CARLA ROCHA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO/FUNCIONALIDADE DE VIAS
NORADRENÉRGICAS ASCENDENTES AO
HIPOTÁLAMO: EFEITOS DA DESNERVAÇÃO
SINO-AÓRTICA E DO TREINAMENTO AERÓBIO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Humana do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

CARLA ROCHA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO/FUNCIONALIDADE DE VIAS
NORADRENÉRGICAS ASCENDENTES AO
HIPOTÁLAMO: EFEITOS DA DESNERVAÇÃO
SINO-AÓRTICA E DO TREINAMENTO AERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lisete Compagno Michelin

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Carla Rocha dos.

Expressão/funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: efeitos da desnervação sino-aórtica e do treinamento aeróbio / Carla Rocha dos Santos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia Cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Expression/activity of ascending noradrenergic pathways to the hypothalamus: effects of sinoaortic denervation and aerobic training.

1. Barorreceptores 2. Desnervação sino-aórtica 3. Cardiovascular
4. Controle autonômico 5. Treinamento aeróbio 6. Imuno-
histoquímica I. Michelini, Profa. Dra. Lisete Compagno II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0165/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carla Rocha dos Santos.

Título da Dissertação: Expressão/funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da desnervação sino-aórtica e do treinamento aeróbio .

Orientador(a): Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **141** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Lisete Compagno Michelin**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Expressão/Funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da desnervação sino-aórtica e do treinamento aeróbio"* do qual participam o(s) aluno(s) **Carla Rocha dos Santos, Thais Tessari Zampieri, Adriana Ruggeri, Sebastião Donato Silva Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **20.09.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

*DEDICO À MINHA FAMÍLIA, MINHA BASE PARA TUDO
E MEUS AMIGOS. OBRIGADA POR TODA MOTIVAÇÃO
PARA SEGUIR EM FRENTE.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Lisete Compagno Michelini, por ter acreditado em mim e me dado à oportunidade de trabalhar ao seu lado e acima tudo pela grande contribuição para minha formação, percebo o quanto evolui com seus ensinamentos, e o quanto mais posso evoluir.

Ao Alexandre Ceroni, técnico do laboratório, por toda ajuda com cirurgias e pelos ensinamentos. Obrigada!!!

Ao pessoal da Secretaria, José Maria e Biblioteca do ICB I, pelos valiosos auxílios recebidos.

Aos meus pais por todo apoio que sempre me deram. Nunca chegaria até aqui sem o incentivo de vocês. Muuuuito obrigada.

À FAPESP, pelo grande auxílio financeiro que propiciou a realização deste trabalho.

À Aninha, por toda ajuda na imuno-histoquímica, agradeço eternamente pelo carinho e disponibilidade.

Thaís, queridona mais que amada, sempre me ajudou desde a iniciação compartilhando seu grande conhecimento e dedicando ao meu trabalho, torço por ti sempre.

Adriana, mais que colega de trabalho nas montagens de lâmina, uma amiga que sempre me apoiou.

Ao Prof. Martin, por gentilmente disponibilizar seu laboratório e equipamento de microscopia, por todo auxílio dado, assim como seu aluno Leandro que muitas vezes esclareceu minhas dúvidas sobre a técnica.

A banca de qualificação por todas as dicas que melhoram esse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório: Junoca, Leila, Tereza, Tássia, Raul, Piero, Gustavo... por todas discussões científicas e muito mais por aquelas que não foram tão científicas assim, adoro todos vocês.

Aos meus amigos eternos Ariane, Théo, Priscila, Tatiana, Lucila, Patricia, Fernanda, meus psicólogos de plantão, sem ajuda de vocês seria muito difícil esse processo, obrigada por alegrarem minha vida. Amo todos.

Minha família, meu pai que sempre apoio minhas escolhas profissionais, muito obrigada pelo amor e compreensão. Minha mãe, a pessoa mais importante do meu mundo, sem palavras para agradecê-la, meu amor por você é incondicional. Meus irmão Carlos e Carina, sem esses chatos o mundo não seria tão legal... meus amores para vida toda.

À todos meus ratos, utilizados para estudos, nenhum dos meus resultados seria possível sem vocês, só eu sei o quanto foi difícil sacrificá-los, parte mais difícil desse trabalho.

Obrigada por tudo!!!!

***“Onde meus talentos e paixões encontram
as necessidades do mundo,
lá está meu caminho,
meu lugar.”***

Aristóteles

RESUMO

SANTOS, C. R. **Expressão/funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: efeitos da desnervação sino-aórtica e do treinamento aeróbio.** 2013.60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Descrevemos em trabalhos anteriores que o T determina alterações plásticas e funcionais na alça suprabulbar de modulação do controle autonômico, muitas delas mediadas pelos barorreceptores arteriais (Exp Physiol, 94:947, 2009; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 301:R958, 2011). No presente trabalho investigamos os efeitos do T e da SAD em vias NORérgicas ascendentes do NTS a áreas suprabulbares, assim como a evolução temporal da expressão de DBH, ocitocina (OT) e vasopressina (VP) em áreas de controle autonômico induzidas pelo T. Estes parâmetros foram avaliados em dois protocolos experimentais utilizando ratos normotensos (Wistar, 2 meses idade, ~250g): A - ratos submetidos à SAD ou cirurgia SHAM e treinados por 12 semanas; e B - ratos treinados por 8 semanas e utilizados para avaliação da sequencia temporal das adaptações autonômicas e cardiovasculares. Ambos os grupos foram submetidos ao T (50-60% da capacidade máxima de exercício, 5 dias/semana, 1h/dia) ou mantidos sedentários (S) por igual período de tempo. Nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 (Protocolo A) e 12 (Protocolo B) foram canulados para o registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais e das respostas cardiovasculares ao exercício dinâmico (Ex); foi também avaliada a sensibilidade barorreflexa (BrS, fenilefrina e nitroprussiato de sódio iv). Após os registros funcionais os ratos foram anestesiados e procedeu-se à remoção do encéfalo a fresco (perfusão com salina para obtenção de ‘punches’ do PVN, região dorsal e ventral do tronco encefálico) ou após perfusão com paraformaldeído (estudos de imunohistoquímica). Tecidos cerebrais a fresco foram processados para a expressão gênica de DBH, OT e VP (RT-PCR em tempo real, HPRT como gene de referência). Nos grupos intactos o T não alterava a PA, mas induzia bradicardia de repouso (-9% em T8, -13% em T12) e aumentava a sensibilidade barorreflexa (+24% e +34% para bradicardia e taquicardia reflexas, respectivamente). T também aumentou transitoriamente a expressão de DBH no NTS (2,6 vezes em T4), a qual ocorreu simultaneamente a aumentos marcantes da expressão de OT e VP no PVN (50- e 16-vezes, respectivamente); houve também aumento transitório na expressão de DBH no PVN (1,9 vezes em T2). Na ausência da atividade dos barorreceptores (SAD) o T não determinou aumento na expressão de DBH e a expressão de OT e VP no PVN foram praticamente zeradas. Nesta condição, também não observamos a bradicardia de repouso. Os experimentos de imunohistoquímica a serem realizados a seguir deverão confirmar as áreas envolvidas nesta modulação, bem como os presentes resultados. Em conjunto nossos dados sugerem que a atividade barorreflexa aumentada durante exercício repetitivo ativa, via neurônios NORérgicos ascendentes do NTS ao PVN, os neurônios pré-autonômicos OTérgicos e VPérgicos, os quais estão envolvidos com a modulação autonômica do controle cardiovascular, desencadeando as respostas benéficas ao treinamento aeróbio. Ressaltam também a importante participação das vias NORérgicas ascendentes em conectar as alças primária e secundária de modulação do controle cardiovascular.

Palavras-chave: Desnervação sino-aórtica. Treinamento aeróbio. Dopamina beta-hidroxilase.

ABSTRACT

SANTOS, C. R. **Expression/activity of ascending noradrenergic pathways to the hypothalamus: effects of sinoaortic denervation and aerobic training.** 2013. 60 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Our previous studies have shown that T determines plastic and functional changes in the suprabulbar modulatory loop of the autonomic control, which are mediated by the arterial baroreceptors (*Exp Physiol* 94:947, 2009; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:R958, 2011). In the present study we investigated the effects of T and SAD in NORergic ascending pathways from NTS to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) as well as time-course changes on dopamine β -hydroxylase (DBH), oxytocin (OT) and vasopressin (VP) in autonomic brain areas. Two experimental protocols were conducted in Wistar rats (2 months old, ~ 250g): A- 12 weeks of T after SAD or SHAM surgery; B- time course evaluation of T effects on cardiovascular and autonomic responses. Both groups of rats were trained (50-60% of maximal exercise capacity, 5 days/week, 1 h/day) or kept sedentary (S). At weeks 0, 1, 2, 4 and 8 (Protocol A) and 12 weeks (Protocol B) arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were recorded at rest and during dynamic exercise (Ex); baroreflex sensitivity was also evaluated (BrS, phenylephrine and sodium nitroprusside *iv*). After hemodynamic records, rats were deeply anesthetized for brain removal. Fresh (saline perfusion for punching the PVN and dorsal & ventral areas from hypothalamus and brain stem slices) and fixed tissues (paraformaldehyde for immunohistochemical studies) were obtained. Fresh brain tissues were processed by real-time PCR-RT for DBH, oxytocin (OT) and vasopressin (VP) gene expression (HPRT as the reporter gene). In intact rats T did not change MAP, but caused resting bradycardia (-9% at T8, -13% at T12) and increased BrS (+24% and +34% for reflex bradycardia and tachycardia, respectively). T caused transient increase in NTS DBH mRNA expression (2,6 fold at T4), which occurred simultaneously with increased OT and VP gene expression in the PVN (50- and 16-fold, respectively); there was also a transient increase in PVN DBH expression (1,9-fold at T2). In the absence of baroreceptors (SAD), T did not increase DBH expression, with a simultaneous complete blockade of OT and VP expression in the PVN. In SAD rats there was no resting bradycardia. Immunohistochemical analysis (next step) will confirm the areas involved in this modulation, as well as the present results. In summary, our results suggest that increased baroreflex activity during dynamic exercise activates ascending NORergic neurons projecting from NTS to PVN, which activate OTergic and VPergic pre-autonomic neurons involved in the modulation of autonomic cardiovascular control, therefore driving the beneficial effects of T. Data also shows the important role played by ascending NORergic pathways in connecting the bulbar and suprabulbar loops controlling cardiovascular system.

Keywords: Exercise training. Sino-aortic Desnervation. DBH. Hypothalamus. Brain-stem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares.....	14
Figura 2 - Ilustração da remoção dos barorreceptores.....	18
Figura 3 - Representação esquemática do protocolo de treinamento e sedentarismo incluindo período de adaptação, cirurgia e recuperação para os grupos SHAM & SAD....	19
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo de treinamento e sedentarismo incluindo período de adaptação para os grupos <i>Time course</i>	20
Figura 5 - Esquema ilustrando as regiões de interesse (DBS; VBS; PVN) de onde foram retirados tecidos para realização da técnica de RT-PCR.....	23
Figura 6 - Variação do desempenho em esteira (pós-cirurgia menos pré-cirurgia) nos grupos SAD e SHAM.....	29
Figura 7 - Evolução temporal do desempenho em esteira nos grupos SHAM e SAD durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	30
Figura 8 - Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM) basal nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	31
Figura 9 - Comparação dos valores de Frequência Cardíaca (FC) basal nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	32
Figura 10: Respostas de PAM ao exercício agudo (0,30 e 0,45 km/h) nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	32
Figura 11 - Respostas taquicárdicas ao exercício agudo (0,30 e 0,45 km/h) nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	33
Figura 12 - Sensibilidade média do reflexo barorreceptor cardíaco durante hipertensões e hipotensões transitórias nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	34
Figura 13 - Comparação da expressão de RNAm de dopamina beta-hidroxilase (DBH) no NTS dos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).....	35
Figura 14 - Comparação da expressão de RNAm de dopamina beta-hidroxilase (DBH) no PVN dos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).....	35
Figura 15 - Comparação da expressão gênica de ocitocina (OT mRNA, painel A) e vasopressina (VP mRNA, painel B) no PVN de ratos SHAM e SAD sedentários (S) e treinados (T).....	36

Figura 16 - Evolução temporal do desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	37
Figura 17 - Evolução temporal da PAM basal durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S).....	39
Figura 18 - Evolução temporal da FC basal durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S).....	39
Figura 19 - Alterações sequenciais das respostas de PAM ao exercício agudo nos grupos submetidos ao treinamento aeróbio.....	40
Figura 20 - Alterações sequenciais da resposta taquicárdica ao exercício agudo nos grupos submetidos ao treinamento aeróbio.....	40
Figura 21 - Evolução temporal da expressão de RNAm de DBH no NTS ao longo dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	41
Figura 22 - Evolução temporal da expressão de RNAm de DBH, OT e VP ao longo dos protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Grupos experimentais divididos por protocolo, tratamento (S ou T) e tempo experimental (0,1, 2, 4 e 8 semanas).....	21
Quadro 2 - Protocolo experimental para aquisição dos dados funcionais nos grupos SHAM & SAD. No protocolo <i>time course</i> , não foi realizado o teste do barorreflexo.....	22
Tabela 1 - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo antes e após as cirurgias SHAM e SAD.....	28
Tabela 2 - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 6, 12 e ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S).....	28
Tabela 3 - Valores absolutos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso nos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	31
Tabela 4 - Sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas nos grupos SHAM e SAD, treinados (T) ou mantidos sedentários (S).....	33
Tabela 5 - Comparação da expressão gênica (em unidades arbitrárias) de DBH no NTS e PVN e de OT e VP no PVN, nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).....	35
Tabela 6 - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima dos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento e sedentarismo.....	37
Tabela 7 - Valores basais e respostas de PAM e FC ao exercício dinâmico (0,4 km/h e 0,6 km/h) em ratos Wistar submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	38
Tabela 8 - Valores da expressão de RNAm de DBH, OT e VP no PVN e DBS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BVLc – Bulbo ventrolateral caudal	S – sedentário
BVLr - Bulbo ventrolateral rostral	SAD – Desnervação Sino-aórtica
cDNA – DNA complementar	SON – núcleo supraótico
DBS – bulbo dorsal	T – Treinamento aeróbio/ treinado
DBH – Dopamina beta-hidroxilase	VBS – bulbo ventral
DC – Débito cardíaco	VM – ventromedial
dc – <i>dorsal cap</i>	VP – vasopressina
DEPC - dietilpirocarbonato	VPérgico – vasopressinérgico
DMV - dorso motor do vago	
DNA – ácido desoxirribonucléico	
FC – frequência cardíaca	
FRET –“ Fluorescence Resonance Energy Transfer”	
GABA – ácido gamma-aminobutírico	
HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase	
IML – Coluna intermédio-lateral	
MG - magnocelular	
NA - núcleo ambíguo	
NORérgico – noradrenérgico	
NTS - núcleo do trato solitário	
OT - ocitocina	
OTérgico – ocitocinérgico	
PA – pressão arterial	
PB – “phosphate buffer”	
PBS – “phosphate buffered-saline”	
PCR – “polimerase chain reaction”	
PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo	
RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro	
RV – Retorno Venoso	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	17
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais Experimentais	24
3.2 Avaliação da capacidade aeróbio máxima dos animais	24
3.3 Desnervação sino-aórtica (SAD) ou cirurgia fictícia (SHAM)	25
3.4 Protocolo de treinamento Físico ou Sedentarismo	26
3.4.1 SHAM & SAD.....	26
3.4.2 Time Course.....	27
3.5 Grupos experimentais	28
3.6 Canulação arterial e registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais	28
3.7 Comprovação da desnervação sino-aórtica	29
3.8 Análise dos dados funcionais	30
3.9 Obtenção do tecido cerebral	30
3.9.1 Para quantificação do RNAm.....	30
3.9.2 Para análise de imuno-histoquímica.....	31
3.10 RT-PCR em tempo real.....	33
3.11 Imuno-histoquímica	34
3.12 Apresentação dos dados e análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Efeito do T prolongado (12 semanas) e SAD	36
4.1.1 Desempenho em esteira.....	36
4.1.2 Parâmetros hemodinâmicos	38
4.1.3 Expressão gênica deDBH, OT e VP em áreas de controle autonômico.....	42
4.2 Efeitos sequenciais do T aeróbio.....	44
4.2.1 Desempenho em esteira.....	44
4.2.2 Alterações dos parâmetros hemodinâmicos durante treinamento e sedentarismo	45
4.2.3 Sequência temporal de alteração da expressão gênica de DBH, OT e VP em áreas de controle autonômico	47
5 DISCUSSÃO	50

5.1 Efeitos benéficos treinamento	50
5.2 Efeitos da SAD.....	51
5.3 Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento	54
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Para a manutenção da homeostasia do corpo humano é necessário propiciar suprimento de sangue a todos tecidos com pressão e volume adequados conforme a necessidade momentânea. Para manter o fluxo sanguíneo em faixas adequadas nas mais diversas situações, o sistema cardiovascular é controlado por mecanismos locais, neurais e hormonais, que adéquam a perfusão tecidual tanto em situações fisiológicas, como o exercício físico, quanto em situações de patológicas, como a hipertensão arterial (MICHELINI, 2008). Ajustes instantâneos da pressão arterial (PA) são controlados por mecanismos neurais reflexos desencadeados por diferentes receptores periféricos que detectam as variações da PA (barorreceptores), da pressão parcial de oxigênio, de gás carbônico e pH sanguíneos (quimiorreceptores) e por receptores cardiopulmonares (CHALMERS; MICHELINI, 2001 e 2008; POLOWSKY, 1991; SVED ; GORDON, 1994).

Dentre os receptores periféricos destacam-se os barorreceptores arteriais, os mais importantes controladores a curto-prazo da PA (CHALMERS; MICHELINI, 1998, 2001, 2007 a; POLOWSKY, 1991; SVED; GORDON, 1994). As aferências dos barorreceptores são ativadas através do estiramento da aorta e do seio carotídeo (loais onde se situam os receptores) durante a sístole cardíaca. A magnitude da deformação arterial é quantificada pela frequência de disparo e integrada em áreas específicas do sistema nervoso central, promovendo ajustes autônomos através da ação simpática e parassimpática aos efetores cardiovasculares (MICHELINI, 2007 a; MICHELINI; MORRIS, 1999). As aferências periféricas projetam-se ao Núcleo do Trato Solitário (NTS), onde realizam a primeira conexão com o sistema nervoso central (DAMPNEY, 1994; MICHELINI, 2008). A partir do NTS neurônios excitatórios glutamatérgicos (SVED; ITO; MADDEN, 2000) projetam-se ao bulbo ventrolateral caudal (BVLc), onde fazem sinapse com neurônios inibitórios GABAérgicos (SCHREIHOFFER; GUYENET, 2002) que se direcionam ao bulbo ventrolateral rostral (BVLr). Nesta área estão localizados os neurônios pré- motores simpáticos responsáveis pela geração do tônus simpático ao coração e vasos de resistência e de capacitância (CHAN; SAWCHENKO, 1998; DAMPNEY, 1994; GUYENET, 1998; MICHELINI; MORRIS, 1999; PALKOVITS, 1980) e que se projetam aos neurônios pré-ganglionares (colinérgicos) situados na coluna intermédio-lateral (IML) da medula espinhal e destes aos pós-ganglionares (noradrenérgicos) que inervam coração e vasos (MICHELINI, 2008). Com a inibição dos neurônios pré-motores simpáticos há a redução do tônus

simpático, resultando na redução do débito cardíaco (DC), do retorno venoso (RV) e da resistência periférica e, conseqüentemente, em queda na PA. Neurônios de segunda ordem do NTS também se projetam e estimulam neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no Núcleo Motor Dorsal do Vago (DMV) e o Núcleo Ambíguo (NA), os quais se projetam ao coração resultando em aumento do tônus vagal, o qual contribui para a queda do DC e da PA (MICHELINI, 2007 a E b). Esta circuitaria neuronal constitui o *arco-reflexo básico* ou *alça bulbar do controle cardiovascular*.

Além da alça primária de integração bulbar do reflexo, o controle cardiovascular conta com outros circuitos suprabulbares de integração e modulação que se prestam a ajustes finos e diferenciais da circulação em situações específicas como, por exemplo: o exercício, o sono, situações de estresse, etc. As informações aferentes que chegam ao NTS e são direcionadas às diferentes áreas bulbares, também ascendem a áreas suprabulbares por neurônios noradrenérgicos (NORérgicos) cujos corpos celulares localizam-se no NTS e BVLc e se projetam direta e/ou indiretamente a áreas hipotalâmicas (em especial o núcleo paraventricular do hipotálamo - PVN), à amígdala e ao córtex (DAMPNEY, 1994; PALKOVITS, 1980; SAWCHENKO; SAWNSON, 1981). Projetam-se a neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SON) e PVN, que sintetizam vasopressina (VP) ou ocitocina (OT) e cujos axônios projetam-se à neurohipófise, de onde VP e OT são liberados para a circulação (BISSET; CHOWDREY, 1988; DAMPNEY, 1994; MICHELINI, 2001; MICHELINI; MORRIS 1999;).

Um grande contingente de fibras NORérgicas ascendentes também se projeta a neurônios parvocelulares do PVN (os chamados neurônios pré-autonômicos), que também são VPérgicos e OTérgicos (BUIJS et al., 1978; SAWCHENKO; SWANSON, 1982), mas se projetam diretamente ao NTS, DMV, NA e BVL (BUIJS et al., 1978; NILAVER et al., 1980; SAWCHENKO; SAWNSON 1982; SOFRONIEW; SCHRELL, 1981), fechando um circuito modulatório, que constitui a chamada *alça secundária* ou *alça suprabulbar* de modulação do controle autonômico do sistema cardiovascular. Portanto, no controle da função cardiovascular há envolvimento de áreas bulbares e supra-bulbares, cujas conexões recíprocas (NTS-PVN e PVN-NTS) formam um circuito modulatório do controle bulbar podendo inclusive modular a própria sinalização aferente ao NTS (BAILEY et al., 2006; PETERS et al., 2008; SAWCHENKO; SAWNSON, 1982). A integração entre as alças bulbar e suprabulbar explica, por exemplo, a ausência de bradicardia reflexa e o

aparecimento então da taquicardia em presença de elevações da PA durante o exercício dinâmico (MICHELINI; STERN, 2009).

Muitos trabalhos tem demonstrado que o treinamento aeróbio (T) de baixa intensidade é bastante eficaz em reduzir a PA e em melhorar o balanço autonômico (redução do simpático, aumento do vago ao coração) em hipertensos. Um dado interessante é que mesmo não alterando a PA de normotensos, o T é também eficaz em melhorar o balanço autonômico, uma vez que a bradicardia de repouso, indicativa de elevado tônus vagal (ou reduzido tônus simpático), é também observada em normotensos treinados (CLAUSEN, 1977; MICHELINI; STERN, 2009; NEGRÃO et al., 1992; TIPTON, 1999). Esta constatação tem renovado o interesse do estudo relativo aos efeitos do exercício repetitivo sobre o controle autonômico também em normotensos.

Uma linha de investigação à qual o grupo da Dra. Micheline tem se dedicado na última década é a de que os ajustes cardiovasculares observados durante o T (redistribuição de fluxo, a manutenção de elevada FC frente a aumento da PA no exercício agudo, a bradicardia de repouso após treinamento, etc.) seriam mediados pela ação conjunta de vias bulbares e suprabulbares. Diversos estudos foram realizados buscando-se entender a gênese dos ajustes adaptativos do controle cardiovascular ao exercício, bem como a modulação exercida pelos neurônios pré-autonômicos VPérgicos e OTérgicos que se projetam do PVN ao NTS, como demonstrada na Figura 1.

Demonstrou-se que:

- as projeções VPérgicas do PVN ao NTS têm efeito tônico sobre o funcionamento do reflexo barorreceptor cardíaco, porque o bloqueio de receptores V1 no NTS aboliu a bradicardia reflexa, mas nenhuma alteração na sensibilidade do reflexo foi observada após administração do bloqueador V1 no líquido céfalo-raquidiano do 4º ventrículo (neurormônio), evidenciando a especificidade do efeito da VP neuronal (MICHELINI; BONAGAMBA, 1988; MICHELINI, 1994, 1998, 2007 a e b);
- a administração de VP no NTS não alterou a sensibilidade do reflexo, mas diminuiu a resposta bradicárdica por reduzir a inibição simpática durante elevações transitórias da PA, deslocando o ponto de operação do reflexo para níveis mais elevados de FC (MICHELINI, 1994, 1998, 2007 a, b; MICHELINI; BONAGAMBA, 1988)
- em ratos sedentários e treinados observou-se durante exercício dinâmico aumento do conteúdo endógeno de VP especificamente na região dorsal do bulbo que abrange o NTS, sugerindo ativação das projeções VPérgicas a esta área (DUFLOTH; MORRIS;

MICHELINI, 1997; MICHELINI; MORRIS, 1999); observou-se também não haver alteração da densidade de receptores V1 (receptores para vasopressina) no NTS, mas o T foi eficaz em aumentar a sensibilidade destes receptores ao agonista endógeno (SOUZA; MICHELINI; FIOR-CHADI, 2001);

- pré-tratamento do NTS com antagonista V1 não alterou a resposta pressora, mas determinou redução da taquicardia do exercício em sedentários e treinados, com resposta de maior magnitude nos indivíduos treinados indicando que a ativação das projeções VPérgicas ao NTS facilita a taquicardia do exercício (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI; MORRIS, 1999);

- durante o exercício dinâmico demonstrou-se também haver nos ratos treinados ativação das projeções OTérgicas do PVN ao bulbo, uma vez que apenas neste grupo houve aumento do conteúdo endógeno de OT na região dorsal do bulbo (abrangendo NTS/DMV), sem nenhuma alteração significativa nos ratos sedentários (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);

- pré-tratamento do NTS com antagonista de receptores de OT (OTR) não alterou a resposta pressora, mas potencializou a taquicardia do exercício apenas nos ratos treinados, sugerindo que o treinamento ativa mecanismos OTérgicos supra-bulbares de controle da FC os quais, determinam redução da taquicardia do exercício; nenhuma alteração de PA ou FC após bloqueio dos OTR foi observada em ratos sedentários submetidos ao exercício dinâmico (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);

- tanto nos grupos treinados quanto sedentários, a administração exógena de OT no NTS determinou redução significativa e similar da taquicardia do exercício, sugerindo que o treinamento não alterava receptores, mas apenas a disponibilidade do neurotransmissor, aumentada após treinamento (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);

- o efeito bradicárdico da OT foi confirmado pela administração de OT ou pelo bloqueio de seus efeitos endógenos no NTS: houve, respectivamente, aumento ou redução da bradicardia reflexa durante hipertensões transitórias, sem alteração da taquicardia reflexa a hipotensões transitórias (HIGA et al., 2002).

Figura 1 - Representação esquemática de como o treinamento aeróbico induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares. As áreas mencionadas facilitam o controle autonômico da circulação durante o exercício. Fonte: Adaptado de Michelini; Stern, 2009, Ruggeri (2012).

Para melhor caracterizar a plasticidade do sistema OTérgico central frente a ajustes específicos da FC induzidos pelo T, estudos recentes, associando técnicas funcionais às de biologia molecular, mostraram que o T determinava aumento significativo da expressão de RNAm do peptídeo seja na região biossintética (hipotálamo) seja na região de projeção (abrangendo NTS, DMV), indicando que o T produzia intensa ativação das projeções OTérgicas do PVN à regiões bulbares envolvidas no controle cardiovascular (MARTINS et al., 2005). Evidenciou-se também que a ativação da expressão gênica de OT no PVN após T em normotensos e hipertensos, e, que o aumento da imunorreatividade para OT correlacionava-se positivamente com a bradicardia de repouso (CAVALLERI et al., 2011).

Para que os neurônios do pré-autonômicos do PVN ajustem adequadamente a função cardiovascular em indivíduos treinados, é necessário que as informações provenientes da periferia ascendam aos núcleos hipotalâmicos de integração, via projeções NORérgicas (KALIA; FUXE; GOLDSTEIN, 1985; SWANSON; SAWCHENKO, 1983). No entanto, informações relativas aos efeitos do T sobre a plasticidade/atividade das projeções NORérgicas ascendentes ao PVN são escassas. Em um dos poucos estudos disponíveis, Higa-Taniguchi et al. (2007) demonstraram que o T aumentava a densidade de botões sinápticos positivos para a dopamina beta-hidroxilase (DBH, enzima responsável pela

síntese de noradrenalina) em neurônios OTérgicos do PVN que se projetavam ao NTS, sugerindo aumento da inervação NORérgica após o T. Desconhecem-se os efeitos do T sobre as vias NORérgicas ascendentes que se projetam a neurônios pré-autonômicos VPérgicos do PVN, cuja atividade é também modificada pelo T (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1999; MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI; STERN, 2009; SOUZA; MICHELINI; FIOR-CHADI, 2001). Esta é uma das proposições do presente projeto.

Estudos de nosso laboratório tem também indicado que adaptações no controle autonômico e no sistema cardiovascular, induzidas pelo treinamento ocorrem em diferentes tempos experimentais e que alterações plásticas no sistema nervoso central precedem os ajustes periféricos induzidos pelo exercício (RUGGERI, 2012; SILVA Jr, 2011; ZAMPIERI, 2011). Desta forma pretendemos no presente trabalho investigar o decurso temporal das adaptações induzidas pelo treinamento na expressão de vias ascendentes ao PVN (DBH positivas), bem como na expressão de neurônios pré-autonômicos OTérgicos e VPérgicos, com os quais as projeções NORérgicas se conectam. A correlação destas observações com o decurso temporal das adaptações cardiovasculares ao treinamento nos permitirá um melhor entendimento dos mecanismos condicionantes dos efeitos benéficos induzidos pelo treinamento no sistema cardiovascular.

Também não se sabe qual(is) o(s) estímulo(s) que condiciona(m) possíveis alterações plásticas em vias NORérgicas ascendentes. Baseando na observação anterior de Ceroni et al. (2009) que descreveram que a desnervação sinoaórtica bloqueava os efeitos benéficos do treinamento aeróbio sobre o sistema cardiovascular (ausência de bradicardia de repouso em normotensos hipertensos; ausência de queda da PA em hipertensos) pode-se supor que a informação carregada pelos barorreceptores e que ascende ao PVN seja de crucial importância na determinação das alterações plásticas e funcionais induzidas T em vias centrais de controle autonômico. Esta hipótese deverá também ser investigada no presente trabalho.

2. OBJETIVOS

Pretende-se, nesse projeto, identificar os efeitos sequenciais do T sobre as projeções NORérgicas ascendentes a neurônios pré-autonômicos OTérgicos e VPérgicos do PVN, bem como avaliar os efeitos da desnervação sinoaórtica sobre a plasticidade das vias NORérgicas ascendentes ao hipotálamo e a expressão de OT e VP no PVN.

São nossos objetivos específicos, utilizando-se ratos Wistar sedentários e treinados:

- 1- identificar, utilizando a expressão de RNAm do DBH (RT-PCR em tempo real), os efeitos temporais do T sobre alterações na plasticidade de vias NORérgicas provenientes do tronco encefálico e ascendentes ao PVN, bem como verificar os efeitos induzidos pela desnervação sinoaórtica;
- 2- confirmar, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, se as alterações no conteúdo de RNAm refletem-se em alterações da expressão protéica, confirmando adicionalmente áreas hipotalâmicas específicas em que estas alterações ocorrem;
- 3- através de dupla marcação com DBH e OT ou DBH e VP, identificar os efeitos do T sobre a densidade da inervação ascendente a neurônios OTérgicos e VPérgicos do PVN, bem como avaliar os efeitos da desnervação sinoaórtica sobre esta via de integração supra-bulbar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais experimentais*

Para esclarecer os objetivos propostos, realizamos dois protocolos diferentes, um para se avaliar os efeitos temporais do T sobre a inervação NORégica a neurônios VPérgicos e OTérgicos do PVN, identificado como “*Time course*” e outro, identificado como “SHAM & SAD”, em que avaliamos os efeitos da remoção das aferências periféricas sobre a plasticidade e funcionamento desta via central de modulação. Foram utilizados um total de 65 ratos para o protocolo *time course* e de 45 ratos para o protocolo SHAM & SAD. Utilizamos ratos Wistar com ~2 meses de idade no início dos protocolos, pesando entre 200-220 g. Os ratos foram provenientes do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo–SP, e, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica durante todo o período de experimentação. Foram alocados em gaiolas coletivas (3-4 ratos/caixa), à temperatura ambiente adequada (entre 22-24° C), umidade relativa constante (50-55%), renovação do ar ambiente (15-20 trocas/h) e controle automático de iluminação (foto-período de 12:12 h, com luz das 7 às 19 hs). A ração foi fornecida *ad libitum*, sendo livre o acesso dos animais à água. O peso corporal (balança Filizzola) foi aferido semanalmente. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Bioética do ICB (registrado sob nº141 na folha 110 do livro 02 para uso de animais em experimentação).

3.2 *Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais*

Inicialmente, a primeira semana foi destinada à adaptação ao espaço no Biotério de Manutenção e à esteira, e a segunda à familiarização os ratos com a corrida na esteira (5 sessões, com duração de 10 minutos a 0,4- 0,7Km/h e com 0% de inclinação. Os ratos foram selecionados segundo a habilidade em andar/correr na esteira ergométrica, sendo excluído dos protocolos os animais inaptos para andar/correr na esteira. A intensidade do esforço físico foi avaliada indiretamente (distância máxima percorrida) através do teste de esforço máximo durante exercício escalonado em esteira ergométrica (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos). O teste foi iniciado com a velocidade de 0,3 km/h, com incremento de

0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal. A carga máxima considerada foi aquela em que o animal não conseguiu mais correr espontaneamente. Os testes de esforço máximo foram realizados no início, ao meio e ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) e foram utilizados respectivamente para se aferir a intensidade de T e alocar-se ratos com igual desempenho aos grupos T e S, para se corrigir a intensidade de T, e, para se aferir o ganho de desempenho nos grupos T e S ao final dos protocolos experimentais.

3.3 *Desnervação sino-aórtica (SAD) ou cirurgia fictícia (SHAM)*

Após o primeiro teste de esforço máximo, os ratos alocados a este grupo experimental foram submetidos à cirurgia de desnervação sinoaórtica (SAD) ou à cirurgia fictícia (SHAM). A remoção dos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais foi realizada de acordo com a técnica descrita por Moreira e Krieger (CERONI et al., 2009). Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica contendo 100 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Ketalar, Parke-Davis, Hortolândia, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xilasina (Rompum, Bayer, *i.p* Hortolândia, São Paulo, Brasil). Realizou-se uma incisão médio-cervical anterior para separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vaso-nervoso (carótida, vago e tronco simpático, vide Figura 2). Identificaram-se as fibras do nervo depressor aórtico (que trafegam como um ramo separado ou junto com o simpático) as quais foram isoladas e seccionadas, preservando-se o tronco simpático. O outro contingente de fibras barorreceptoras que se situam junto ao nervo laríngeo inferior foi interrompido através da secção do nervo laríngeo superior. A seguir localizou-se bilateralmente a bifurcação das carótidas, que foi exposta e dissecada para destruição completa das fibras carotídeas, destruindo-se inclusive o corpúsculo carotídeo. Os ratos do grupo SHAM foram submetidos à operação fictícia, que consiste nas mesmas etapas cirúrgicas, exceto a secção/remoção das fibras baro- e quimiorreceptoras. Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (cetoprofeno 3 mg/kg, subcutâneo Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e antibiótico (Pentabiótico Veterinário 18.000 UI/kg, subcutâneo Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e foram mantidos em caixas individuais até a completa recuperação cirúrgica.

Figura 2 - Ilustração da remoção dos barorreceptores. Fonte: Cavalleri, 2011

3.4 Protocolo de treinamento Físico ou Sedentarismo

O treinamento aeróbio, padronizado em nosso laboratório (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI 1997; BRAGA et al., 2000; AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000), foi similar para ambos os protocolos. Consistiu de T aeróbio de baixa a moderada intensidade ($T=50-60\%$ da velocidade atingida no teste de esforço), sendo realizado durante 5 dias/semana, 1h/dia, sem inclinação. A intensidade do exercício foi aumentada gradativamente pela combinação da velocidade e duração até atingir a velocidade estabelecida pelo teste de esforço. A única diferença entre os dois protocolos experimentais utilizados foi a de que os animais alocados ao “*Time course*” treinaram por 8 semanas enquanto os que foram alocados ao protocolo SHAM & SAD treinaram por 12 semanas. Os ratos alocados aos grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas 1 vez/semana colocados na esteira (5-10 min. com velocidade de 0,3-0,6 Km/h) para que se habituassem à manipulação experimental e aprendesse a realizar os testes máximos

3.4.1 Time Course

No início dos experimentos, os ratos Wistar passaram por um período de adaptação, como descrito no item 3.2. No final da segunda semana, aqueles considerados aptos foram

submetidos ao teste de esforço máximo em esteira. Neste protocolo experimental os testes foram realizados em 3 momentos distintos: na semana 0, sendo utilizado para determinar a capacidade aeróbia e classificar animais com igual desempenho aos grupos S e T e determinar a intensidade do T; na 4ª semana, servindo para se ajustar a intensidade do grupo T ao aumento da capacidade máxima; e, na 8ª semana prestando-se à avaliação da eficácia do treinamento e à comparação do desempenho entre os grupos S e T, como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação e os 3 testes de esforço máximo realizados para os grupos *time course*

3.4.2 SHAM & SAD

Após o período de recuperação cirúrgica, os ratos dos grupos SHAM & SAD foram submetidos a novo teste de esforço máximo (semana zero) para quantificação dos efeitos da cirurgia sobre o desempenho individual. Estes resultados foram utilizados para se alocar ratos com desempenho similar aos subgrupos sedentário (S) e treinado (T): SAD-S ($n=9$), SAD-T ($n=12$) e SHAM-S ($n=12$), SHAM-T ($n=12$). O desempenho em esteira foi também utilizado para cálculo da intensidade de T. Nas semanas 6 e 12 foram realizados novos testes de esforço máximo para reajuste de intensidade de treinamento nos grupos T e cálculo de sua eficácia ao final dos protocolos, respectivamente, assim como ilustrado na Figura 4. Ambos os grupos (S e T) realizaram o teste de esforço máximo nos mesmos períodos supracitados.

Figura 4 - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação, cirurgia e recuperação e os 4 testes de esforço máximo realizados nos grupos SHAM & SAD.

3.5 Grupos experimentais

Os ratos submetidos ao protocolo do “*Time course*” foram estudados em diferentes tempos experimentais, a saber, semanas 0 (S0 = T0), 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) e 8 (S8 e T8), enquanto que os alocados ao protocolo SHAM & SAD foram estudados apenas após 12 semanas de T ou S. Os subgrupos experimentais encontram-se identificados no Quadro 1.

Quadro 1 - Grupos experimentais divididos por protocolo, condição (S ou T) e tempo experimental (0,1, 2, 4 e 8 semanas).

	SHAM		SAD		<i>Time Course</i>	
Semana	Sed	Tre	Sed	Tre	Sed	Tre
0	-	-	-	-	S0=T0	-
1	-	-	-	-	-	T1
2	-	-	-	-	-	T2
4	-	-	-	-	-	T4
8	-	-	-	-	S8	T8
12	SHAM-S	SHAM-T	SAD-S	SAD-T	-	-

S ou T designa a condição, e, os números as semanas experimentais. Cada subgrupo foi composto por 9-12 ratos.

3.6 Canulação arterial e venosa e registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais

Nos diferentes tempos experimentais os ratos T e S foram anestesiados com a combinação de 100 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina (Rompum, Bayer), *i.p.* A fossa ilíaca foi dissecada para isolamento e canulação da artéria e veia femorais (cânulas intra-arteriais confeccionadas com Tygon, preenchidas com salina, mantidas ocluídas por pino de aço inoxidável). Após a introdução dos cateteres e a fixação dos mesmos na artéria e veia, a parte externa de ambas as cânulas foi exteriorizada no dorso dos animais, onde foram fixadas com fios de algodão. Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (3mg/kg de Cetoprofeno subcutâneo) e foram mantidos em caixas individuais para recuperação pós-cirúrgica.

Os registros basais de PA e FC (cânula arterial acoplada ao sistema de registro) foram obtidos 24 horas subseqüentes à canulação, com os animais acordados e com livre movimentação. Após conectar devidamente a cânula arterial ao sistema de registro (transdutor / pré-amplificador e Biotach Gould/ polígrafo Gould 3400 e/ou computador + placa de conversão A-D), aguardou-se um período suficiente (~20-30 min) para redução da atividade exploratória do animal e estabilização dos parâmetros cardiovasculares. PA e FC foram registradas continua e simultaneamente por um período de 40-50 min, estando os ratos conscientes e sem restrição de movimentos. Após a aquisição dos valores basais de PA e FC, os animais foram submetidos a exercícios dinâmicos de curta duração (~6 a 10 min) em velocidades variando de 0,3km/h a 0,6km/h. Os parâmetros cardiovasculares foram registrados nos períodos controle, exercício e recuperação (Quadro 2). Para os animais submetidos ao protocolo “SHAM & SAD” realizou-se também, ao final dos registros funcionais, o teste de funcionamento dos barorreceptores para se confirmar a desnervação sino-aórtica.

Quadro 2 - Protocolo experimental para aquisição dos dados funcionais. No protocolo “*Time course*”, não foi realizado o teste do barorreflexo.

Adaptação do rato ao ambiente de registro	Registro de PA e FC basal	PA e FC durante a corrida (0,3-0,6 km/h)	Registro de PA e FC durante a recuperação	Fenilefrina e nitroprussiato de sódio <i>iv.</i>
(20-30 min)	(40-50 min)	(6-10min)	(20-30 min)	(tempo variável)

3.7 *Comprovação da desnervação sino-aórtica*

A comprovação da eficiência da remoção cirúrgica dos barorreceptores em eliminar todas as aferências arteriais foi realizada após os registros ao final dos registros funcionais através da administração *i.v.* de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (concentrações crescentes de 0,1 à 12,8 µg/kg e de 0,2 à 25,6 µg/kg, respectivamente, em volumes de 0,1 ml). A ausência de bradicardia e taquicardia reflexas indicaram a eficácia da desnervação cirúrgica. O índice de sensibilidade barorreflexa foi calculado pela razão entre a resposta de variação da FC em função da variação da PA ($\Delta FC/\Delta PAM$).

3.8 *Análise dos dados funcionais*

Os parâmetros funcionais analisados incluem os valores basais de PA e FC dos grupos experimentais nos diferentes tempos de treinamento ou sedentarismo e na presença e ausência do controle barorreflexo. A análise dos registros em polígrafo e no computador (software Powerlab, ADInstruments) foi realizada no domínio do tempo.

3.9 *Obtenção do tecido cerebral*

3.9.1 *Para quantificação do RNAm*

Após os registros funcionais, aproximadamente 5-8 animais/grupo foram destinados à sala de Cirurgia do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para eutanásia e coleta dos tecidos alvo da pesquisa. Os animais foram profundamente anestesiados com 300 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis) e 60 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina (Rompum, Bayer). Após a parada respiratória foi realizada a perfusão com solução salina previamente resfriada via ventrículo esquerdo (Bomba Peristática, Milan: 40 mL/min, pressão ~80-100 mmHg, durante 5 minutos). Após a perfusão o animal foi decapitado para rápida retirada do cérebro que foi imediatamente congelado em recipiente contendo gelo seco. Foram obtidas fatias coronais (~800-1000 μ m) do tronco cerebral e do hipotálamo, para isolamento da área dorsal do bulbo (DBS, contendo o NTS e áreas circunvizinhas) e da área hipotalâmica (contendo o PVN e áreas circunvizinhas), como mostrado na Figura 4. As áreas de interesse foram identificadas e as amostras de tecido foram coletadas (*'punches'*), acondicionadas em ependorffs com TRIzol e imediatamente congeladas a -80 °C.

Figura 5 - Esquema ilustrando as regiões de interesse (DBS e PVN) e a forma de coleta do tecido para a quantificação da expressão gênica.

3.9.2 Para análise da imuno-histoquímica

Embora o laboratório adotasse um protocolo de imuno-histoquímica fornecido pelo Prof. Dr. Javier Stern, algumas modificações foram feitas com a finalidade de se preservar melhor a integridade do tecido cerebral. Durante o mestrado cursamos a disciplina “Progressos em Fisiologia Cardiovascular: da Célula ao Sistema” em que a Profa. Dra. Ida Llewellyn-Smith, responsável por ministrar esta disciplina, nos ensinou princípios teóricos e práticos para melhor preservação dos tecidos submetidos à imuno-histoquímica. Estes procedimentos (descritos a seguir) passaram a fazer parte da rotina de nosso laboratório.

Após os registros funcionais, aproximadamente 3-5 animais/grupo foram destinados à sala de Cirurgia do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para eutanásia e coleta do cérebro. Os animais foram profundamente anestesiados com 300 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis) e 60 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina (Rompum, Bayer). Imediatamente após a parada respiratória foi realizada a perfusão (fluxo constante de 40 ml/min) do cérebro, via ventrículo esquerdo, com 300ml de solução Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cat. No. D-8900, Sigma) previamente resfriada, seguida de perfusão com fixador (Paraformaldeído 4%, Sigma em tampão fosfato a 0,01 M). Após a perfusão o animal foi decapitado para a remoção do encéfalo. O encéfalo foi pós-fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (PB) por 48 horas e depois crioprotetido em solução de sacarose 20% e 30% em PBS em temperatura ambiente por 24 horas cada. Os encéfalos não foram mais mantidos em freezer -80°C como fazíamos anteriormente, mas armazenados em geladeira (~4 °C) até a realização dos experimentos de imuno-histoquímica. A imuno-histoquímica teve por objetivos comprovar os dados do PCR, identificar a(s) área(s) encefálica(s) específica(s) em que ocorrem as alterações induzidas pelo exercício e desnervação sino-aórtica e permitir uma análise semi-quantitativa da densidade de expressão de OT, VP e DBH nas diferentes áreas encefálicas. Os animais do grupo “*Time course*” foram analisados nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 e aqueles do protocolo “SHAM & SAD” foram analisados após 12 semanas de treinamento ou sedentarismo.

3.10 RT-PCR em tempo real

Os RNAs totais de cada amostra foram extraídos com o próprio reagente de coleta (TRIzol® Reagent, Invitrogen Brasil, Cat. No. 15596-026 Carlsbad, Califórnia, EUA)

segundo manual do fabricante. Para a extração do RNA total, as amostras (em gelo) foram homogeneizadas no *epENDORF* de coleta com sonicador (Sonics vibra cell, Sonics e Materials inc). Foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma no. Cat. C1062.01.BJ) seguido de agitação (15-20 s), e incubação a temperatura ambiente por 3 min. Após centrifugação (15 min a 4 °C, centrifugação refrigerada) a fase superior contendo RNA total foi separada e transportada para tubo estéril de 1,5 µL. A cada amostra foi acrescentado 250 µL de álcool isopropílico (SIGMA no. Cat. A1078.01.BJ) e adicionado 500 µL de álcool etílico a 75% (Sigma no. Cat. A1084.01.BJ), seguida de nova centrifugação (7500 RPM por 5 min a 4 °C). O sobrenatante foi desprezado e ao tubo (temperatura ambiente) foram acrescentados 18 µL de água DEPC para solubilização do corpo de fundo. O tubo foi incubado em banho seco 65°C por 10 minutos e armazenado em freezer -80 °C. O RNA obtido foi quantificado no NanoDrop (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 260, 230 e 280 nm.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) amostras de 1µg de cada RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa. Primeiramente as amostras foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (Cat. No. 18068-015, Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo padrão do fabricante. Para transcrição reversa foi utilizado o kit ImProm II, Transcriptase Reverse (Cat. No. A3802, Promega, Madison, WI, EUA), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. No processo de síntese do DNA complementar foram ainda utilizados *primers* randômicos (Random Primers, No Cat. 48190-011, Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, EUA) e dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados, No Cat. 10297-018, Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, EUA) e RNase Out (No Cat. 10297-018, Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C.

A expressão do mRNA foi estimada pelo PCR semi-quantitativo em tempo real (7500 Real-Time PCR System), utilizando-se a coloração pelo '*SYBR Green*', que segue o princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e a enzima KAPA (Cat. No. KK4603, SciencePro, Boston, Massachusetts, EUA). Os resultados das reações de PCR em tempo real foram analisados pelo software Excel (Microsoft). O gene endógeno, ou constitutivo, foi a Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) que é expresso continuamente em todas as células do organismo e que, em experimento-piloto do laboratório, não foi alterado pelo treinamento físico e nem pela idade do animal. Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante, assim como os *primers* que foram utilizados são específicos para cada gene (OT, VP, DBH e HPRT, Invitrogen™) que foram desenhados pelos programas Primer3 Plus (Bioinformatics)

e Primer Premier 5.0 (Biosoft International), levando-se em consideração o tamanho dos *primers*, a temperatura de anelamento, a porcentagem de guanina e citosina, a possibilidade de formação de *hairpine* e falsos *primers*, além do posicionamento em diferentes éxons.

Quadro 3 - Sequência dos primers para HPRT, OT, VP e DBH utilizadas no experimento, respectivas temperaturas de anelamento dos primers (TM) e tamanho do fragmento (par de base) originado após PCR (amplicon).

Gene	Primers	TM	Amplicon
HPRT	F: 5'-3' TTTGCTGACCTGCTGGATTAC	53	125
	R: 5'-3' ACTTTTATGTCCCCCGTTGA	51	
OT	F: 5'-3' TAGACCTGGATATGCGCAAG	51	272
	R: 5'-3' CTCGGAGAAGGCAGACTCAG	54	
VP	F: 5'-3' ATCCGACATGGAGCTGAGAC	57	234
	R: 5'-3' AAAAACCCTCTCGACACTCG	55	
DBH	F: 5'-3' TGGAATCTTGGAGGAGATGTGCGT	67	132
	R: 5'-3' TGCCGAACCGGTTTACTATGTGGA	67	

Para análise da quantificação dos resultados do PCR em tempo real e análise da eficiência das curvas de amplificação de cada amostra (tempos mínimo e máximo, limiar), foi utilizado o software '7500 software v2.0.6'.

Os dados da expressão de RNAm (CTs) de DBH, OT e VP foram exportados para uma planilha de dados (agrupados de acordo com as áreas encefálicas, os grupos experimentais (SAD-S, SAD-T, SHAM-S e SHAM-T) e ainda no protocolo “*Time course*” de acordo com os diferentes tempos de treinamento ou sedentarismo (S0, T1, T2, T4, T8 e S8) para a determinação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ e significância estatística (Statistica 10, StatSoft Inc.).

3.11 Imuno-histoquímica

Os encéfalos foram seccionados em criostato (cortes coronais de 30 μ m, Leica, CM 3050, Germany) abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse: PVN, de 1,3 a 2,3 mm caudais ao Bregma; NTS, de 13,6 a 14,3 mm caudais ao Bregma (PAXINOS; WATSON, 1986). Os cortes coronais foram coletados em PB (0,1 M) em placas contendo de 6 poços. Cortes foram sequencialmente colocados em três poços: poço 1, cortes 1, 4, 7,

etc; poço 2, cortes 2, 5, 8, etc; poço 3, cortes 3, 6, 9, etc. Os cortes do poço 1 foram destinados a dupla marcação de VP e DBH, e os cortes do poço 2 foram marcados com OT e DBH. Alguns cortes do poço 3 foram utilizados para o controle negativo (omissão do anti-corpo primário) e os restantes armazenados em uma solução *anti-freezing* caso houvesse a necessidade de se repetir alguma reação.

Inicialmente as secções foram lavadas com uma solução de Imuno-buffer, contendo 0,3% de Triton (detergente para quebrar os lipídios da membrana facilitando a ligação dos anticorpos com as proteínas), sendo a seguir incubadas em solução de soro normal Donkey 10% (Cat.No. S30-100ML, Millipore Temecula, Califórnia, EUA) para se bloquear ligações inespecíficas. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários para OT (Guinea Pig anti Oxytocin® - Millipore, cat. no. T-5021 1:200.000 Temecula, Califórnia, EUA) e DBH (Mouse anti DBH n-terminal® - Millipore, cat. No. MAB308, 1:3000 Temecula, Califórnia, EUA), e VP (Guinea Pig anti-Arg 8-vasopressin® - Millipore, cat. no. T-5048, 1:25.000 Temecula, Califórnia, EUA) e DBH durante 24 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com Tris-PBS os cortes foram incubados com anticorpo secundário Cy3 anti-OT ou VP (1:500) (CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L), Cat.No. 706-165-148, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Baltimore, Maryland, EUA) e Alexa 488 anti-DBH (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), Cat.No. 715-545-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Baltimore, Maryland, EUA) durante 5 horas à temperatura ambiente. Após 3 outras lavagens com Tris- PBS os cortes foram então montados em lâminas previamente gelatinizadas (0,5% de gelatina de pele bovina e 0,05% de CrK(SO₄)). As lâminas montadas foram secas ao ar livre em ambiente escuro. A montagem foi realizada com meio de montagem (SLOWFADE® Gold Antifade reagente, Cat. No. S36936 Life Technologies Carlsbad, Califórnia, EUA) e lamínula, evitando-se a formação de bolhas.

As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200) com diferentes aumentos para a seleção das áreas de interesse a serem fotografadas. A quantificação foi realizada em aumento de 200x em áreas do PVN envolvidas com o controle autonômico do sistema cardiovascular, como os sub-núcleos '*dorsal cap*' e ventromedial do PVN medial. Para comparação analisou-se também o sub-núcleo magnocelular do PVN, que não diretamente envolvido com o controle autonômico, mas com a liberação plasmática de VP e OT .

Conforme ilustrado na Figura 6, a quantificação da expressão de VP, OT e DBH foi realizada a partir de imagens individualizadas, obtidas em microscópio de fluorescência utilizando-se o software ImageJ (NIH). As imagens de fluorescência foram transformadas em imagens binárias para a quantificação da densidade integrada de marcação (produto de densidade pela intensidade) na área de interesse.

Figura 6 – Fotomicrografias do PVN medial obtidas em microscópio de fluorescência, ilustrando a dupla marcação para DBH (verde) e VP (vermelho, em A) e as imagens de fluorescência individualizadas (B e C, respectivamente). Em D e E são mostradas as respectivas imagens binárias utilizadas para quantificação da densidade integrada. 3V, terceiro ventrículo cerebral; DC, subnúcleo ‘dorsal cap’; MG, subnúcleo magnocelular; VM, subnúcleo ventromedial.

3.12 Apresentação dos dados e análise estatística

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ EPM.

Para análise dos dados funcionais e da expressão gênica e proteica dos sistemas aminérgicos e peptidérgicos encefálicos no protocolo do “*Time Course*” utilizamos a análise de variância (ANOVA) fatorial em que foram comparados os efeitos da condição (T x S) nos diferentes tempos experimentais (T_1 , T_2 , T_4 e T_8 vs $T_0=S_0$). Para a análise dos SHAM & SAD sedentários e treinados utilizamos a ANOVA de 2 fatores (condição = T x S, grupo = SAD x SHAM). Para todas estas análises utilizou-se o software STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc.). O teste *post-hoc* foi o de Fisher e o nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos sequenciais do T aeróbio (Protocolo do “Time course”)

4.2.1 Desempenho em esteira

A Tabela 1 e a Figura 7 ilustram o ganho de desempenho induzido pelo T ou S durante as 8 semanas experimentais. Ambos os grupos S e T, partiram de igual capacidade física na semana 0 ($1,10 \pm 0,04$ km/h) e o treinamento determinou um aumento significativo do desempenho em esteira já a partir da 4^a. semana, com pequeno aumento adicional entre as semanas 4 e 8. Por outro lado os ratos mantidos sedentários mostraram perda significativa de desempenho na 8^a. semana experimental. Ao final dos protocolos observou-se ganho significativo de desempenho nos Wistar-T, enquanto que os Wistar-S mostraram ganho negativo no desempenho em esteira ($+0,58 \pm 0,10$ vs. $-0,27 \pm 0,08$ km/h, respectivamente, Tabela 1).

Tabela 1 - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). * vs semana 0, † vs S, # diferente de zero, $P < 0,05$.

	Wistar-S (km/h)	Wistar-T (km/h)
Semana 0	$1,10 \pm 0,04$ (n=65)	
Semana 4	$0,95 \pm 0,07$ (n=11)	$1,50 \pm 0,05^{*†}$ (n=22)
Semana 8	$0,85 \pm 0,12^{*}$ (n=11)	$1,70 \pm 0,12^{*†}$ (n=11)
Ganho ($S_8 - S_0$)	$-0,27 \pm 0,08\#$	$+0,58 \pm 0,10\#†$

Figura 7 - Evolução temporal do desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço em km/h) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs. Semana 0; † vs. Wistar-S, $P < 0,05$.

4.2.2 Alterações sequenciais dos parâmetros hemodinâmicos durante treinamento e sedentarismo

Nos tempos experimentais determinados (semanas 0, 1, 2, 4 e 8) os animais foram cronicamente canulados para registro a PA e FC, tanto em repouso quanto durante exercício dinâmico nas intensidades de 0,4 e 0,6 km/h. Os valores basais de FC e PAM ao exercício agudo para os grupos T e S são apresentados na Tabela 2 e Figuras 8 e 9.

O T durante 8 semanas determinou ligeiras flutuações, mas não causou alterações significativas na PAM de repouso dos ratos Wistar; o mesmo sendo observado no protocolo de sedentarismo (Figura 8). Por outro lado, os ratos submetidos ao treinamento mostraram ligeira queda, mas não significativa, da FC de repouso entre as semanas 1 e 4 (de 406 ± 7 para 399 ± 7 b/min), com instalação da bradicardia de repouso na 8ª. semana de treinamento (378 ± 13 b/min, $P < 0,05$ Figura 9). Não houve alteração da FC basal nos ratos submetidos ao sedentarismo (Tabela 2, Figura 9).

Tabela 2 - Valores basais e respostas de PAM e FC ao exercício dinâmico (0,4 km/h e 0,6 km/h) em ratos Wistar submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs semana 0, † vs S, $P < 0,05$.

		S0=T0 (n=6)	T1 (n=7)	T2 (n=9)	T4 (n=7)	T8 (n=9)	S8 (n=9)
Valores basais	PAM (mmHg)	115±3	109±2	114±3	110±2	113±2	117±3
	FC (b/min)	406±7	399±7	399±8	399±9	378±13*†	406±10
Respostas ao exercício 0,4km/h	ΔPAM (mmHg)	+8±3	+13±2	+11±3	+13±3	+18±1*	-
	ΔFC (b/min)	+71±11	+39±8*	+49±10	+63±11	+45±12	-
Respostas ao exercício 0,6km/h	ΔPAM (mmHg)	+9±6	+13±3	+10±4	+13±3	+20±2*	-
	ΔFC (b/min)	+79±21	+21±12*	+31±10	+53±12	+33±13	-

Figura 8 - Evolução temporal da PAM basal durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) nas 8 semanas experimentais.

Figura 9 - Evolução temporal da FC basal durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) durante as 8 semanas experimentais. * vs semana 0, † vs S, $P < 0,05$

Durante o exercício agudo em esteira nas velocidades de 0,4 e 0,6 km/h, a PAM do grupo treinado apresentou aumentos similares entre as semanas 1 e 4, com uma resposta mais intensa na semana 8 (dados na Tabela 2). As respostas taquicárdicas ao exercício agudo mostraram padrão inverso ao observado para as respostas de PAM: houve para ambas as intensidades de exercício redução de sua magnitude a partir de T1, com reduções ligeiramente maiores a 0,6 km/h (Tabela 2). Nas Figuras 10 e 11 são comparadas as respostas pressora e taquicárdica nas semanas 0 e 8. Observa-se que o treinamento determinou resposta taquicárdica significativamente diminuída quando comparado aos ratos sedentários (Figura 11), acompanhada de aumento significativo da resposta pressora em ambas as intensidades de exercício (Figura 10).

Figura 10 – Comparação das respostas de PAM ao exercício agudo em ratos sedentários (S0=T0) e submetidos a 8 semanas de treinamento aeróbio (T8). * vs semana 0, $P < 0,05$.

Figura 11 – Comparação das respostas de FC ao exercício agudo em ratos sedentários (S0=T0) e submetidos a 8 semanas de treinamento aeróbio (T8). * vs semana 0, $P < 0,05$.

4.2.3 Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre a expressão gênica de DBH, OT e VP em áreas de controle autonômico.

Os valores sequenciais (em unidades arbitrárias) relativos à expressão de RNAm de DBH no NTS e PVN e de OT e VP no PVN durante as 8 semanas de treinamento ou sedentarismo são apresentados na Tabela 3 e Figuras 12 e 13.

Tabela 3: Valores médios da expressão de RNAm de DBH, OT e VP no PVN e NTS de ratos sedentários (S) e submetidos a 8 semanas de treinamento (T). * *vs* Semana 0, † *vs* S, $P < 0,05$.

		S0=T0	T1	T2	T4	T8	S8
PVN	DBH						
	(UA)	1,07±0,16	0,86±0,10	2,11±0,99	0,88±0,42	0,69±0,17	0,60±0,07
	OT						
	(UA)	0,92±0,21	1,06±0,24	0,92±0,25	51,01±13,04*	14,87±7,10*†	0,72±0,21
	VP						
	(UA)	1,33±0,44	0,19±0,04	0,21±0,06	21,29±4,80*	0,47±0,21	0,32±0,07
NTS	DBH						
	(UA)	1,19±0,23	1,14±0,36	1,57±0,32	3,04±1,71	0,73±0,16	1,05±0,35

Houve grande variabilidade dos valores, mas pudemos detectar algumas significâncias e outras tendências. Observamos que o treinamento determinou na semana 4 aumento transitório na expressão gênica de DBH no NTS (de 1,19±0,23 para 3,04±1,71 UA, correspondendo a aumento de 2,6 vezes, que no entanto, devido à grande variabilidade, não atingiu níveis de significância, Tabela 3 e Figura 12). Esta tendência a aumento não se manteve, voltando ao valor basal na semana 8. Por outro lado o sedentarismo não mostrou nenhuma alteração na expressão do RNAm de DBH no NTS.

Figura 12 - Evolução temporal da expressão de RNAm de DBH no NTS ao longo das 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).

À semelhança do NTS, a expressão de DBH no PVN também mostrou um pico transitório na 2ª. semana de treinamento (de 1,07±0,16 para 2,11±0,99 UA, correspondendo a um aumento de 1,9 vezes, Tabela 3, Figura 13A), voltando aos valores basais a partir da 4ª.

semana experimental. Este aumento transitório da expressão gênica de DBH ocorreu mais precocemente no PVN (T2 *vs* T4 no NTS). À semelhança do NTS, também a expressão gênica de DBH no PVN não se alterou no grupo mantido sedentário (Figura 13, painel superior).

Durante o treinamento observamos no PVN alterações marcantes na expressão gênica de OT e VP. Houve na 4^a. semana aumentos significativos na expressão da RNAm para ambos os peptídeos (OT = de $0,92 \pm 0,21$ para $51,01 \pm 13,04$ UA, um aumento superior a 50 vezes; VP = de $1,33 \pm 0,44$ para $21,29 \pm 4,80$ UA, correspondendo a elevação de 16 vezes, $P < 0,05$ para ambos os valores, Tabela 3 e Figura 13, painéis intermediário e inferior, respectivamente), os quais foram precedidos pelo aumento da expressão gênica de DBH nesta área. Enquanto a expressão de RNAm de OT manteve-se elevada até a 8^a. semana de treinamento ($14,87 \pm 7,10$ UA, correspondendo a uma elevação de 16 vezes *vs* S0, $P < 0,05$), a de VP voltou a seus valores basais (Tabela 3, Figura 13, painéis intermediário e inferior). Novamente nenhuma alteração na expressão de OT e VP foi observada nos ratos mantidos sedentários.

Figura 13 - Evolução temporal da expressão de RNAm de DBH (painel superior), OT (painel intermediário) e VP (painel inferior) no PVN ao longo das 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs semana 0, † vs S. $P < 0,05$.

4.2.4 Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre o conteúdo proteico de DBH e OT nos diferentes subnúcleos do PVN medial

Nos períodos previamente definidos (S_0 , T_1 , T_2 , T_4 , T_8 e S_8), após os registros funcionais, 4-5 animais/grupo tiveram os encéfalos removidos para a realização dos experimentos de imunofluorescência com dupla marcação para OT e DBH. A Figura 14 ilustra os efeitos do treinamento e sedentarismo sobre a alteração da imunorreatividade para OT (OTir) e DBH (DBHir) no PVN nas semanas 0, 2 e 8. Os dados semiquantitativos da expressão proteica de OT e DBH são apresentados na Tabela 4 e Figura 15.

Figura 15 – Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre conteúdo de OT (painéis à direita) e DBH (painéis à esquerda) em diferentes subnúcleos do PVN medial: VM, ventromedial (painéis superiores); DC, *dorsal cap* (painéis centrais); MG, magnocelular (painéis inferiores). Ir, imunorreatividade em Unidades Arbitrárias. * vs Semana 0, † vs S, $P < 0,05$.

Assim como o observado na expressão gênica, a expressão proteica de OT também apresentou alterações temporais durante as 8 semanas de treinamento. A Figura 14 mostra já na 2ª. semana intenso aumento na OTir no subnúcleo ventromedial, com elevação marcante ainda na 8ª. semana de treinamento, quando comparado a seu controle temporal. Alterações de pequena magnitude foram observadas no ‘*dorsal cap*’, mas nenhuma modificação parece ter ocorrido no subnúcleo magnocelular. Estas observações qualitativas foram confirmadas pela quantificação da densidade integrada nestes subnúcleos (Tabela 4 e Figura 15): houve em T₂ aumento de 66% na OTir do subnúcleo ventromedial ($P < 0,05$), com aumentos proporcionalmente menores em T₄ e T₈ (+45%, $P < 0,05$ e +24%, $P > 0,05$, respectivamente quando comparados à S₀. No entanto observou-se marcante redução da OTir em S₈, de

forma que ao final dos protocolos a OT_{ir} do ventromedial dos ratos treinados encontrava-se cerca de 5,8 vezes mais elevada que a de seus controles temporais (Tabela 4, painel superior esquerdo da Figura 15). Alterações similares, de menor magnitude foram observadas no ‘*dorsal cap*’: +27% em T₄ vs S₀, que no entanto não atingiram níveis de significância (P = 0,114 para o fator grupo). Houve no entanto redução significativa da OT_{ir} durante as 8 semanas experimentais (-37% em S₈ vs S₀, Tabela 4 e painel intermediário esquerdo da Figura 15). No subnúcleo magnocelular houve perfeita sobreposição da OT_{ir} de ratos treinados e sedentários, que também apresentaram redução significativa do conteúdo proteico de OT ao longo das 8 semanas experimentais (queda de aproximadamente 50% para T₈ e S₈ vs S₀, P<0,05, Tabela 4 e painel inferior esquerdo da Figura 15).

Quanto à expressão de DBH dados quantitativos indicaram aumento mantido de 60% na DBH_{ir} do ventromedial de T₂ a T₈ (P<0,05 para T₈ vs S₀, Tabela 4 e painel superior direito da Figura 15) e ligeiras elevações, não significativas, da DBH_{ir} no ‘*dorsal cap*’ e magnocelular ao longo do treinamento (Tabela 4 e painéis médio e inferior direito da Figura 15). Ao contrário do observado para a expressão proteica de OT em que seu conteúdo reduzia com a idade, não se observou, nos 3 subnúcleos durante as 8 semanas experimentais, redução significativa do conteúdo de DBH_{ir}. As pequenas reduções observadas em S₈ vs S₀ não atingiram níveis de significância (Tabela 4 e painéis à direita na Figura 15).

4.2.5 *Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre o conteúdo proteico de DBH e VP nos diferentes subnúcleos do PVN medial*

As Figuras 16 e 17 e a Tabela 5 ilustram os resultados obtidos sobre os efeitos do treinamento sobre a expressão proteica de VP e DBH no PVN medial.

Figura 17 – Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre conteúdo de VP (painéis à direita) e DBH (painéis à esquerda) em diferentes subnúcleos do PVN medial: VM, ventromedial (painéis superiores); DC, *dorsal cap* (painéis centrais); MG, magnocelular (painéis inferiores). Ir, imunorreatividade em Unidades Arbitrárias. * vs Semana 0, $P<0,05$.

Dados da densidade integrada indicaram que o treinamento determinou na 2^a. semana aumentos significativos mas transitórios no conteúdo de VP nos subnúcleos ventromedial (+143%) e magnocelular (+58%). Estas alterações não se mantiveram, voltando aos níveis basais a partir da 4^a. semana de treinamento (Tabela 5 e painéis superior e inferior direitos da Figura 17). Houve no subnúcleo ‘*dorsal cap*’ alteração transitória, não significativa, da VPir em T₂, mas redução de seu conteúdo em S₈ vs S₀ (-52%, $P<0,05$, Tabela 5 e painel central à esquerda da Figura 17). Embora o treinamento mostrasse nas semanas 1 e 2 tendência à redução da imunorreatividade para o DBH em áreas do PVN ocupadas pelos neurônios VPérgicos, a redução só atingiu níveis de significância no subnúcleo ‘*dorsal cap*’ (-43% e -28% em T₁ e T₂, respectivamente, $P<0,05$, Tabela 5 e painel central à esquerda da

Figura 17). Não houve nos 3 subnúcleos, durante as 8 semanas experimentais, alteração significativa do conteúdo de DBHir.

4.2 Efeitos da desnervação sino-aórtica em ratos sedentários e treinados por 12 semanas (protocolo SAD vs SHAM)

4.2.1 Desempenho em esteira

O teste de esforço máximo mostrou que os ratos Wistar intactos atingiram velocidade de $1,20 \pm 0,03$ km/h. Após as cirurgias de SAD ou fictícia, observamos pequena queda no desempenho em esteira que só atingiu níveis significativos nos ratos desnervados ($-0,15 \pm 0,05$ km/h e $-0,21 \pm 0,05$ km/h, para SHAM e SAD, respectivamente Tabela 6, Figura 16).

Tabela 6 - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo antes e após as cirurgias SHAM e SAD. * denota uma alteração significativa ($p < 0,05$).

Desempenho em esteira	SHAM (n=30)	SAD (n=31)
<i>antes da cirurgia</i>	$1,20 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,04$
<i>depois da cirurgia</i>	$1,07 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,05^*$
<i>Efeito da cirurgia</i>	$-0,15 \pm 0,09$	$-0,21 \pm 0,05^*$

Figura 16 - Variação do desempenho em esteira (pós-cirurgia menos pré-cirurgia) nos grupos SAD e SHAM. * denota uma alteração significativa ($p < 0,05$).

Este efeito não impediu, no entanto, a melhora de desempenho nos ratos SAD durante o treinamento aeróbio, pois como mostrado na Tabela 7 e Figura 17, o aumento da velocidade atingida nos testes máximos foi progressivo e paralelo ao observado para os ratos SHAM. Por outro lado, SAD mantidos sedentários apresentaram queda significativa de desempenho (Figura 17). Observamos também que ao final dos protocolos o ganho de desempenho (semana 12 - semana 0) foi similar para os grupos SAD e SHAM ($+0,47 \pm 0,10$ km/h e $+0,33 \pm 0,11$ km/h, respectivamente).

Tabela 7 - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 6, 12 e ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). * vs semana 0; † vs S, # diferente de zero, $p < 0,05$

	SHAM		SAD	
	Wistar-S (n=14)	Wistar-T (n=16)	Wistar-S (n=14)	Wistar-T (n=17)
<i>Semana 0</i>	$1,07 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,05$
<i>Semana 6</i>	$0,81 \pm 0,11$	$1,37 \pm 0,07^{*†}$	$0,72 \pm 0,08^{*}$	$1,24 \pm 0,07^{*†}$
<i>Semana 12</i>	$0,96 \pm 0,11$	$1,59 \pm 0,08^{*†}$	$0,71 \pm 0,07^{*}$	$1,36 \pm 0,07^{*†}$
<i>Ganho ($S_{12} - S_0$)</i>	$-0,04 \pm 0,12$	$+0,47 \pm 0,10^{*†\#}$	$-0,36 \pm 0,09^{\#}$	$+0,33 \pm 0,11^{\#†}$

Figura 17 - Evolução temporal do desempenho em esteira nos grupos SHAM e SAD durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs semana 0; † vs. S, $p < 0,05$.

4.2.2 Parâmetros hemodinâmicos

Ao final dos protocolos experimentais os ratos foram anestesiados e tiveram a artéria femoral canulada para registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em repouso e durante exercício dinâmico em esteira em 2 velocidades: 0,30 e 0,45 km/h. A PAM basal dos SAD mostrava-se pouco mais elevada que a do grupo SHAM (Tabela 8, Figura 18) mas o treinamento não alterou a PAM em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, o treinamento aeróbio por 12 semanas mostrou-se eficaz em promover bradicardia de repouso no grupo SHAM (328 ± 9 vs 378 ± 10 b/min nos SHAM-S; Figura 19). Interessante observar-se que a desnervação sinoaórtica bloqueou a redução da FC basal nos SAD-T, revertendo-a à taquicardia (Tabela 8, Figura 19). Observamos também que a SAD promoveu aumento na resposta de PAM durante o exercício nas intensidades de 0,3 e 0,45 km/h e que o treinamento após SAD foi eficaz em reduzi-la apenas na intensidade de 0,3 km/h

Tabela 8 - Valores absolutos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso nos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs SHAM; † vs S, $p < 0,05$

		SHAM		SAD	
		S (n=12)	T (n=12)	S (n=9)	T (n=12)
Valores basais	PAM (mmHg)	122 ± 3	118 ± 2	$131 \pm 3^*$	$135 \pm 3^*$
	FC (b/min)	378 ± 10	$328 \pm 8^\dagger$	364 ± 9	$407 \pm 15^{*\dagger}$
Respostas ao exercício 0,3km/h	Δ PAM (mmHg)	$+ 10 \pm 2$	$+ 9 \pm 1$	$+ 21 \pm 3^*$	$+ 8 \pm 2^\dagger$
	Δ FC (b/min)	$+ 70 \pm 16$	$+ 82 \pm 15$	$+ 67 \pm 19$	$+ 47 \pm 14$
Respostas ao exercício 0,45km/h	Δ PAM (mmHg)	$+ 13 \pm 2$	$+ 13 \pm 2$	$+ 26 \pm 3^*$	$+ 23 \pm 4^*$
	Δ FC (b/min)	$+ 84 \pm 14$	$+ 97 \pm 13$	$+ 89 \pm 17$	$+ 83 \pm 14$

Figura 18 - Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM) basal nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs. Sham ($p < 0,05$).

Figura 19 - Comparação dos valores de Frequência Cardíaca (FC) basal nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs. SHAM, † vs. S. ($p < 0,05$)

Nas Figura 18 e 19 ilustramos para os grupos SHAM e SAD, sedentários e treinados, as variações da PAM (Figura 8) e FC (Figura 9) durante as 2 intensidades do exercício agudo. A PAM aumentou de forma similar nos grupos S e T (com uma pequena diferença entre SAD-T e SAD-S em 0,30 km/h, conforme já ressaltado), porém após SAD os aumentos foram significativamente que os observados nos grupos SHAM (Figura 18). Em todos os grupos a resposta taquicárdica foi proporcional à intensidade do exercício (Figura 9) e à semelhança de seus efeitos sobre a FC basal, o treinamento no grupo SHAM deslocou as

respostas taquicárdicas para um patamar inferior, enquanto que no grupo SAD as respostas taquicárdicas ao exercício foram deslocadas para um patamar superior de FC.

Figura 20 - Respostas de PAM ao exercício agudo (0,30 e 0,45 km/h) nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs. Sham, ($p < 0,05$)

Figura 21 - Respostas taquicárdicas ao exercício agudo (0,30 e 0,45 km/h) nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). † vs. sedentário, ($p < 0,05$)

Após os registros hemodinâmicos, testamos o funcionamento do reflexo barorreceptor cardíaco para se avaliar a sensibilidade barorreflexa bem como a eficácia da cirurgia SAD. No grupo SHAM, o treinamento promoveu uma melhora significativa na sensibilidade do barorreflexo (aumentos de 25% e 34% para a bradicardia e taquicardia reflexas, respectivamente – dados na Tabela 9). Por outro lado, após a SAD, tanto a bradicardia quanto a taquicardia reflexas de sedentários e treinados foram acentuadamente reduzidos

quando comparados a seus respectivos controles SHAM (valores na faixa de 0,33 a 0,48 b/min/mmHg, correspondendo a reduções de cerca de 83%). Nesta situação o treinamento aeróbio não foi capaz de alterar a resposta barorreflexa (Tabela 9). Na Figura 20 comparamos a sensibilidade média do barorreflexo nas diferentes situações experimentais, mostrando o ganho de sensibilidade pelo T e seu completo bloqueio pela SAD.

Tabela 9 - Sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas nos grupos SHAM e SAD, treinados (T) ou mantidos sedentários (S). * vs SHAM, † vs S, $p < 0,05$.

Sensibilidade (b/min/mmHg)	SHAM		SAD	
	S	T	S	T
Bradicardia reflexa	1,96±0,23	2,44±0,24†	0,33±0,10*	0,21±0,02*
Taquicardia reflexa	2,68±0,18	3,59±0,22†	0,48±0,08*	0,31±0,07*

Figura 22 - Sensibilidade média do reflexo barorreceptor cardíaco durante hipertensões e hipotensões transitórias nos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). * vs. Sham, † vs. S, ($p < 0,05$).

4.2.3 Expressão gênica de DBH, OT e VP em áreas de controle autonômico

Após os experimentos funcionais os ratos foram profundamente anestesiados e perfundidos com salina. O encéfalo foi rapidamente removido e mantido em gelo seco para obtenção de fatias encefálicas, interessando o hipotálamo e áreas bulbares. *Punches* do PVN e DBS foram obtidos e armazenados em Trizol® no freezer -80 °C.

Até o presente momento, analisamos pelo PCR-RT em tempo real a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de DBH, OT e VP no PVN e de DBH no DBS. Não quantificamos OT e VP em áreas bulbares, uma vez que os corpos celulares destes neurônios

localizam-se no PVN. Conforme apresentado na Tabela 10 e Figura 21, houve grande variabilidade na expressão de RNAm de DBH no DBS, correspondendo à região do NTS, com aumento de 3,1 vezes nos SHAM-T vs SHAM-S. Observamos também que a SAD bloqueou o aumento induzido pelo treinamento, sem no entanto alterar seus níveis basais. O mesmo padrão de resposta foi observado para a expressão de RNAm de DBH no PVN, ou seja, o treinamento aumentou de 2,2 vezes o conteúdo de DBH no PVN de ratos SHAM (de $1,37 \pm 0,64$ para $3,05 \pm 1,64$ UA, Tabela 10, Figura 22), sendo esta resposta bloqueada no grupo SAD.

Tabela 10 - Comparação da expressão gênica (em unidades arbitrárias) de DBH no NTS e PVN e de OT e VP no PVN, nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S). * vs SHAM, $p < 0,05$

Área		SHAM		SAD	
		S	T	S	T
NTS	DBH	$1,59 \pm 0,48$	$4,93 \pm 2,71$	$1,26 \pm 0,48$	$1,58 \pm 0,51$
	DBH	$1,37 \pm 0,64$	$3,05 \pm 1,64$	$0,67 \pm 0,37$	$0,94 \pm 0,54$
PVN	OT	$0,93 \pm 0,27$	$0,60 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,01^*$	$0,02 \pm 0,01^*$
	VP	$1,61 \pm 0,48$	$0,94 \pm 0,28$	$0,03 \pm 0,02^*$	$0,02 \pm 0,01^*$

Figura 23 - Comparação da expressão de RNAm de dopamina beta-hidroxilase (DBH) no NTS dos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).

Figura 24 - Comparação da expressão de RNAm de dopamina beta-hidroxilase (DBH) no PVN dos grupos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).

Analizamos também os efeitos do treinamento e da SAD sobre a expressão gênica de OT (Figura 25A) e VP (Figura 25B) no PVN. No grupo SHAM o treinamento não alterou significativamente a expressão destes genes ($S = 0,93 \pm 0,27$ e $T = 0,60 \pm 0,08$ UA para a OT RNAm; $S = 1,61 \pm 0,48$ e $T = 0,94 \pm 0,28$ UA, para a VP RNAm, Tabela 10). Por outro lado a SAD aboliu completamente a expressão de RNAm de OT e VP (Figura 25A e 25B, valores na Tabela 10). Assim como o observado para DBH, o treinamento aeróbio também não foi capaz de reverter o efeito da SAD.

Figura 25 - Comparação da expressão gênica de ocitocina (OT mRNA, painel A) e vasopressina (VP mRNA, painel B) no PVN de ratos SHAM e SAD sedentários (S) e treinados (T). * vs. Sham ($p < 0,05$).

4.2.4 Expressão proteica de OT e DBH nas subáreas do PVN

Figura 26 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre os valores de densidade de OT (figuras A, B e C) e DBH (D, E e F) em diferentes subnúcleos do PVN medial, ventromedial, dorsal cap e magnocelular. Significâncias ($p < 0,05$) * vs Sham; † vs S.

Os dados quantitativos dos 4 grupos experimentais são apresentados na Tabela 11 e comparados na Figura 26. Observa-se que os neurônios OTérgicos estão concentrados no subnúcleo ventromedial. A Figura v ilustra e compara a imunofluorescência de neurônios OTérgicos e de DBH do PVN medial em sedentários e treinados. Observa-se densa marcação nos subnúcleos ventromedial, dorsal cap e magnocelular e que o treinamento foi acompanhado de aumento da fluorescência. Assim como os dados de mRNA, os neurônios OTérgicos foram muito deprimidos após a SAD e não afetados pelo treinamento (Figura 26).

Há após T aumento da imunofluorescência no VM para OT nos grupos SHAM (94%); enquanto que a SAD é acompanhada de grande redução da densidade de neurônios OTérgicos e ausência dos efeitos do TF (49% e 91% vs. Sham). No entanto o T não foi capaz de alterar o conteúdo de OT no DC e MG, mas, assim como no VM, a SAD reduz significativamente o conteúdo de OT (56% no DC vs Sham e 54% no MG vs. Sham)

Dados do DBH marcados com OT, não demonstraram grandes alterações significativas, apenas um aumento de DBH propiciado pela SAD (+44% vs. Sham) no VM. O T oferece aumento discreto no conteúdo de DBH no VM de apenas 26%, porém não é uma alteração significativa. Nas subáreas do DC e MG, nem o T nem a SAD alteram o conteúdo proteico de DBH.

Figura 27 – Razão de DBH/OT para os diferentes grupos em diferentes subnúcleos do PVN medial, ventromedial, dorsal cap e magnocelular. Significâncias ($p < 0,05$) * vs Sham.

Ao estabelecer uma razão entre o conteúdo de DBH e OT, observamos que o T pouco altera essa relação. No entanto, a SAD aumenta essa razão intensificada quando a SAD é associada pelo T, diferença significativa nas 3 subáreas (SAD-T vs. Sham-T).

4.2.5 Expressão proteica de DBH e VP nas subáreas do PVN

Figura 28 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre os valores de densidade de VP (figuras A, B e C) e DBH (D, E e F) em diferentes subnúcleos do PVN medial, ventromedial, dorsal cap e magnocelular. Significâncias ($p < 0,05$) * vs Sham; † vs S.

Os dados quantitativos dos 4 grupos experimentais são apresentados na Tabela 12 e comparados na Figura 28. Observa-se que os neurônios VPérgicos estão concentrados no subnúcleo magnocelular e estão em menor quantidade, quando comparado com OT. A Figura X ilustra e compara a imunofluorescência de neurônios OTérgicos e de DBH do PVN

medial em sedentários e treinados. Observa-se que o treinamento foi acompanhado de diminuição da fluorescência no dorsal cap e no magnocelular (-33% e -23% vs. Sedentário, respectivamente), sem alterar o seu conteúdo no VM. Diferente da observada com os neurônios de OT, a SAD alterou pouco o conteúdo de VP, apresentando diferença significativa apenas no dorsal cap em ambos os grupos (-80% nos SAD-S e -65% nos SAD-T, ambos vs. Sham), e no magnocelular apenas em SAD-S (-58% vs. Sham).

Ao analisar os dados de DBH marcados com VP, não observamos nenhuma alteração propiciada pelo T e/ou pela SAD.

Figura 29 – Razão de DBH/OT para os diferentes grupos em diferentes subnúcleos do PVN medial, ventromedial, dorsal cap e magnocelular. Significâncias ($p < 0,05$) * vs Sham.

Analisando a razão entre o conteúdo de DBH e VP, o treinamento não propicia nenhuma alteração, porém quando observamos o efeito da SAD, notamos que na subárea dorsal cap,

há um grande aumento significativo. Nos neurônios do magnocelular, a desnervação causa um aumento da razão nos SAD-S, mas o treinamento reverte o efeito da SAD.

5 DISCUSSÃO

Tratam-se de resultados parciais. Não temos ainda os resultados da imuno-histoquímica e o u do PCR ainda não está completo, mas os dados obtidos já nos permitem afirmar que o treinamento aeróbio:

- ativa as projeções NORégicas ascendentes do NTS ao PVN (aumento da expressão de DBH no NTS),
- ativa projeções NORégicas do PVN a outras áreas suprabulbares de integração (aumento da expressão de DBH no PVN),
- ativa a expressão gênica e a plasticidade neuronal em áreas hipotalâmicas de controle pré-autônômico (aumento da expressão de OT e VP no PVN),
- que as alterações da expressão gênica de DBH no NTS e de OT e VP no PVN ocorrem simultaneamente, sugerindo importante ativação desta via de controle após 4 semanas de treinamento,
- que a desnervação sinoaórtica, impedindo o funcionamento desta via aferente de controle cardiovascular, abole os efeitos benéficos do treinamento, conforme indicado pela inibição do aumento da expressão de DBH induzido pelo treinamento e pelo completo bloqueio da expressão de OT e VP, simultaneamente ao bloqueio da bradicardia de repouso nos SAD-T.

5.1 *Efeitos benéficos do treinamento*

O protocolo aeróbio de baixa intensidade tem sido extensivamente utilizado como ferramenta não farmacológica para um melhor controle de parâmetros cardiovasculares em diferentes patologias (CHOBANIAN et al, 2003; CAMPOS et al, 2012; PESCATELLO et al, 2004). O protocolo que utilizamos fixa uma carga de 50-60% da velocidade máxima atingida nos testes de esforço máximo, faixa em que como observamos anteriormente há nítida melhora da capacidade aeróbia do rato mantendo o predomínio do metabolismo aeróbio para a produção de energia durante a realização do exercício físico, ou seja, a glicólise tecidual não ultrapassa a utilização do piruvato mitocondrial, sendo o lactato produzido completamente removido, ou seja, há a manutenção do lactato sanguíneo em $\sim 3\text{nmol/L}$ (CERONI et al., 2009; FERREIRA et al., 2007; HIGA et al., 2007; HIGATANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009; JACKSON et al., 2005; MARTINS et al., 2005).

Em trabalho anterior já havia sido demonstrado que a faixa de treinamento aeróbio até 65% da capacidade máxima é a que promove adaptações benéficas ao sistema cardiovascular do rato, enquanto que exercícios aeróbios realizados acima dos 85% da capacidade máxima não são acompanhados de efeitos benéficos (GAVA et al, 1995).

Nossos resultados confirmaram que o treinamento aeróbio a 50-60% de intensidade foi eficaz em determinar a instalação da bradicardia de repouso em ratos normotensos submetidos ao treinamento por 12 ou 8 semanas, indicando adicionalmente que a instalação da bradicardia é progressiva ao longo do treinamento, atingindo níveis de significância a partir da 4ª. semana de treinamento. Similarmente ao observado em trabalhos anteriores do laboratório, também constatamos que o treinamento aeróbio não modifica a PA basal de ratos normotensos (CERONI et al., 2009; HIGA et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009; JACKSON et al., 2005; MARTINS et al., 2005).

5.2 *Efeitos da SAD*

Observamos ainda que a SAD reduziu o desempenho dos ratos na esteira mas não impediu o ganho de performance pelo treinamento, bloqueou a instalação da bradicardia de repouso, diminuiu a expressão do DBH e aboliu a expressão dos genes OT e VP e que nesta situação o exercício repetitivo não foi capaz de reverter estes efeitos. Estes resultados confirmam algumas observações anteriores de Ceroni et al. (2009) de que a SAD reduzia o desempenho dos animais na esteira ergométrica, mas não impedia seu ganho final, uma vez que ao final dos protocolos os ratos de ambos os grupos treinados mostraram ganho de desempenho similar, confirmando a eficácia do treinamento em melhorar a capacidade tanto dos SAD como dos SHAM.

Nossos dados hemodinâmicos, mostraram ainda que o treinamento aeróbio foi eficaz em induzir bradicardia de repouso no grupo SHAM, confirmando ser esta variável bom marcador da eficiência do treinamento, de forma análoga a demonstrações anteriores de nosso laboratório (AMARAL et al., 2001; CERONI et al, 2009; HIGA et al, 2007; MARTINS et al, 2005). De fato, a redução da FC basal é uma característica marcante do treinamento aeróbio e um indicativo de sua eficiência (CLAUSEN et al., 1977; SCHEUER et al, 1977). Por outro lado, a SAD determinou alterações opostas, ou seja, aumento significativo da FC basal. Estes resultados reforçam dados anteriores do laboratório (CERONI et al., 2009) de que o efeito benéfico do treinamento sobre o sistema

cardiovascular depende da integridade dos barorreceptores, essenciais para o controle momento-a-momento da PA (DAMPNEY, 1994; MICHELINI, 2008). Demonstram ainda a importância da ativação das vias NORégicas do NTS que ascendem ao PVN para a modulação da plasticidade de neurônios OTérgicos e VPérgicos pelo treinamento (CAVALLERI et al, 2011; CRUZ et al, 1012).

Além dos efeitos do treinamento sobre os níveis basais de FC, observamos também haver durante o exercício dinâmico uma menor resposta taquicárdica (mas sempre proporcional à intensidade do exercício) nos SHAM-T quando comparados aos SHAM-S e que esta resposta foi novamente bloqueada pela SAD (à semelhança do observada para os valores basais de FC, a taquicardia do exercício foi aumentada pela SAD). Portanto os efeitos benéficos de treinamento se fazem não só sobre níveis basais de FC, mas também sobre suas respostas do exercício. Houve também após a SAD maior resposta pressora ao exercício dinâmico. Sem a ação dos barorreceptores não há correção instantânea da elevação da PA induzida pela atividade motora resultando em maior aumento da PA (DAMPNEY, 1994; MICHELINI, 1998, 2001).

As alterações de FC observadas nos SHAM-T pode ser devida à sensível melhora da sensibilidade dos barorreceptores induzidas neste grupo pelo treinamento, uma vez que após SAD não há atividade barorreflexa e os efeitos benéficos do treinamento não se manifestam. Realmente trabalhos anteriores já haviam indicado a potencialidade do treinamento em facilitar o controle reflexo da FC em normotensos e hipertensos (BRUM et al., 2000; CERONI et al., 2009).

Interessante foi a observação de que o aumento da sensibilidade dos barorreceptores após treinamento no grupo SHAM foi acompanhado de aumento na expressão gênica de DBH (2,2 vezes vs controle sedentário), o que confirma que o aumento da atividade aferente dos receptores durante exercício repetitivo aumenta a sinalização NORégica do NTS ao PVN, a qual, por sua vez determina maior excitabilidade dos neurônios pré-autonômicos do PVN aos quais as vias NORégicas ascendentes se projetam (JACKSON et al, 2005; HIGA, 2007; MICHELINI; STERN, 2009). Em concordância a esta observação, Higa et al. (2007) descreveram que o treinamento induzia plasticidade nas vias NORégicas ascendentes, com aumento do número de botões DBH positivos em neurônios OTérgicos do PVN que se projetam ao complexo solitário-vagal. Uma observação original desse trabalho foi de que a plasticidade de neurônios NORégicos dependente do treinamento aeróbio, é em parte dependente da ativação dos barorreceptores, uma vez que nos grupos SAD observamos uma

importante redução da expressão gênica de DBH. É importante ressaltar que após SAD o aumento da expressão de DBH no PVN e NTS induzidos pelo treinamento foi bloqueado, mas não se anulou a expressão basal uma vez que muitas vias ascendentes do tronco cerebral ao hipotálamo) e outras áreas de integração (além das ativadas pelos barorreceptores e quimiorreceptores carotídeos são NORégicas. De fato, afências dos receptores cardiopulmonares, que não foram lesionadas, e também se projetam do tronco cerebral ao PVN através de vias catecolaminérgicas (SAWCHENKO; SWANSON, 1981).

Observamos também que a SAD aboliu a expressão gênica de OT e VP no PVN. Sabe-se que vias OTérgicas e VPérgicas participam no controle autonômico cardiovascular e que as mesmas são moduladas pelo treinamento aeróbio (MICHELINI, 2001, 2007; BRAGA et al., 2000; CAVALLERI et al, 2011; CRUZ et al, 2012; DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI; STERN, 2009). Projeções OTérgicas do PVN ao NTS são ativadas pelo treinamento facilitando o tônus vagal ao coração e determinando redução frequência cardíaca basal. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram a redução da resposta taquicárdica ao exercício em normotensos treinados após administração de OT no complexo solitário-vagal (BRAGA et al., 2000; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009) e bloqueio da bradicardia de repouso acompanhada de marcante redução de densidade de neurônios OTérgicos no PVN após a desnervação sino-aórtica (CAVALLERI et al, 2011). Os resultados do presente trabalho vem acrescentar que esta adaptação dos neurônios OTérgicos ao treinamento, bem como sua tonicidade é mediada pela informação aferente carreada pelos projeções NORégicas ao PVN.

Quanto às projeções VPérgicas ao complexo solitário-vagal Michelini; Bonagamba (1988) demonstraram que administração de VP no NTS determina deslocamento da faixa de funcionamento dos barorreceptores para níveis mais elevados de FC, atenuando a bradicardia reflexa durante aumento da PA induzida pelo exercício. Trabalhos posteriores demonstraram também que o exercício dinâmico determina maior liberação de VP no NTS, contribuindo significativamente para a taquicardia do exercício (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI; STERN, 2009). Acredito que com a obtenção dos resultados de imunohistoquímica para a VP no PVN, e possíveis alterações da densidade de projeções NORégicas a estes neurônios (a serem evidenciados pelos experimentos de dupla marcação) possam nos fornecer elementos adicionais para se explicar as alterações obtidas frente a DAS e ao treinamento.

5.3 Alterações sequenciais induzidas pelo treinamento

Embora vários trabalhos de nosso e outros laboratórios já tenham confirmado os efeitos benéficos do treinamento sobre a FC e a resposta taquicárdica ao exercício (CAVALLERI et al, 2011; CERONI et al, 2009; CLAUSEN, 1977; CRUZ et al, 2012; FELIX; MICHELINI, 2007; HIGA et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009), o presente trabalho demonstra que a instalação destas adaptações é progressiva, aparecendo bem antes do final dos protocolos experimentais. De fato, estudos anteriores de nosso laboratório já haviam ressaltado o caráter progressivo de várias adaptações induzidas no controle autonômico e no sistema cardiovascular pelo treinamento aeróbio (RUGGERI, 2012; SILVA Jr, 2011; ZAMPIERI, 2011). Observamos já a partir da 1ª. semana de treinamento redução da resposta taquicárdica ao exercício dinâmico, mantida entre T1 e T4, que foi acompanhada por ligeira queda, embora não significativa, da FC basal. Por sua vez a bradicardia de repouso se instalou após 8 semanas de treinamento, quando observamos uma queda adicional na taquicardia do exercício. Interessante observar-se que a instalação da bradicardia de repouso e a menor resposta taquicárdica foram precedidas pelo aumento da expressão de DBH no NTS (em T4) que ocorria simultaneamente ao marcante aumento da expressão de OT e VP no PVN, sugerindo que alterações plásticas desta via neuronal eram necessárias para a manifestação das respostas adaptativas da FC ao treinamento. Observamos também um aumento precoce da expressão de DBH no PVN (T2). Os dados experimentais até agora obtidos não nos permitem explicar esta alteração, mas é possível que neurônios NORégicos cujos corpos celulares se encontram no PVN e que projetam a outras áreas prosencefálicas e/ou córtex motor possam também ser ativados pelo exercício repetitivo, ativando outras circuitarias neuronais integrativas além das conexões recíprocas entre NTS e/ou outras áreas bulbares e PVN (BUIJS et al, 1978; SAWCHENCO; SWANSON, 1981; 1982).

Trabalhos anteriores de nosso laboratório já haviam demonstrado que alterações na atividade de neurônios OTérgicos e VPérgicos subsequente ao treinamento eram condicionantes das respostas cardiovasculares ao exercício (JACKSON et al, 2005; MARTINS et al, 2005; MICHELINI, 2007 a, b; MICHELINI; STERN, 2009): a bradicardia de repouso sendo pela ativação de projeções OTérgicas do PVN ao complexo solitário-vagal, que atuam aumentando a atividade vagal (CAVALLERI et al., 2011; MARTINS et al., 2005; MICHELINI & STERN, 2009), o *resetting* do reflexo barorreceptor durante

aumento de PA observado no exercício dinâmico sendo explicado pela ativação de projeções VPérgicas do PVN ao NTS, que propiciam o deslocamento da curva de funcionamento dos barorreceptores para níveis mais elevados de PA e FC, ocluindo desta forma a bradicardia reflexa (MICHELINI, 2007a, b ; MICHELINI; STERN, 2009). Os resultados do presente trabalho vem acrescentar a informação de que estas adaptações de neurônios VPérgicos e OTérgicos ao treinamento são mediadas pelas projeções NORégicas do NTS ao PVN, que interconectam as informações carregadas pelos barorreceptores e quimiorreceptores que ascendem ao NTS com os neurônios hipotalâmicos pré-autonômicos.

Como ressaltado inicialmente, nossos resultados ainda não estão completos, mas indicam que o exercício realizado cronicamente, aumentando a sinalização dos aferentes periféricos ao NTS (e outras áreas bulbares), aumenta também a sinalização do NTS a neurônios pré-autonômicos do PVN (e outras áreas de controle supra-bulbar), a qual é mediada por projeções NORégicas ascendentes como detectado pelo aumento da expressão de DBH, em áreas de controle autonômico. Analisando a sequencia temporal destas alterações, pudemos também observar que o aumento da expressão de DBH no NTS determinado pelo treinamento ocorre simultaneamente à alteração da plasticidade de neurônios pré-autonômicos OTérgicos e VPérgicos no PVN, caracterizado pelo aumento de sua expressão gênica, sugerindo a ativação desta via neste tempo experimental. Além disto, o bloqueio dos efeitos do treinamento sobre a expressão de DBH, bem como a ausência da expressão de OT e VP após a desnervação sinoaórtica, sugerem o papel fundamental desempenhado pelas aferências periféricas e vias NORégicas ascendentes em mediar as informações ascendentes a centros de integração autonômica, bem como sua plasticidade neuronal.

Portanto, as adaptações cardiovasculares induzidas pelo treinamento dependem da atividade conjunta das alças primária (de integração bulbar) e secundária do controle cardiovascular (de integração hipotalâmica), sendo as projeções NORégicas ascendentes do NTS ao PVN fundamental importância para interconectar a atividade barorreflexa e quimiorreflexa com os neurônios pré-autonômicos de integração, responsáveis por desencadear os ajustes cardiovasculares induzidas pelo treinamento aeróbio.

REFERÊNCIAS*¹

AMARAL, S. L.; SILVEIRA, N. P.; ZORN, T. M. T.; MICHELINI, L. C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 19, n. 5, p. 931-940, 2001.

AMARAL, S. L.; ZORN, T. M. T.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 18, p. 1563-1572, 2000.

BAILEY, T. W.; JIN Y. H.; DOYLE, M. W.; SMITH, S. M.; ANDRESEN, M. C. Vasopressin inhibits glutamate release via two distinct modes in the brainstem. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 6131-6142, 2006.

BISSET, G. W.; CHOWDREY, H. S. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. **J. Exp. Physiol.**, v. 73, p. 811-872, 1988.

BRAGA, D. C.; MORI, E.; HIGA, K. T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 278, p. R1474-R1482, 2000.

BRUM, P. C.; SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-1022, 2000.

BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F. W. Intra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell Tiss. Res.**, v. 186, p. 423-433, 1978.

CAMPOS, J. C.; QUELICONI, B. B.; DOURADOS, P. M. M.; CUNHA, T. F.; ZAMBELLIS, V. O.; BECHARA, L. R. G.; KOWALTOWSKI, A. J.; BRUM, P. C.; ROSEN, D. M.; FERREIRA, J. C. B. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. **Plos One**, v. 7, p. 1-12, 2012.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent signaling drives oxytocinergic pre-autonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, p. 258-266, 2011.

CERONI, A.; CHAAR, L. J.; BOMBEIN, R. L.; MICHELINI, L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp. Physiol.**, v. 94, p. 630-640, 2009.

CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. **J. Hypertens.**, v. 9, p. 675-694, 1991.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHAN, R. K. W.; SAWCHENKO, P. E. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 371-387, 1998.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L. JR.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. JR.; ROCCELLA, E. J. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-1252, 2003.

CLAUSEN, J. P. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. **Physiol. Rev.**, v. 57, p. 779-815, 1977.

CRUZ, J. C.; CAVALLERI, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Peripheral chemoreceptors mediate training-induced plasticity in paraventricular nucleus pre-autonomic oxytocinergic neurons. **Exp. Physiol.**, v. 98, p. 386-396, 2012.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 323-364, 1994.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol. Regulatory, Integrative Comp. Physiol.**, v. 27, p. R1271-R1282, 1997.

FÉLIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 50, p. 780-785, 2007.

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, n. 2, p. 760-765, 2007.

GAVA, N. S.; VERAS-SILVA, A. S.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, p. 1129-1133, 1995.

GUYENET, P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. **Respire Physiol.**, v. 121, p. 147-162, 1998.

HIGA, K. T.; MORI, E.; VIANA, F. F.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitarii vagal complex. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 282, p. R537-R545, 2002.

HIGA, K. T.; PORTO, F. C.; SILVA, H. M. V.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. R1717-R1727, 2007.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; FÉLIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. **Exp. Physiol.**, v. 94, n.11, p. 1103-1113, 2009.

JACKSON, K.; SILVA H. M. V.; ZANG, W.; MICHELINI, L. C., STERN, J. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **J. Neurophysiol.**, v. 94, p. 3211-3220, 2005.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. **J. Comp. Neurol.**, p. 308-332, 1985.

MARTINS, A. S.; CRESCENZI, A.; STERN, J. E.; BORDIN, S.; MICHELINI, L. C. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. **Hypertension**. v. 46[part2], p. 1-6, 2005.

MICHELINI, L. C. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 1017-1032, 1994.

MICHELINI, L. C. Endogenous vasopressin and the central control of heart rate during dynamic exercise. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 1185-1195, 1998.

MICHELINI, L. C. Oxytocin into the NTS: a new modulator of cardiovascular control during exercise. **Annals New York Acad. Sci.**, v. 940, p. 206-220, 2001.

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, p. 369-376, 2007a.

MICHELINI, L. C. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 9, p. 214-221, 2007b.

MICHELINI, L. C. Regulação da pressão arterial: Mecanismos neurohormonais. In: AIRES, M.M. Fisiologia. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 571-593.

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. H. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. **Hypertension**, v. 11 [Suppl I], p. I.75-I.79, 1988.

MICHELINI, L. C.; MORRIS, M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular response to exercise. **Annals New York Acad. Sci.**, v. 897, p. 198-211, 1999.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 9, p. 947-960, 2009.

NEGRÃO, C. E.; MOREIRA, E. D.; BRUM, P. C.; KRIEGER, E. M. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 1045-1052, 1992.

NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E. A.; WITKINS, J.; MICHAELS, J.; HOFFMAN, D.; SILVERMAN, A. J. Magnocellular hypothalamic projection to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin–neurophysin system compared to the vasopressin–neurophysin system. **Neuroendocrinology**, v. 30, p. 150–158, 1980.

PALKOVITS, M. The anatomy of central cardiovascular neurons. In: FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, B.; HÖKFELT, T. (Ed.). **Central Adrenalin Neurons: basic aspects and their role in cardiovascular functions**. Oxford: Pergamon Press, 1980. p. 3–17.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1986.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A. Exercise and hypertension. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 35, p. 533–553, 2004.

PETERS, J. H.; MCDUGALL, S. J.; Kellett, D. O.; JORDAN, D.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; ANDRESEN, M. C. Oxytocin enhances cranial visceral afferent synaptic transmission to the solitary tract nucleus. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 11731–11740, 2008.

RUGGERI, A. **Evolução temporal dos efeitos do Treinamento aeróbico sobre o conteúdo de Ácido gama-aminobutírico e glutamato em áreas de controle autonômico de ratos normotensos e hipertensos**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SAWCHENKO, P.; SWANSON, L. W. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. **Science**, v. 214, p. 685–687, 1981.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 205, p. 260–272, 1982.

SOFROVIEW, M. V.; SCHRELL, U. Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neuron. **Neurosci. Lett.**, v. 22, p. 211–217, 1981.

SOUZA, C. G. G. T.; MICHELINI, L. C.; FIOR-CHADI, D. R. Receptor changes in the nucleus tractus solitarii of the rat following exercise training. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, p. 1471–1476, 2001.

SCHEUER, J.; TIPTON, C. M. Cardiovascular adaptations to physical training. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 39, p. 221–251, 1977.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 514–521, 2002.

SILVA JR, S. D. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de Ang I, Ang II e Ang (1-7) em diferentes segmentos arteriais de ratos WKY e SHR.** 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SVED, A. F.; GORDON, F. J. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. **News Physiol. Sci.**, v. 9, p. 243–246, 1994.

SVED, A. F.; ITO, S.; MADDEN, C. J. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. **Brain Res. Bull.**, v. 51, p. 129-133, 2000.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 269-324, 1983.

TIPTON, C. M. Exercise training for treatment of hypertension: a review. **Clin. J. Sports Med.**, v. 9, p. 104, 1999.

ZAMPIERI, T. T. **Efeitos sequenciais do treinamento físico sobre a plasticidade de vias ocitocinérgicas centrais em ratos normotensos e hipertensos.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.