento ambiental ou condições padrão sobre a atividade de enzimas antioxidantes e biomarcadores de dano oxidativo no bulbo ventrolateral.

	SOD (U/mg ptn)	Catalase (U/mg ptn)	Proteína carbonilada (nmol/mg ptn)	TBARS (nmol/mg ptn)
Sham-CP (n = 7)	32,9 ± 7,1	0,3 ± 0,04	22,1 ± 12,1	0,29 ± 0,12
Sham-AE (n = 13)	41,8 ± 11	0,4 ± 0,2	28,6 ± 11,9	0,36 ± 0,1
2R1C-CP (n = 12)	24,1 ± 9,8	0,3 ± 0,1	44,6 ± 15,1	0,53 ± 0,22 ^{a,b}
2R1C-AE (n = 8)	49,1 ± 7,9 ^c	0,8 ± 0,4 ^{a,b,c}	57,1 ± 12,5 ^{a,b}	0,39 ± 0,06 ^c

(a) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-CP; (b) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-AE; (c) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo 2R1C-CP. Análise feita com ANOVA de 1 via, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média ± DP ($n = 7-13$ em cada grupo). Sham-CP: grupo de normotensos expostos a condições padrão; Sham-AE: grupo de normotensos expostos ao enriquecimento ambiental; 2R1C-CP: grupo de hipertensos expostos a condições padrão; 2R1C-AE: grupo de hipertensos expostos ao enriquecimento ambiental. SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 2 – Efeitos do enriquecimento ambiental ou condições padrão sobre a atividade de enzimas antioxidantes e biomarcadores de dano oxidativo no ventrículo esquerdo.

	SOD (U/mg ptn)	Catalase (U/mg ptn)	Proteína carbonilada (nmol/mg ptn)	TBARS (nmol/mg ptn)
Sham-CP (n = 7)	12,0 ± 2,9	0,3 ± 0,1	30,1 ± 18,1	0,3 ± 0,17
Sham-AE (n = 13)	12,6 ± 3,8	0,4 ± 0,14	30,1 ± 10,7	0,2 ± 0,14
2R1C-CP (n = 12)	9,9 ± 1,4	0,2 ± 0,09 ^b	37,2 ± 12,8	0,8 ± 0,07 ^{a,b}
2R1C-AE (n = 8)	12,1 ± 4,2	0,3 ± 0,11	48,2 ± 19	1,1 ± 0,2 ^{a,b}

(a) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-CP; (b) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-AE. Análise feita com ANOVA de 1 via, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média ± DP ($n = 7-13$ em cada grupo). Sham-CP: grupo de normotensos expostos a condições padrão; Sham-AE: grupo de normotensos expostos ao enriquecimento ambiental; 2R1C-CP: grupo de hipertensos expostos a condições padrão; 2R1C-AE: grupo de hipertensos expostos ao enriquecimento ambiental. SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre marcadores de estresse oxidativo no rim direito

Foi observado um aumento da atividade da SOD nos grupos em ambientes enriquecidos (2R1C-AE, Sham-AE) em comparação aos grupos padrão (2R1C-CP, Sham-CP). Foram observadas maior concentração de proteína carbonilada e menor concentração de TBARS no grupo 2R1C-AE, quando comparado com o 2R1C-CP (Tabela 3).

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre marcadores de estresse oxidativo no rim esquerdo

Além disso, a atividade da SOD foi maior no grupo 2R1C-AE em relação aos animais 2R1C-CP. A atividade da catalase foi menor nos grupos de hipertensos (2R1C-CP e 2R1C-AE) do que nos grupos Sham (Sham-CP e Sham-AE). Não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade da proteína carbonilada e à concentração de TBARS entre os grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 3 – Efeitos do enriquecimento ambiental ou condições padrão sobre a atividade de enzimas antioxidantes e biomarcadores de dano oxidativo no rim direito.

	SOD (U/mg ptn)	Catalase (U/mg ptn)	Proteína carbonilada (nmol/mg ptn)	TBARS (nM/mg ptn)
Sham-CP (n=7)	8,1 ± 2,5	1,8 ± 0,7	5,6 ± 2,1	0,3 ± 0,13
Sham-AE (n=13)	12 ± 3,5 ^a	1,9 ± 0,8	4,4 ± 1,9	0,3 ± 0,09
2R1C-CP (n=12)	9,1 ± 2,3	1,5 ± 0,34	3,1 ± 2	0,4 ± 0,18
2R1C-AE (n=8)	11,9 ± 2,3 ^c	2,4 ± 1,1	7,2 ± 2,9 ^c	0,1 ± 0,07 ^c

(a) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-CP; (c) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo 2R1C-CP. Análise feita com ANOVA de 1 via, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média ± DP ($n = 7-13$ em cada grupo). Sham-CP: grupo de normotensos expostos a condições padrão; Sham-AE: grupo de normotensos expostos ao enriquecimento ambiental; 2R1C-CP: grupo de hipertensos expostos a condições padrão; 2R1C-AE: grupo de hipertensos expostos ao enriquecimento ambiental. SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 4 – Efeitos do enriquecimento ambiental ou condições padrão sobre a atividade de enzimas antioxidantes e biomarcadores de dano oxidativo no rim esquerdo.

	SOD (U/mg ptn)	Catalase (U/mg ptn)	Proteína carbonilada (nmol/mg ptn)	TBARS (nM/mg ptn)
Sham-CP (n = 7)	14,1 ± 5,9	1,4 ± 0,5	24,9 ± 8,8	0,5 ± 0,19
Sham-AE (n = 13)	17,4 ± 8,7	1,5 ± 0,8	31,9 ± 11,9	0,4 ± 0,2
2R1C-CP (n = 12)	11,3 ± 2,2	0,1 ± 0,06 ^{ab}	25,9 ± 9,3	0,7 ± 0,3
2R1C-AE (n = 8)	23,5 ± 6,2 ^c	0,4 ± 0,2 ^{ab}	30,1 ± 8,1	0,4 ± 0,19

(a) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-CP; (b) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo Sham-AE; (c) representa uma diferença significativa entre os grupos quando comparados com o grupo 2R1C-CP. Análise feita com ANOVA de 1 via, seguida de pós-teste de Newman Keuls ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média ± DP ($n = 7-13$ em cada grupo). Sham-CP: grupo de normotensos expostos a condições padrão; Sham-AE: grupo de normotensos expostos ao enriquecimento ambiental; 2R1C-CP: grupo de hipertensos expostos a condições padrão; 2R1C-AE: grupo de hipertensos expostos ao enriquecimento ambiental. SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Discussão

Assim como em outros estudos, foram observadas diferenças nos valores de PAM registrados entre os ratos hipertensos mantidos em gaiolas padrão e os controles normotensos mantidos em gaiolas padrão. É importante destacar que este estudo é o primeiro a demonstrar valores semelhantes de PAM entre ratos normotensos e ratos hipertensos em ambientes enriquecidos. Este resultado provavelmente se deve ao efeito antioxidante do enriquecimento sobre o bulbo ventrolateral e os rins. O fato de maiores valores de PAM terem sido observados em ratos hipertensos (2R1C-CP) em comparação aos animais do grupo controle (Sham-CP) é consistente com dados obtidos em outros estudos.^{3,5}

O modelo experimental de hipertensão de Goldblatt tipo 2 rins 1 clipe (2R1C) é caracterizado pela hiperatividade do sistema renina-angiotensina, principalmente pela angiotensina II. A angiotensina II ativa os receptores AT₁ para aumentar a pressão arterial através de vários mecanismos (inclusive a vasoconstrição, o estresse oxidativo) e aumenta a descarga simpática neural. Além desse sistema circulatório clássico, os componentes do sistema renina-angiotensina também são encontrados no cérebro. Os receptores AT₁ da angiotensina II são abundantes no sistema nervoso autônomo e nas regiões regulatórias do cérebro, a fim de influenciar a neurotransmissão e a pressão arterial. As ações da angiotensina II no bulbo ventrolateral contribuem para a simpatoexcitação e a hipertensão nos animais, em parte, através da estimulação do estresse oxidativo.²⁶

O presente estudo mostrou que o enriquecimento conseguiu aproximar a PAM dos ratos 2R1C-AE e a PAM dos ratos sham. Além disso, o enriquecimento recuperou os componentes das EROs no bulbo ventrolateral, rim e ventrículo esquerdo. Estudos anteriores mostraram uma hiperatividade da Ang II, tanto na RVLM^{27,28} quanto no CVLM^{9,29} do bulbo ventrolateral dos ratos 2R1C. Além disso, a Ang II tem sido correlacionada com as EROs nessas áreas do cérebro.³⁰ Por outro lado, a Ang II é um potente indutor da produção de EROs no ventrículo e no rim.^{31,32}

Os compostos antioxidantes são essenciais para a proteção dos sistemas cardiovascular e nervoso. Aqui, foi observada maior atividade da SOD e da catalase no bulbo ventrolateral dos ratos 2R1C-AE em relação aos ratos 2R1C-CP. Dessa forma, o enriquecimento ambiental parece ter um efeito protetor contra o estresse oxidativo através do aumento das defesas antioxidantes, reduzindo assim a PAM nos ratos hipertensos. O estudo mostrou que o aumento das defesas antioxidantes no bulbo ventrolateral diminui a PAM dos ratos hipertensos.⁶ Do mesmo modo, pesquisas anteriores mostraram que ratos espontaneamente hipertensos tiveram uma diminuição da atividade da SOD no RVLM, mas a PAM e a atividade nervosa simpática também diminuíram quando a SOD foi superexpressada.³³

A concentração de proteína carbonilada foi maior no bulbo ventrolateral dos ratos 2R1C-AE em relação aos grupos controle (Sham-CP e Sham-AE). Esse resultado surpreendente sugere que o enriquecimento ambiental ou foi

deletério para os ratos hipertensos, ou o bulbo ventrolateral é simplesmente menos capaz de lidar com a oxidação proteica, ainda que sob condições favoráveis. Do mesmo modo, um estudo anterior mostrou que o enriquecimento ambiental não reduz a oxidação proteica no córtex de ratos machos normotensos.¹⁶ Contudo, nós também demonstramos que o enriquecimento diminuiu a concentração de TBARS no bulbo ventrolateral dos ratos 2R1C, indicando que antioxidantes endógenos foram satisfatoriamente ativados para neutralizar a peroxidação lipídica. Esses resultados corroboram pesquisas anteriores em ratos normotensos.¹⁶ O estresse oxidativo no bulbo ventrolateral aumenta a atividade nervosa simpática, sugerindo que essa região do cérebro é importante para modular a elevação causada pelas EROs.²⁸

De modo geral, o enriquecimento ambiental parece exercer um efeito neuroprotetor através da melhora do estresse oxidativo, mas o mecanismo de neuroproteção ainda não foi estabelecido. O estresse oxidativo está envolvido na patogênese das doenças neurológicas agudas e crônicas. Isso ocorre porque o tecido nervoso é especialmente sensível ao estresse oxidativo, devido à grande quantidade de fontes de EROs.¹ Acredita-se que a síntese dos fatores tróficos desempenhem um papel na mediação dos efeitos neuroprotetores do enriquecimento. Constatou-se que o enriquecimento ambiental causa o aumento fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em células gliais, estriado e substância negra.³⁴ Desse modo, nós sugerimos que o enriquecimento ambiental não é relevante apenas para o envelhecimento do cérebro, demência e doenças neurodegenerativas, mas também para outros distúrbios neurológicos e doenças cardiovasculares.

O estresse oxidativo no coração é um agente causal importante de hipertensão, ativando a sinalização intracelular que induz à disfunção cardíaca através da apoptose ou do crescimento celular excessivo.^{10,35} Nós observamos níveis maiores de TBARS no ventrículo esquerdo e menor atividade da catalase nos ratos 2R1C-CT do que nos ratos Sham (CP e AE). Em consonância com nossos resultados, os ratos sedentários 2R1C mostraram níveis mais altos de TBARS no ventrículo esquerdo. Em geral, espera-se que a hipertensão renovascular aumente o peso relativo do coração, diâmetro de cardiomiócitos, contagem de células inflamatórias do miocárdio, e a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo.⁵

O enriquecimento não pareceu alterar a PAM, TBARS, e as defesas antioxidantes gerais no ventrículo esquerdo dos ratos hipertensos.^{36,37} Levantamos a hipótese de que o enriquecimento ambiental deveria incluir atividade física (p.e. rodas para correr) para que os efeitos antioxidantes possam ser observados no coração de ratos hipertensos. Vários estudos que examinaram a hipertensão e as doenças cardiovasculares demonstraram que a atividade física confere efeitos antioxidantes ao coração.^{5,38,39}

Nós também observamos o aumento da atividade da SOD nos rins dos ratos hipertensos em ambientes enriquecidos e dos ratos normotensos. Além disso, a atividade da catalase no rim esquerdo diminuiu nos ratos hipertensos (2R1C-CP e 2R1C-AE) em relação ao grupo controle, provavelmente por se tratar do rim clipado. Esses dados sugerem que o estresse oxidativo aumentou nos rins de animais hipertensos.⁵

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona causa o aumento da produção de EROs no rim através de muitas rotas, incluindo o aumento na atividade da NADPH oxidase, disfunção mitocondrial, diminuição da disponibilidade de NO, e redução das enzimas atioxidantes. Assim, a alta produção de EROs em resposta à ANG II está implicada no desenvolvimento da hipertensão entre os vários modelos animais, incluindo os ratos 2R1C.^{40,41}

A atividade da catalase e da superóxido dismutase (SOD) diminui no córtex dos rins clipado e não clipado de porcos 2R1C. De modo semelhante, o PGF2-alfa-8-isoprostano e a excreção de malondialdeído aumentam nos rins dos ratos 2R1C.^{40,42} O aumento da produção de EROs, induzido por infusão de angiotensina II nos rins, pode desencadear a hipertensão. A atividade da SOD protege o rim contra o estresse através da diminuição da expressão renal de p22phox, ativação da NADPH oxidase.⁴³ Além disso, a superexpressão de SOD no rim minimiza o estresse oxidativo e a hipertensão. A transferência de genes adenovirais da SOD3 humana em ratos espontaneamente hipertensos aumentou a expressão de SOD3 nos rins e vasos sanguíneos, reduzindo, assim, o O₂^{•-} vascular, ao mesmo tempo que melhorou a função endotelial e a reatividade vascular.⁴⁴

As modificações nos modelos de gaiola-padrão, visando a criação de ambientes que favoreçam a atividade motora, a atividade visual, a exploração e as interações sociais, vêm sendo associadas a mudanças comportamentais significativas e melhora na saúde e bem-estar gerais.⁴⁵ A saúde e o bem-estar gerais estão associados a níveis mais baixos de cortisol e pressão arterial; entretanto, poucos estudos demonstraram seu efeito sobre o sistema redox nos animais hipertensos.⁴⁶

Conclusão

Os efeitos fisiológicos do enriquecimento ambiental são muitos, mas a melhora no bem-estar e nas propriedades cognitivas dos animais parece ser um benefício evidente.^{15,47} Nosso estudo apresenta limitações, uma vez que o ambiente laboratorial impõe várias restrições físicas e operacionais sobre os métodos e a dimensão do enriquecimento oferecido para os ratos incluídos na pesquisa. Essas limitações estimulam nossa capacidade de usar métodos diferentes para favorecer ao máximo o enriquecimento ambiental. Apesar das limitações como um todo, nossos resultados indicam que o enriquecimento ambiental conferiu efeitos antioxidantes ao bulbo ventrolateral e aos rins, e provavelmente contribuiu para a reduzir a PAM e minimizar o dano oxidativo nos ratos com hipertensão renovascular. Nós sugerimos que o enriquecimento ambiental pode ter aproximado a PAM dos ratos 2R1C-AE e dos ratos SHAM através da redução dos níveis de estresse oxidativo no bulbo ventrolateral, rins e coração, provavelmente por ter reduzido os níveis de Ang II naqueles tecidos. No entanto, o efeito do enriquecimento ambiental sobre o sistema renina-angiotensina ainda não é conhecido. Não encontramos estudos que mostrassem a relação entre o ambiente enriquecido e o sistema renina-angiotensina nos ratos hipertensos. Certamente, novos estudos são necessários para esclarecer essa questão.

Agradecimentos

Frank Silva Bezerra gostaria de agradecer à CAPES, pela bolsa de pós-doutorado recebida (CAPES-PVEX- Processo no 88881.172437/2018-01), na Divisão de Pesquisa Interdepartamental de Medicina Intensiva, Hospital Saint Michael, Universidade de Toronto, Toronto, ON, Canadá.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise e interpretação dos dados, Análise estatística e Redação do manuscrito: Sousa LE; Obtenção de dados: Del Favero IF, Souza ABF; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Bezerra FS, Souza ABF, Alzamora AC.

Referências

1. Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, de Jong B, Jelinek HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res.* 2018 Feb 19;11:61-8.
2. Pinho RA, Araujo MC, Ghisi GL, Benetti M. [Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(4):549-55.
3. Sousa LE, Magalhaes WC, Bezerra FS, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Isoldi MC, et al. Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. *Free Radic Res.* 2015;49(11):1335-43.
4. Chan SH, Chan JY. Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(1):146-63.
5. Maia RC, Sousa LE, Santos RA, Silva ME, Lima WG, Campagnole-Santos MJ, et al. Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(11):1010-22.
6. de Castro UG, de Sousa GG, Machado RoP, Isoldi MC, Silva ME, Nadu AP, et al. Nitric oxide at the CVLM is involved in the attenuation of the reflex bradycardia in renovascular hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2012;26(2):118-25.
7. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994;74(2):323-64.
8. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(5):335-46.
9. Ghali MGZ. The brainstem network controlling blood pressure: an important role for pressor sites in the caudal medulla and cervical spinal cord. *J Hypertens.* 2017;35(10):1938-47.
10. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci.* 2013 Sept 18;20:69.
11. Buscemi S, Sprini D, Grosso G, Galvano F, Nicolucci A, Lucisano G, et al. Impact of lifestyle on metabolic syndrome in apparently healthy people. *Eat Weight Disord.* 2014.
12. Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med.* 2015.
13. Masson GS, Costa TS, Yshii L, Fernandes DC, Soares PP, Laurindo FR, et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One.* 2014;9(5):e94927.
14. Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology.* 2018;145(Pt A): 3-12.
15. Marmol F, Sanchez J, Torres MN, Chamizo VD. Environmental enrichment in the absence of wheel running produces beneficial behavioural and anti-oxidative effects in rats. *Behav Processes.* 2017 Nov;144:66-71.
16. Marmol F, Rodriguez CA, Sanchez J, Chamizo VD. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. *Brain Res.* 2015 Jul 10;1613:120-9.
17. Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L. Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J Neurobiol.* 1972;3(1):47-64.
18. Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem.* 2008;90(3):511-8.
19. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med.* 1934;59(3):347-79.
20. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469-74.
21. Abei H. Catalase in vitro. *METHODS IN ENZYMOLOGY.* 1984;105.
22. Chirico MTT, Bezerra FS, Guedes MR, Souza AB, Silva FC, Campos G, et al. Tobacco-Free Cigarette Smoke Exposure Induces Anxiety and Panic-Related Behaviours in Male Wistar Rats. *Sci Rep.* 2018;8(1):4943.
23. Reznick A, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl. *Method Enzymol.* 1994;233:357-63.
24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
26. Miller AJ, Arnold AC. The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clin Auton Res.* 2019;29(2):231-43.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto sob o número de protocolo 2016/24.

27. Govender MM, Nadar A. A subpressor dose of angiotensin II elevates blood pressure in a normotensive rat model by oxidative stress. *Physiol Res*. 2015;64(2):153-9.
28. Kishi T, Hirooka Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. *Front Physiol*. 2012;3:335.
29. Rodrigues MC, Campagnole-Santos MJ, Machado RP, Silva ME, Rocha JL, Ferreira PM, et al. Evidence for a role of AT(2) receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats. *Peptides*. 2007;28(7):1375-82.
30. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR. Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2013;26(7):858-65.
31. Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Herrmann J, Zhu X, Grande JP, Napoli C, et al. Antioxidant intervention blunts renal injury in experimental renovascular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(4):958-66.
32. Hartono SP, Knudsen BE, Zubair AS, Nath KA, Textor SJ, Lerman LO, et al. Redox signaling is an early event in the pathogenesis of renovascular hypertension. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):18640-56.
33. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2004;109(19):2357-62.
34. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(9):697-709.
35. Rashid K, Sinha K, Sil PC. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol*. 2013 Dec;62:584-600.
36. Azar TA, Sharp JL, Lawson DM. Effects of cage enrichment on heart rate, blood pressure, and activity of female Sprague-Dawley and spontaneously hypertensive rats at rest and after acute challenges. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(3):339-44.
37. Sharp J, Azar T, Lawson D. Effects of a cage enrichment program on heart rate, blood pressure, and activity of male sprague-dawley and spontaneously hypertensive rats monitored by radiotelemetry. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2005;44(2):32-40.
38. Purnomo Y, Piccart Y, Coenen T, Prihadi JS, Lijnen PJ. Oxidative stress and transforming growth factor- β 1-induced cardiac fibrosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2013;13(2):165-72.
39. Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Belló-Klein A, et al. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008;21(11):1188-93.
40. Welch WJ, Mendonca M, Aslam S, Wilcox CS. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):692-6.
41. Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, et al. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(1):R117-24.
42. Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):541-6.
43. Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, et al. Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension*. 2006;48(5):934-41.
44. Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res*. 2003;92(4):461-8.
45. Smith BL, Lyons CE, Correa FC, Benoit SC, Myers B, Solomon MB, et al. Behavioral and physiological consequences of enrichment loss in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2017 Mar;77:37-46.
46. Ryff CD, Singer BH, Dienberg Love G. Positive health: connecting well-being with biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1449):1383-94.
47. Wolfert DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Wurbel H. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature*. 2004;432(7019):821-2.

