KATIA BURGI

TIROSINA HIDROXILASE COMO MARCADOR DA
ATIVIDADE SIMPÁTICA EM VASOS MUSCULARES
ESQUELÉTICOS E RENAIIS DE RATOS NORMOTENSOS:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

KATIA BURGI

TIROSINA HIDROXILASE COMO MARCADOR DA
ATIVIDADE SIMPÁTICA EM VASOS MUSCULARES
ESQUELÉTICOS E RENAIIS DE RATOS NORMOTENSOS:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Fisiologia).

São Paulo - 2007

KATIA BURGI

TIROSINA HIDROXILASE COMO MARCADOR DA
ATIVIDADE SIMPÁTICA EM VASOS MUSCULARES
ESQUELÉTICOS E RENAIIS DE RATOS NORMOTENSOS:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

Qualificação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Fisiologia).

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Lisete Compagno Michelin

São Paulo - 2007

Dedicatória

*Dedico essa conquista à todos que me apoiaram,
compartilharam meus ideais,
e criaram as condições necessárias
para que eu fosse capaz de realiza-lo.*

Em especial meus pais

Wijntje Jacoba Aperloo Burgi e Rodolfo Burgi,

meus irmãos e

meu namorado Gustavo Favaro Arruda

por toda a compreensão e carinho indispensáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, na elaboração deste trabalho. Citando alguns nomes, certamente estarei cometendo algumas injustiças, mas por outro lado, não poderia deixar de mencionar tais agradecimentos.

Inicialmente agradeço à minha Lisete Compagno Michelinini pela oportunidade oferecida, pelo apoio, orientação e pelo conhecimento (de valor inestimável) a mim confiado.

Aos meus pais, por tudo que sou hoje, pelo exemplo de vida, pela confiança, amizade, incentivos, amor e esforços dedicados.

Ao meu sogro Homero Favaro Arruda (meu segundo orientador) pelo apoio e orientação ao longo do trabalho e à minha sogra Lucia Helena Favaro Arruda por acreditar em mim e me motivar a continuar, mesmo nos momentos de incertezas.

À Prof.^a Dr.^a Sonia pelas conversas e valiosos ensinamentos de vida e científicos.

À minha “prima- irmã” Marina Tuppy, minha companheira de todas as horas, por ser autêntica e amiga. Agradeço pelo convívio, pelas broncas e críticas, pelos elogios e principalmente, pelas risadas ao longo destes anos. Obrigada, Ma!!! (Vai ter que me a guentar por mais 4 anos).

À Maria Tereza Jordão, que veio para transformar a dupla inseparável em o “trio parada-dura”. Obrigada pela ajuda tanto científica como pessoal e claro pelas váaaaaaarias cervejas!!!! Amiga para todas as horas.

Ao Vinicius pelas conversas, risadas, cervejinhas e principalmente pelos conselhos tanto científicos como pessoais. Valeu Vi!!

Ao Adilson pela alegria cativante e pelo prazer de poder trabalhar em parceria. Obrigada por tudo!!!!

Ao Prof^a Dr^a Britto pelo enorme apoio, simpatia, colaboração e disponibilidade e pelas conversas científicas e não científicas também e por disponibilizar a utilização das dependências de seu laboratório para que os experimentos de imunohistoquímica fossem realizados.

A todos os integrantes e flutuantes do laboratório do professor Britto muito obrigada pela ajuda, simpatia, amizade e alegria!!!! Vocês foram maravilhosos!!!!

Ao Alexandre Ceroni pelos ensinamentos técnicos, pelas poucas lágrimas e muitas risadas.

Ao pessoal do ICB , Dedé, Tati, Aninha, Gabriel, Zé, Robinson, Silavana, Ana Paula, Gisele, Teca, e à todo o pessoal do “ Churrasco da Laje.

A meus irmãos e amigos, e em especial “Turma do FUTS”, Fabião, Fernando, que além de grandes parcerias, foram minha “base e família” em minha nova etapa de vida em São Paulo, agradeço pelo apoio, carinho e compreensão nas horas difíceis.

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

“Mire as suas metas na lua.

Porque se errar, ainda estará entre as estrelas”

(Paulo Coelho)

RESUMO

O treinamento físico reduz a pressão arterial (PA) e a resistência muscular esquelética somente em hipertensos, mas a bradicardia de repouso é observada em hipertensos e normotensos. Demonstramos anteriormente em normotensos que o T afeta a excitabilidade de neurônios pré-autonômicos (JACKSON et al., J.Neurophysiol, 2005). Neste estudo buscamos melhor caracterizar e comparar os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática vascular em territórios que respondem ao exercício com vasodilatação (musculatura esquelética) e vasoconstrição (rins), além das adrenais (resposta hormonal).

Ratos WKY machos (~2 meses) foram submetidos ao treinamento físico (50-60% capacidade máxima, 1hora/dia, 5 vezes/semana, 3 meses) ou mantidos sedentários (S) e, ao final dos protocolos, à canulação crônica para registro basal da PA e frequência cardíaca (FC). Foram a seguir anestesiados e perfundidos (PBS + PFA 4%) para retirada dos tecidos (músculos locomotores: sóleo, gastrocnêmio e grácil, não locomotores: temporal, rim e adrenais), que foram processados para imunohistoquímica ou Western Blot para Tirosina-Hidoxilase (TH) (enzima chave para a noradrenalina). Cortes (16µm, criostato) foram montados em lâminas e submetidos à imunohistoquímica para TH.

O treinamento físico aumentou a capacidade física ($+0.69 \pm 0.06$ km/h), promoveu bradicardia de repouso (309 ± 9 vs 327 ± 7 bpm S, $p < 0,05$) e aumentou a pressão de pulso (43 ± 1 para 47 ± 1 mmHg, $p < 0,05$), sem alterar a PAM e a razão parede/luz de todas as arteríolas analisadas. O T não alterou a imunorreatividade para TH nas arteríolas renais ($p > 0,05$), mas houve redução significativa no sóleo, gastrocnêmio vermelho e grácil (-46%, -56% e -45%, respectivamente, $p < 0,05$), com

tendência a redução no temporal (-32% , $p>0,05$). Coerentemente a concentração de noradrenalina na artéria femoral (HPLC) apresentava-se muito reduzida após o treinamento físico. O treinamento físico não modificou a expressão proteica de TH nas supra-renais, indicativo dos níveis de catecolaminas circulantes (Western Blot).

A imunorreatividade para TH, quantificando a síntese/armazenamento de noradrenalina no terminal nervoso, é uma técnica eficaz para aferir, simultaneamente, os efeitos do treinamento físico sobre o simpático periférico em diferentes territórios. A redução da TH nos músculos exercitados e a falta de alteração significativa naqueles não exercitados sugerem respectivamente diminuição da atividade simpática pelo treinamento físico e que esta resposta neural pode ser modulada por fatores locais.

ABSTRACT

Exercise training decreases both pressure and skeletal muscle resistance only in hypertensive, but resting bradycardia is observed in normotensive as well as hypertensive individuals. We showed previously that T affects intrinsic excitability of normotensive pre-autonomic neurons (JACKSON et al., J.Neurophysiol, 2005). In this study we investigate whether T is able to change peripheral sympathetic drive in tissues differentially affected by exercise as skeletal muscle (vasodilatation) and renal cortex (vasoconstriction).

Male WKY were submitted to exercise training (55% maximal exercise capacity, 1 hour/day, 5 days/week) or kept sedentary (S) for 3 months. Basal levels of pressure (AP) and heart rate (HR) were recorded in chronically cannulated rats at the end of protocols. Exercised (soleus, gastrocnemius red, gracilis) and non-exercised (temporal) skeletal muscles, kidneys and adrenals were obtained after deep anesthesia and transcardiac perfusion (PBS). Muscle and renal samples were fixed (4% paraformaldehyde), cryoprotected and processed for tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry (fluorescence microscopy) while adrenals were used for western blot analysis.

Exercise training improved performance ($+0.69 \pm 0.06$ km/h) and reduced resting hr (from 327 ± 7 to 309 ± 9 b/min) and increased pulse pressure (43 ± 1 to 47 ± 1 mmhg, $p < 0.05$), without changing map (126 ± 1 mmhg) and wall/lumen ratio of all arterioles analysed. exercise training was associated with a decrease of th-immunoreactivity on soleus, gastrocnemius red and gracilis arterioles (-46%, -56%

e -45% , $p < 0.05$), with smaller changes being observed in non-exercised tissues (-32% , $p > 0.05$). coherently noradrenaline concentration in the femoral arteries (hplc) was largely reduced after exercise training. th content within the adrenals was not changed. data show that exercise training does not affect plasma catecholamines, but specifically decreases the sympathetic drive to locomotor muscle arterioles in normotensive individuals. TH immureativity screening the synthesis/storage of noradrenaline in vessel terminals is a valuable to simultaneously measure symapathetic activity in different tissues. The absence of significant changes in non-locomotor arterioles suggests that neural response is modulated by local factores.

LISTA DE ABREVIATURAS

DBH – Dopamina-B-Hidroxilase

DMV - Núcleo Dorsal Motor do Vago

PNMT – Feniletanolanina-N-Metiltransferase

FC – Frequência Cardíaca

NTS – Núcleo do Trato Solitário

OT – Ocitocina

PA – Pressão Arterial

PAM - Pressão Arterial Média

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

S – Sedentários

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

T – Treinados

TF – Treinamento Físico

TH – Tirosina Hidroxilase

VP – Vasopressina

V1a – Receptor de Vasopressina

WB – Western Blot

WKY – Ratos Wistar Kyoto

WKY_T – Wistar Kyoto treinado

WKY_s – Wistar Kyoto sedentário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da síntese da noradrenalina.....	27
Figura2: Fotomicrografia do músculo sóleo mostrando corte transversal de arteríola imunoreativa para TH. No esquema inferior observa-se uma ampliação da parede vascular evidenciando-se a elavada flourescência na borda adventícia – medial do vaso.....	41
Figura 3. Peso corporal (gramas) medido durante treze semanas dos ratos sedentários (S) (n=10) e treinados (T) (n=10). Média $\pm$ EPM.....	43
Figura 4. Ganho ponderal (gramas) após treze semanas de experimento nos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM.....	43
Figura 5. Velocidade máxima (km/h) alcançada durante o teste de esforço realizado no início, na sexta e décima terceira semanas dos protocolos nos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM, ANOVA para medidas repetidas * $p < 0,05$ vs S, + vs semana zero.....	44
Figura 6. Efeito das treze semanas de treinamento ou sedentarismo sobre a capacidade física dos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM+ $p < 0,05$ vs S., (test t) + denota ganho significativo entre inícios e fins dos protocolos (t pareado).....	45
Figura 7. Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM), pressão de pulso e FC basal dos ratos S (n=9) e T (n=9), Média $\pm$ EPM. Significância (teste t), $p < 0,05$ vs S.....	47

Figura 8A. Secções transversais do músculo sóleo de WKY _S e WKY _T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. 8B Dados quantitativos de imunorreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, test.t, * p < 0,05 vs S (5 ratos/grupo).....	51
Figura 9A Secções transversais do músculo gastrocnêmio vermelho de WKY _S e WKY _T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. 9B Dados quantitativos de imunorreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, test t, * p <0,05 vs S (3 rato/grupo).....	52
Figura 10A Secções transversais do músculo grácil de WKY _S e WKY _T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. 10B Dados quantitativos de imunorreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, test t, * p < 0,05 vs S, (4 ratos/ grupo).....	53
Figura 11A Secções transversais do músculo temporal de WKY _S e WKY _T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. 11B Dados quantitativos de imunorreatividade para TH (músculo temporal) dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, (4 ratos/ grupo).....	54
Figura 12A Secções transversais das arteríolas do rim de WKY _S e WKY _T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. 12B Dados quantitativos de imunorreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, (3 ratos /grupo).....	55
Figura 13A. Print-out lustrando os picos de noradrenalina (NOR), adrenalina (ADR) e padrão interno (PI). 13B. Gráficos de barras mostrando a quantificação da concentração de noradrenalina através da técnica de HPLC em artérias femorais de ratos WKY _S e WKY _T (pool de 5-6 artérias/ grupo).....	56

Figure 14. Comparação da razão parede/luz em cortes transversais da microcirculação do músculo sóleo (A), gastrocnêmio vermelho (B), temporal (C), grácil (D) e rim (E) nos ratos WKY treinados e sedentários Média $\pm$ EPM.....59

Figura 15. Expressão protéica de TH na supra-renal de ratos normotensos sedentários e treinados (4 ratos/gupo).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Apresenta os valores absolutos de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial média (PAM), pressão de pulso (ΔP), e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos S e T.....	46
Tabela 2. Valores absolutos da imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo sóleo, gasrtocnêmio vermelho, grácil, temporal e rim nos ratos WKY _S e WKY _T	50
Tabela 3. Dimensões das arteríolas em músculos esqueléticos e córtex renal de WKY _S e WKY _T . Valores são médias + EPM. Medidas feitas nas arteríolas em que se quantificou a imunoreatividade para TH, mostradas na Tabela 2.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 EFEITOS BENÉFICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR.....	19
1.2 INERVAÇÃO SIMPÁTICA PERIFÉRICA: MORFOLOGIA E FUNÇÃO	24
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	32
3.2 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL	32
3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO OU SEDENTARISMO.....	32
3.4 TÉCNICA PARA CATETERIZAÇÃO ARTERIAL	34
3.4.1 <i>Confeção das cânulas</i>	34
3.4.2 <i>Implantação da cânula arterial</i>	34
3.5 REGISTRO SIMULTÂNEO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	35
3.6 OBTENÇÃO DOS VASOS E TECIDOS	35
3.6.1 <i>Tecidos para Western Blot e HPLC</i>	36
3.6.2 <i>Tecidos para Imunohistoquímica</i>	37
3.7 TÉCNICA DE WESTERN BLOT	37
3.8 TÉCNICA DE HPLC	38
3.9 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	39
3.9.1 <i>Quantificação da Imunorreatividade</i>	40
3.10 QUANTIFICAÇÃO DA RAZÃO PAREDE/LUZ	42
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS	43

4.1 PESO CORPORAL E EFICÁCIA DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	43
4.2. VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA	46
4.3 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A IMUNOREATIVIDADE PARA TH EM ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS	48
4.3.1 <i>Sóleo</i>	48
4.3.2 <i>Músculo Gastrocnêmio Vermelho</i>	49
4.3.3 <i>Músculo Grácil</i>	49
4.3.4 <i>Músculo Temporal</i>	49
4.3.5 <i>Rim</i>	50
4.4 QUANTIFICAÇÃO DA NORADRENALINA PELA TÉCNICA DE HPLC EM ARTÉRIAS FEMORAIS: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO	56
4.4 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA DAS ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS	57
5 DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO.....	70
7 BIBLIOGRAFIA	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 EFEITOS BENÉFICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR

A atividade física regular tem sido relacionada à melhor qualidade de vida. De fato, a prática contínua de exercícios físicos é considerada benéfica para a saúde física e mental por reduzir a incidência e/ou a gravidade de várias doenças crônicas. Dentre estas estão a hipertensão, diabetes, osteoporose, depressão, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, obesidade, além das diferentes formas de câncer. Em todas estas doenças o treinamento físico (TF) tem-se mostrado benéfico em diminuir ou corrigir alterações deletérias que caracterizam essas doenças, como, por exemplo, a redução do peso no obeso, redução da pressão arterial (PA) no hipertenso, diminuição da dispnéia e melhora da capacidade física nas doenças pulmonares, diminuição da resistência à insulina no diabetes, assim como a correção da hipotensão no diabetes induzida pela streptozotocina. (BLAIR et al., 1989; LEON et al, 1997; MENGELKOCH et al., 1997; MANSON et al., 1981; MCGINNIS e FOEGE, 1993; CHOBANIAN et al., 2003; COOPER, 2006; PAZ DIA et al., 2007).

Dados epidemiológicos têm confirmado a eficácia da atividade física regular em diminuir a frequência cardíaca (FC) de repouso e a taquicardia do exercício em indivíduos treinados, sejam eles normotensos ou hipertensos, além de reduzir os níveis pressóricos de hipertensos (CLAUSEN, 1977; TIPTON, 1999; MUNTNER et al., 2002; CHOBANIAN et al., 2003). Por este e outros motivos recomenda-se sistematicamente o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade como a primeira conduta terapêutica em hipertensos leves e/ou limítrofes ou como terapêutica coadjuvante a tratamentos

farmacológicos na hipertensão grave ou moderada (MANCIA; GRASSI., 1998; TIPTON, 1999; CHOBANIAN et al., 2003).

Embora não se conheça em maiores detalhes o(s) mecanismo(s) que condiciona(m) a redução da pressão, várias hipóteses têm sido aventadas para se explicar a queda da pressão arterial de indivíduos hipertensos e de modelos experimentais de hipertensão, tais como: redução de frequência cardíaca (TIPTON, 1999; NEGRÃO et al. 1993); queda da resistência muscular esquelética com redução da resistência periférica total (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003), redução do tônus simpático e da resistência à insulina (MEREDITH et al., 1990; MIKINES et al. 1989; PETERSEN et al., 1980), correção do desbalanço entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, com predomínio dos primeiros (VANHOUTTE, 1996), e, o aumento da capacidade física da circulação de territórios exercitados, por angiogênese capilar e/ou neoformação de vênulas (AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003).

É interessante notar, que protocolos de treinamento similares aos utilizados nos hipertensos, não causam alterações dos níveis de PA em indivíduos normotensos. Esta ausência de queda na pressão não indica, no entanto, a ausência de efeitos do treinamento físico, uma vez que há redução da frequência cardíaca de repouso e intensa neoformação de capilares na musculatura esquelética nesses indivíduos (CLAUSEN, 1977; MITCHELL, 1990; TIPTON, 1999; AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003).

Além disso, vários trabalhos com animais normotensos ou não, demonstram que o treinamento físico de baixa intensidade é eficaz em:

- i. aumentar a sensibilidade do baroreflexo em ratos normotensos e hipertensos treinados (BRUM et al, 2000);

- ii. deslocar a faixa de funcionamento dos baroreceptores arteriais para níveis elevados de FC sem alterar a sensibilidade do reflexo (NEGRÃO et al., 1992);
- iii. reduzir a atividade simpática renal (NEGRÃO et al., 1993; DICARLO e BISHOP, 1988);
- iv. alterar o balanço simpato-vagal ao coração (DE ANGELIS et al., 2004; MICHELINI, 2007a);
- v. facilitar o aumento do conteúdo endógeno da vasopressina (VP) no bulbo dorsal durante o exercício dinâmico, potencializando a resposta taquicárdica ao exercício dinâmico, e reduzindo a taquicardia do exercício em presença do bloqueio de receptores V1a no núcleo do trato solitário (NTS) (DUFLOTH et al., 1997, MICHELINI e MORRIS, 1999);
- vi. aumentar a sensibilidade dos receptores de vasopressina ao agonista endógeno no núcleo do trato solitário (NTS) (MICHELINI e BONAGAMBA, 1988; SOUZA et al., 2001);
- vii. facilitar o efeito da VP no NTS, determinando deslocamento da faixa de funcionamento dos baroreceptores arteriais para níveis mais elevados de frequência cardíaca, o que permite oclusão da bradicardia reflexa durante as elevações da PA de pequena magnitude observadas no exercício dinâmico (MICHELINI e BONAGAMBA, 1990; MICHELINI e MORRIS, 1999);

- viii.** aumentar a inibição funcional do simpático, induzida pela VP, durante elevações transitórias da pressão arterial, por inibição da bradicardia reflexa de forma a favorecer a taquicardia e o aumento do débito cardíaco (MICHELINI e MORRIS, 1999; MICHELINI, 1998);
- ix.** aumentar, apenas no grupo treinado, o conteúdo endógeno de ocitocina (OT) no bulbo dorsal durante o exercício dinâmico favorecendo menor resposta taquicardica característica do treinamento (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);
- x.** potencializar, durante o bloqueio da OT no núcleo do trato solitário (NTS) em animais treinados, a taquicardia do exercício (BRAGA et al., 2000), o que confirma o efeito da OT em se opor à taquicardia do exercício após o treinamento (MICHELINI, 2001; MICHELINI, 2007b);
- xi.** aumentar a expressão de OT na região dorsal do tronco cerebral sem alterar a expressão de seus receptores no NTS em ratos normotensos, conforme verificado pelas técnicas imunohistoquímica, hibridização in situ e RT-PCR (MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007b);
- xii.** facilitar o efeito da OT no complexo solitário-vagal dos indivíduos treinados, favorecendo a redução da frequência cardíaca basal, a qual é mediada pelo aumento do tônus vagal ao coração, induzido pelas projeções OTérgicas ao NTS/DMV (MICHELINI, 2001; HIGATANIGUCHI et al., 2002; MICHELINI, 2007b).

Além dessas observações em ratos normotensos, que comprovaram a potencialidade do treinamento físico em modular, ao nível do complexo solitário vagal durante as alterações pressóricas, o controle autonômico do coração, Kramer et al. (2001) e Di Carlo et al. (2002) já haviam demonstrado que o treinamento físico era eficaz em alterar mecanismos hipotalâmicos envolvidos no controle neural da pressão arterial de hipertensos.

Embora sejam bem conhecidos os ajustes da frequência cardíaca e do débito cardíaco, bem como as alterações simultâneas na redistribuição de fluxo periférico (aumento nos territórios muscular e cutâneo, redução no renal e esplâncnico, com pequenas alterações percentuais nos territórios coronariano e cerebral) durante o exercício dinâmico, há poucas informações relativas ao(s) efeito(s) do treinamento físico sobre a modulação autonômica (tônus simpático) para vasos de resistência e/ou capacitância. DiCarlo e Bishop (1988) e Negrão et al. (1993) relataram haver, após treinamento, redução da atividade simpática renal durante quedas transitórias da PA e redução do tônus simpático basal aos rins, respectivamente. Por outro lado, Buckwalter et al. (1997) demonstraram haver, durante o exercício dinâmico, aumento da vasoconstrição muscular esquelética por ativação simpática local. Este mesmo grupo também descreveu haver redução na sensibilidade dos receptores α_1 e α_2 vasculares, associada à infusão de agonistas, após exercício agudo (BUCKWALTER et al. 2001). São, portanto, díspares os efeitos do exercício dinâmico e do treinamento físico sobre o controle simpático da vasculatura periférica.

Sabe-se que a vasomotricidade periférica é regulada por fatores intrínsecos, que envolvem mecanismos autócrinos e parácrinos e, fatores extrínsecos, que englobam a regulação neural e a regulação hormonal. Observações recentemente obtidas em nosso

laboratório, em ratos espontaneamente hipertensos, indicam que o treinamento físico determina efeitos diversos na microcirculação muscular esquelética (MELO et al., 2003): um efeito tecido-específico em arteríolas (remodelamento da parede vascular com normalização da razão parede/luz) que ocorre igualmente no território muscular exercitado e não exercitado, sugerindo modulação tecido-específica (CAMPOS e McALLEN, 1997), e, um efeito essencialmente local nos capilares (aumento da densidade capilar) que foi observado apenas nos tecidos exercitados (MELO et al., 2003). Estas constatações sugerem que o treinamento ativa mecanismos diversos e que possa alterar a estrutura vascular por modular a atividade simpática vascular.

Frente aos dados acima expostos, é nossa hipótese investigacional que o treinamento físico de baixa intensidade isolado ou associado a fatores locais possa modificar a atividade simpática de vasos da musculatura esquelética.

1.2 INERVAÇÃO SIMPÁTICA PERIFÉRICA: MORFOLOGIA E FUNÇÃO

A regulação neural da circulação inclui neurônios aferentes provenientes dos receptores existentes na periferia, que conduzem a informação sensorial aos centros de controle, neurônios de integração no sistema nervoso central e neurônios eferentes que constituem o chamado “sistema autonômico” ou neuro-vegetativo e que transmitem o comando do sistema nervoso central para os tecidos periféricos. (MICHELINI, 1999; 2007a).

O sistema nervoso autônomo é um sistema motor, que controla a musculatura lisa, o músculo cardíaco e as glândulas, cujos componentes são o sistema nervoso simpático, parassimpático e entérico. Nos mamíferos o sistema nervoso parassimpático inerva o coração e apenas alguns poucos vasos periféricos (cabeça, genitália, bexiga,

intestino grosso) e, quando ativado, causa queda na FC e vasodilatação nesses territórios. Pelo fato de apenas uma pequena proporção dos vasos de resistência do corpo receber fibras parasimpáticas, o efeito dessas fibras colinérgicas sobre a resistência vascular total é irrelevante.

Por sua vez, a inervação simpática é constituída por: 1) neurônios pré-motores simpáticos localizados no sistema nervoso central, que recebem densas aferências dos sistemas de integração vegetativo e comportamental; 2) neurônios pré-ganglionares, que iniciam-se no núcleo intermédio lateral da medula espinhal, entre os segmentos T₁ e L₂, e projetam-se via corno anterior aos gânglios paravertebrais (WILLIAM, In Fisiologia: BERNE e LEVY, 1991); 3) neurônios pós-ganglionares situados nos gânglios simpáticos, fora do eixo cérebro vertebral, que inervam os efetores do sistema circulatório: coração, vasos de resistência e vasos de capacitância. Quando ativados determinam aumentos da frequência e inotropismo cardíacos, vasoconstrição periférica e conseqüentes aumentos do débito cardíaco e da resistência periférica e redução da capacitância venosa, as quais conjuntamente, determinam elevação da pressão arterial.

Sabe-se que os neurônios simpáticos formam plexos na túnica adventícia dos vasos periféricos: o plexo externo, que inerva a região mais externa da adventícia e o plexo interno, que está restrito à junção adventício-medial. Nas grandes artérias e arteríolas de ordem superior, as camadas musculares internas não são diretamente inervadas pelo simpático vasoconstritor, sendo a sua ativação efetuada pela condução do potencial originado nas fibras mais próximas da adventícia (diretamente inervadas) e/ou através da difusão da noradrenalina pelas camadas musculares. Deve-se ressaltar, no entanto, que as catecolaminas circulantes, tendo acesso ao vaso via endotélio, também determinam vasoconstrição. Durante esta modulação simpática os neurotransmissores

liberados pelo plexo interno são os principais responsáveis por alterações no tônus da musculatura vascular lisa (BEVAN, 1979).

A densidade de inervação do território vascular é variável e acredita-se não haver correlação entre a densidade dos terminais simpáticos e o tamanho do vaso, sendo ele veia ou artéria (SVED et al., 2001). A maioria dos vasos sanguíneos possui dois tipos de receptores: α - e β -adrenérgicos, sendo que a resposta final dependerá da concentração destes receptores e do balanço entre a estimulação noradrenérgica (simpática) e adrenérgica (catecolaminas circulantes) a cada momento (DAVIS e HILL, 1999; KRIEGER, 1976, BEVAN, 1980).

A noradrenalina é o principal neurotransmissor dos neurônios simpáticos pós-ganglionares. A síntese da noradrenalina (vide Figura 1) inicia-se com a hidroxilação do precursor, a tirosina, um aminoácido de origem alimentar, que é captado do sangue nos locais de biosíntese de catecolaminas (BEVAN, 1987). A transformação da tirosina em DOPA é realizada pela tirosina hidroxilase (TH). A DOPA, é descarboxilada para formar dopamina, cuja reação é catalisada pela L-amino-descarboxilase. Essas duas primeiras etapas ocorrem no citosol do neurônio adrenérgico. A dopamina é, então, ativamente transportada para o interior das vesículas, onde é convertida em noradrenalina pela ação da dopamina- β -hidroxilase, contida nas vesículas de armazenamento. Nos neurônios adrenérgicos o produto final é a noradrenalina, enquanto que na medula supra-renal esta cascata de reações continua até a formação da adrenalina pela ação da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase.

A noradrenalina é sintetizada e armazenada em vesículas e liberada, para fenda sináptica frente a estímulos nervosos. Na fenda sináptica ela pode combinar-se com receptores pós-sinápticos desencadeando efeitos intracelulares, que levam à vasoconstrição (receptor α) ou à vasodilatação (receptor β); pode também ser recaptada

pelo próprio neurônio (receptor α_2 e/ ou transportador de membrana pré-sinápticos), ou ainda metabolizada. A noradrenalina possui uma maior afinidade pelos receptores α -adrenérgicos quando comparados aos receptores β -adrenérgicos, (o inverso ocorrendo para a adrenalina) (RANG et al., 1995).

É interessante notar que a etapa inicial desta “cascata de reações” catalisada pela TH constitui-se na reação limitante para a biosíntese da noradrenalina, sendo ativada durante estimulação nervosa, a qual não só aumenta a atividade como também induz a expressão gênica da enzima TH. É ainda sabido que a TH esta sujeita à inibição por compostos catecolaminérgicos (retroalimentação negativa) e pela ocupação dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos (ZIGMOND et al., 1989).

Figura 1: Ilustração da síntese da noradrenalina

Agindo sobre os receptores α_1 -adrenérgicos, pós-sinápticos, a noradrenalina ativa a fosfolipase C e forma os segundos mensageiros diacilglicerol e IP_3 que disparam o processo de contração do músculo liso vascular. A noradrenalina também aumenta o automatismo dos marcapassos da musculatura lisa vascular, aumentando a frequência de contração dos mesmos. Se a ação se fizer sobre os receptores β_1 e β_2 , há vasodilatação via adenilato ciclase/AMPC/PKA dependente, a qual induz hiperpolarização, redução da sensibilidade ao cálcio, aumento da captação de cálcio para o retículo sarcoplasmático e diminuição do influxo de cálcio pelo sarcolema nas células musculares lisas (REMBOLD,1998). Além disso, os subtipos β_1 , β_2 , β_3 também podem induzir seus efeitos vasodilatadores parcialmente pela estimulação da síntese e liberação de NO nas células endoteliais (BRAWLEY et al., 2000b; RAUTUREAU et al., 2002). A noradrenalina presente na fenda sináptica também age sobre receptores α_2 pré-sinápticos (localizados nas terminações neuronais) onde ativa a recaptação do transmissor pelo terminal reduzindo parcialmente seu efeito pós-sináptico. Além disto as catecolaminas circulantes agindo sobre receptores α_2 -adrenérgicos localizados no endotélio induzem a liberação local de óxido nítrico, o qual modula negativamente a resposta contrátil induzida pela própria noradrenalina. A somatória dos efeitos desencadeados pela noradrenalina nos receptores α_1 e α_2 (pré e pós sinápticos no neurônio na célula muscular lisa e no endotélio) determina a intensidade e a frequência de contração da musculatura lisa, determinando a magnitude da vasoconstrição. Quando o efeito simpático é retirado e/ ou reduzido além do tônus basal, há predomínio da vasodilatação (DAVIS e HILL, 1999; KRIEGER, 1976; BEVAN, 1980).

Dada à complexidade e à extensão da inervação simpática eferente, a sua quantificação não é uma tarefa fácil e várias técnicas têm sido propostas para sua quantificação: dosagem de catecolaminas plasmáticas (GOLDSTEIN, 1981;

THOMPSON et al., 1995), registro eletroneuronográfico da atividade simpática em diferentes leitos vasculares (DICARLO e BISHOP, 1988; GRASSI et al., 1994; NEGRÃO et al., 1993; LATERZA et al., 2007; IRIGOYEN e KRIEGER, 1998, DE TOLEDO BERGAMASCHI, 2006; CARRILO et al., 2007), simpatectomia e/ou bloqueio ganglionar (JULIEN et al., 1990; SANTAJULIANA et al., 1996; CSIKY et al., 1997), análise espectral da variabilidade da PA e/ou frequência cardíaca (AKSELROD et al., 1981; PAGANI et al., 1986; MALLIANI et al., 1994). A grande maioria destas técnicas fornece apenas índices da atividade simpática sem particularizá-la aos diferentes territórios (“spill over” de catecolaminas, bloqueio simpático, análise espectral) ou a particularizam para determinado tecido nos animais anestesiados (eletroneuronografia), situação em que o tônus simpático se encontra alterado pela retirada de mecanismos modulatórios corticais e/ou hipotalâmicos.

Recentemente foi sugerida a utilização do Western Blot e da imunohistoquímica para a determinação dos níveis teciduais de TH (ZHOU et al. 2004). Enquanto os resultados obtidos com a técnica de Western Blot fornecem dados controversos sobre a expressão da TH na medula supra-renal (KUMAI et al., 1994; MOURA et al., 2005) a marcação de inervação simpática pela imunohistoquímica mostrou resultados interessantes. Zhou et al. (2004) observaram presença de imunoreatividade para TH e dopamina- β -hidroxilase em arteríolas mesentéricas de ratos com sépsis.

Estudo recente de nosso laboratório (HIGA TANIGUCHI et al., 2007) utilizando a técnica de imunohistoquímica associada à quantificação da imunofluorescência em neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos normotensos, demonstrou que o treinamento físico de baixa intensidade aumenta a imunoreatividade para TH, indicando hiperatividade da via supra-bulbar de modulação do simpático periférico. Esse trabalho não só confirmou a

potencialidade a viabilidade da técnica de imunohistoquímica associada à análise de imagem para a quantificação da expressão de TH, um índice da atividade simpática, como também sugeriu que o treinamento físico alterava vias centrais de modulação do simpático periférico.

Baseados nestas informações e na controvérsia sobre os efeitos do exercício e/ou treinamento físico sobre a atividade simpática para a periferia, procuramos, no presente trabalho, investigar os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática para diferentes territórios.

2 OBJETIVOS

São, portanto objetivos específicos deste trabalho, utilizando-se ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) submetidos ao treinamento físico de baixa intensidade ou mantidos sedentários por igual período de tempo:

- i.** padronizar a técnica de imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase associada à análise de imagem para a detecção da síntese/armazenamento da noradrenalina em terminais nervosos vasculares.
- ii.** comparar os efeitos do treinamento físico sobre a síntese/armazenamento da noradrenalina no tecido muscular esquelético locomotor e não locomotor e no tecido renal.
- iii.** identificar se a resposta neural ao treinamento físico é ou não acompanhada de alterações estruturais da parede vascular.
- iv.** comparar a resposta neural à hormonal (síntese/armazenamento de catecolaminas adrenais) após o treinamento físico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados Wistar Kyoto (WKY) com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Durante todo o período de experimentação os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro 12/12 horas e controle de temperatura ambiental, recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos e protocolos que foram utilizados estão de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética sob o número 063 fls. 17 livro 2.

3.2 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL

Os ratos foram pesados em balança Filizola, uma vez por semana, durante todo o protocolo experimental.

3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO OU SEDENTARISMO

O treinamento físico dos animais teve duração de três meses (13 semanas) sendo este realizado em esteira ergométrica programável (KT 3000, IMBRAMED), adaptada para ratos. A esteira é constituída de dez raias de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. Esta adaptação facilita o treinamento dos ratos sem a necessidade do uso de choques elétricos.

Animais WKY foram selecionados por sua habilidade de andar/correr em esteira durante o período de adaptação (0,4 km/h, cerca de 10 minutos por dia /duas semanas). Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo e apenas os ativos foram utilizados neste experimento. Testes de esforço foram realizados ao final da adaptação, no meio e no fim dos protocolos experimentais. O teste consiste de incrementos de velocidades de 0,3 km/h a cada 3 minutos iniciando-se com 0,3 km/h até o ponto em que o animal se recusa a correr. Os resultados foram utilizados para se alocar animais com igual desempenho aos grupos sedentário e treinado e para o cálculo da velocidade média de “endurance” no grupo treinado (50-60% da capacidade máxima).

Os ratos do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de treinamento que consiste de um programa de exercício 1 hora/dia 5 dias/semana, iniciando-se com tempos curtos e velocidades baixas que gradativamente aumentam até se atingir a intensidade estabelecida (50-60% da capacidade/velocidade máxima). Na sexta e décima terceira semanas, foram realizados novos testes de esforço máximo para se ajustar a intensidade do treinamento e para se aferir a melhora da capacidade física do animal, respectivamente. A intensidade de treinamento foi aumentada gradualmente pela combinação da velocidade e da duração (a inclinação da esteira foi mantida a 0%). Os ratos alocados ao grupo sedentário foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas uma vez/semana colocados na esteira (10 min com velocidade de ~0,4 km/h) para que se acostumassem ao manuseio experimental e à esteira. Estes também realizaram testes de capacidade máxima no mesmo período que os treinados.

3.4 TÉCNICA PARA CATETERIZAÇÃO ARTERIAL

3.4.1 Confeção das cânulas

As cânulas arteriais foram confeccionadas com tubos de Tygon (Critchley, Austrália), sendo a parte proximal a ser introduzida na luz vascular mais fina (diâmetro interno: externo = 0,28:0,61 mm) com 2 cm de extensão, a qual foi soldada, por aquecimento, à parte distal de maior calibre (diâmetro interno: externo = 0,50:1,50 mm) com aproximadamente 6 cm de comprimento. As cânulas foram preenchidas com solução salina heparinizada e mantidas ocluídas com pino de metal.

3.4.2 Implantação da cânula arterial

Os ratos foram anestesiados com Ketamina /Xilasina /Acepromazina (0,7/0,2/0,1 v/v, 0,4 ml/100gr). Realizou-se uma incisão na região ventral direita do pescoço, para isolamento da carótida. Após a ligadura da porção distal com fio de algodão e o clampeamento da porção proximal, realizou-se uma incisão transversal na parede do vaso através da qual a porção mais fina da cânula foi introduzida, em direção a crossa da aorta. A cânula foi firmemente amarrada à artéria na região da junção dos tubos e a parte proximal mais espessa exteriorizada, através do tecido subcutâneo, no dorso do animal onde foi fixada com uma sutura. As incisões ventral e dorsal do pescoço foram então suturadas, procedendo-se a seguir a assepsia local com água oxigenada.

Durante a recuperação anestésica, os ratos foram tratados com analgésicos e antibióticos e mantidos aquecidos, permanecendo em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, até a realização dos experimentos no dia seguinte.

3.5 REGISTRO SIMULTÂNEO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Todos os registros dos parâmetros funcionais foram realizados com os animais acordados, com livre movimentação e obtidos no mínimo 24 horas após a canulação arterial.

As pressões pulsátil e média foram registradas diretamente na artéria carótida, via cânula implantada na carótida direita, conectada a um transdutor de pressão (Gould P23 XL), acoplado ao pré-amplificador e ao polígrafo (Gould 5900, 8 canais, Cleveland, OH, USA). A frequência cardíaca (FC) também foi obtida a partir da contagem dos pulsos de PA, determinada através do tacógrafo (Biotach, Gould). Para obtenção desses valores, aguardou-se o tempo necessário (15-30 min) para o desaparecimento da atividade exploratória do animal. Os registros basais propriamente ditos (± 30 minutos) só foram iniciados após a estabilização dos níveis de PA e FC.

3.6 OBTENÇÃO DOS VASOS E TECIDOS

Após os experimentos funcionais os animais foram profundamente anestesiados (Ketamina, Xilazina e Acepromazina 0,7: 0,2: 0,1v/v, 0,08 ml/100g peso, i.m). Imediatamente após a parada respiratória metade dos animais de cada grupo (n= 5-8 /grupo) foi dissecada para obtenção dos tecidos a fresco enquanto que a outra metade

(5-8/grupo) foi perfundida para obtenção dos tecidos fixados, a serem processados pelas técnicas de Western Blot, HPLC e Imunohistoquímica, respectivamente.

3.6.1 Tecidos para Western Blot e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Para obtenção dos tecidos (músculo sóleo, gastrocnêmio vermelho e temporal), artérias (femoral e renal) e supra-renal, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, realizando-se uma incisão mediana ampla por todo o abdômen e extensão do membro posterior. O tronco vascular nervoso que compreende as porções ilíaca e femoral (artéria+nervo+veia) foi delicadamente dissecado desde a região proximal até a porção mais caudal. As artérias femorais foram, então, removidas lavadas em salina e colocadas imediatamente em gelo seco. Foram retirados os músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil que foram também imediatamente armazenados em gelo seco. Em seguida foram afastadas as vísceras e intestinos, evidenciando no campo cirúrgico apenas o rim direito e a vascularização regional. As artérias renais e glândulas supra-renais foram então delicadamente dissecadas, removidas e armazenadas em gelo seco. Da cabeça foi retirado o músculo temporal e armazenado em gelo seco.

Ao término do procedimento os tecidos foram guardados em freezer (-80 graus Celsius) para posterior análise pela técnica de Western Blot (músculo sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil e temporal, supra-renal, rim e artérias femoral e renal) e HPLC (artéria femoral).

3.6.2 Tecidos para Imunohistoquímica

Imediatamente após a parada respiratória os ratos foram perfundidos via ventrículo esquerdo inicialmente com salina tamponada (PBS~100 ml, pH 7,4), seguida do fixador (paraformaldeído 4% em PBS). A perfusão com bomba peristáltica (Milan~10 ml/min), foi realizada sob pressão, em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes. Em seguida, foram retirados das patas traseiras, os músculos sóleo, grácil e gastrocnêmio vermelho. O músculo temporal e os rins também foram removidos. Os tecidos foram então pós-fixados em paraformaldeído 4% em PBS 0,01M por 12 horas e depois crioprotetidos em sacarose 30% em PBS e armazenados a 4° C até processamento.

3.7 TÉCNICA DE WESTERN BLOT

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com Polytron® em tampão de extração (Triton-X 100, 1%; Tris pH 7, 4, 100mM; pirofosfato de sódio e fluoreto de sódio, 100mM; EDTA e ortovanadato de sódio, 10mM; PMSF, 2mM; e aprotinina, 0,01mg/ml), seguida de centrifugação (30 minutos/12000rpm) para a remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria; o restante foi diluído em tampão Laemmli contendo 200mM de DTT (5:1), e mantido a 4°C até sua utilização. Cerca de 150 a 200 µg de proteína total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8% para TH (peso molecular da TH= 59-61 kDa) no aparelho para minigel. A transferência das proteínas foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram tratadas com solução bloqueadora a 3 % (leite desnatado Molico, 5%; Tris, 10 mM; NaCl, 150mM; e Tween20, 0,02%), a 4°C

durante a noite. A seguir, as membranas foram incubadas com TH (1µl/1ml: Chemicon Lab: feito em camundongo: catalogo no. MAB318) em solução bloqueadora por 4h a temperatura ambiente e lavadas (Tris, 10 mM; NaCl, 150mM; e Tween20, 0,02%) por 30 min, incubadas com anticorpo secundário anticamundongo (TH) com peroxidase por 1h, e, a seguir com solução para detecção por quimiluminescência, de acordo com as recomendações do fabricante. A emissão de luz foi detectada e visualizada em autoradiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com programa específico (Scioncorp, NIH, USA).

3.8 TECNICA DE HPLC

O sistema cromatográfico é composto por bomba Waters 510, coluna Resolve C18 (partícula esférica de 5mm, 3,9x150mm) e detector eletroquímico Waters 464 operado em modo DC.

Pool de artérias femorais (5-6/grupo) foram sonicados (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, N.Y., USA), individualmente em 2,5ml de ác. perclórico 0,2N acrescido de EDTA 1mM e 1% de metabissulfito de sódio, por 10 segundos, sendo posteriormente centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm, a 5°C (Eppendorf 5804R Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA).Cinquenta µl de solução foram injetados no aparelho de HPLC.

O sistema cromatógrafico foi operado isocraticamente com fluxo de 1,0 ml/min e potencial de oxidação de +900 mV, usando-se, como fase móvel, uma solução contendo tampão fosfato de sódio 70 mM com pH 2,9-3,0 contendo 3 mM de SOS, 0,2 mM de EDTA e 5% de metanol.

Padrões de catecolaminas (1 mM) foram preparados em uma solução de HCL 0,1M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, aliqotado em tubos de

microcentrífuga e mantidos em congelador a -80°C . A alíquota foi diluída em uma solução de perclórico 0,1M, EDTA 0,02% e Metabissulfito de sódio 0,02%, para obtenção das concentrações necessárias à análise.

3.9 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os músculos locomotores (sóleo, gastrocnêmio vermelho e grácil), não locomotores (temporal) e o rim foram incluídos em TBS, congelados, seccionados em criostato (Leica.CM1850, Germany) e coletados em lâminas de vidro gelatinizadas. Secções transversais ($16\mu\text{m}$) dos músculos foram processadas para imuno-fluorescência para tirosina hidroxilase. Anticorpos primários contra TH ($1\mu\text{l}/100\mu\text{l}$: Chemicon Lab: feito em camundongo: catalogo no. MAB318) foram diluídos em PBS (0,01M/l) e aplicados diretamente sobre os cortes ($\sim 150\mu\text{l}/\text{lâminas}$), que foram recobertos com lamínulas. O período de incubação foi de 12 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Após a remoção das lamínulas procedeu-se 3 lavagens de 10 minutos em PBS, os cortes foram incubados por 2 horas em PBS contendo anticorpo secundário fluorescente ($1\mu\text{l}/100\mu\text{l}$; Jackson Immuno Research Laboratories; FITC conjugated affinipure goat antimouse IgG, Catálogo Numero 115-095-003) a temperatura ambiente em camera umida. Após 3 novas lavagens, as lâminas foram montadas com Vecta Shield (Vector Labs, Burlingame, CA) e analisadas em microscópio Nikon Eclipse E 1000, com aumento de 400X. Os controles negativos dos experimentos consistiram na omissão de anticorpos primários; nenhuma marcação foi observada nestes casos.

As imagens, das arteríolas, capturadas no microscópio foram analisadas no programa ImagJ para quantificação da imunorreatividade. Nestas mesmas imagens,

procedeu-se à análise morfométrica das arteríolas, através do programa IMAGE-Pro Plus.

3.9.1 Quantificação da Imunorreatividade

As imagens capturadas das arteríolas (aumento de 400x), foram armazenadas em computador e a imunorreatividade quantificada pelo programa ImagJ.

Foram analisadas entre 3 a 5 arteríolas/tecido. Para cada imagem foram selecionadas visualmente três áreas ($25\mu\text{m}^2$) de maior fluorescência (brilho), e, a imunorreatividade/janela foi quantificada pelo programa ImagJ, conforme exemplificado na Figura 1. Dos valores obtidos foi subtraído um valor de background que era mensurado em área equivalente ($25\mu\text{m}^2$) sempre na luz das arteríolas. As quantificações da imunorreatividade foram feitas em lâminas codificadas, que omitiam a identificação dos grupos.

Fotomicrografia do músculo sóleo

Figura2: Fotomicrografia do músculo sóleo mostrando corte transversal de arteríola imunoreativa para TH. No esquema inferior observa-se uma ampliação da parede vascular evidenciando-se a elevada fluorescência na borda adventícia – medial do vaso.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DA RAZÃO PAREDE/LUZ

As mesmas imagens utilizadas na análise de imunoistoquímica foram submetidas a análise morfométrica. As arteríolas foram analisadas em aumento adequado (ocular de 40X com objetiva de 10X), totalizando um aumento de 400X. A análise morfométrica das arteríolas foi realizada utilizando-se o programa IMAGE-Pro-Plus. As imagens foram capturadas on-line no computador. Determinou-se automaticamente o diâmetro externo (DE) e diâmetro interno (DI), sendo possível calcular os raios correspondentes e consequentemente a espessura de parede (espessura da parede (δ) = raio externo-raio interno). A partir destes valores e sabendo-se o diâmetro interno do vaso (luz do vaso) foi possível calcular a razão parede/ luz, conforme a fórmula: Razão parede/ luz = δ / DI.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram amostrados em planilhas específicas, compilados e calculadas as médias $\pm$ EPM. Os valores dos grupos WKY_S e WKY_T foram comparados pelo teste t de student ou t-pareado, conforme apropriado. A evolução do peso corporal e desempenho na esteira durante os protocolos experimentais foi analisada pela ANOVA para medidas repetidas. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL E EFICÁCIA DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

A Figura 3 compara a evolução do peso corporal dos ratos Wistar Kyoto treinados (WKY_T) durante o protocolo de treinamento e dos Wistar Kyoto sedentários (WKY_S) durante o mesmo período. Ambos os grupos tinham o mesmo peso corporal no início dos experimentos e apresentaram ganho de peso durante os protocolos experimentais que foram similares entre os dois grupos.

Figura 3. Peso corporal (gramas) medido durante treze semanas dos ratos sedentários (S) (n=10) e treinados (T) (n=10). Média $\pm$ EPM

A Figura 4 compara o ganho ponderal (gramas) dos ratos WKY_S e WKY_T durante as 13 semanas experimentais. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Figura 4. Ganho ponderal (gramas) após treze semanas de experimento nos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM. Significância ($p > 0,05$). + diferente de zero (teste t pareado).

A eficácia do treinamento físico foi avaliada através dos testes de esforço máximo em esteira ergométrica utilizados no início, meio e fim dos protocolos, sendo representada como velocidade máxima atingida durante o teste.

A Figura 5 demonstra que ao início dos protocolos (semana zero) os animais tanto do grupo treinado quanto do sedentário apresentavam mesma capacidade física ($0,99 \pm 0,05$ km/h). Observa-se um aumento significativo da velocidade máxima alcançada pelos ratos treinados na 6ª e 13ª semanas em comparação aos que se mantiveram sedentários, indicando que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade (50-60% da capacidade máxima) foi eficaz em aumentar a capacidade física do grupo treinado, sem a alterar no grupo sedentário.

Figura 5. Velocidade máxima (km/h) alcançada durante o teste de esforço realizado no início, na sexta e décima terceira semanas dos protocolos nos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM, ANOVA para medidas repetidas * $p < 0,05$ vs S, + vs semana zero.

A Figura 6 quantifica o ganho da capacidade física (diferença entre a 13ª e a semana zero), demonstrando claramente a eficácia do treinamento físico em melhorar a capacidade aeróbia dos animais WKY_T: houve aumento significativo ($+0,69 \pm 0,06$ Km/h, $p < 0,05$) no grupo treinado sem alteração significativa no grupo WKY_S ($-0,03 \pm 0,07$).

Figura 6. Efeito das treze semanas de treinamento ou sedentarismo sobre a capacidade física dos ratos S (n=10) e T (n=10). Média $\pm$ EPM+ $p < 0,05$ vs S., (test *t*). + denota ganho significativo entre inícios e fins dos protocolos (*t* pareado).

4.2.VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A Tabela 1 apresenta os valores absolutos de Pressão Arterial (sistólica, diastólica e média) pressão de pulso e FC de ambos os grupos. O treinamento físico não alterou significativamente os níveis pressóricos nos WKY_T, mas causou alterações inversas na pressão de pulso (aumento) e FC (redução).

Tabela 1 Apresenta os valores absolutos de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial média (PAM), pressão de pulso (ΔP), e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos S e T.

DADOS FUNCIONAIS	WKY _S (n=9)	WKY _T (n=9)
PS, mmHg	146 $\pm$ 4	155 $\pm$ 2
PAD, mmHg	103 $\pm$ 4	107 $\pm$ 1
PAM, mmHg	123 $\pm$ 5	126 $\pm$ 2
ΔP , mmHg	43 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1 *
FC, bpm	327 $\pm$ 7	309 $\pm$ 9*

Valores são média $\pm$ EPM. Significancia (teste *t*), **p*<0,05

A comparação dos valores de PAM, pressão de pulso e FC entre os grupos (Figura 7) mostra que o treinamento de baixa intensidade embora não alterasse os valores basais de pressão arterial média (PAM) ($p > 0,05$), aumentou em 11% a pressão de pulso ($p < 0,05$) e reduziu em 6% a FC ($p < 0,05$).

Figura 7. Comparação dos valores de pressão arterial média (PAM), pressão de pulso e FC basal dos ratos S (n=9) e T (n=9), Média± EPM. Significância (teste *t*), $p < 0,05$ vs S.

4.3 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A IMUNOREATIVIDADE PARA TH EM ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

A imunoreatividade para TH (THir), utilizada como um índice da síntese/armazenamento de noradrenalina nos terminais simpáticos vasculares foi quantificada em arteríolas (3-5 arteríolas/rato, 5 ratos/grupo) musculares esqueléticas de músculos locomotores (sóleo, gastrocnêmio vermelho e grácil) e não locomotores (temporal) e no território renal, que apresenta comportamento oposto ao da musculatura esquelética durante o exercício. Os valores absolutos de THir estão sumarizados na Tabela 2 e comparados entre os grupos WKY_S e WKY_T nas Figuras 8 a 12.

4.3.1 Sóleo

A Figura 8A ilustra cortes de secção transversal das arteríolas da mesma ordem do músculo sóleo (músculo exercitado) em um rato sedentário e outro treinado, submetidos ao processo de imunohistoquímica de fluorescência para TH. Observa-se que a imunoreatividade para TH é bastante densa no sedentário e encontra-se presente na borda médio-adventicial da arteríola; por outro lado a imunoreatividade para TH apresenta-se marcadamente reduzida no WKY_T. Dados quantitativos para os grupos S e T mostraram que o TF foi eficaz em reduzir significativamente a imunoreatividade para TH nas arteríolas de mesma grandeza do músculo sóleo (de 71 ± 5 para 39 ± 8 UA, $p < 0,05$, correspondendo a uma redução de 45%, Figura 8B).

4.3.2 Músculo Gastrocnêmio Vermelho

A Figura 9A ilustra cortes de secção transversal das arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho (músculo locomotor) em um rato sedentário e outro treinado, submetidos ao processo de imunohistoquímica de fluorescência para TH. A semelhança do músculo sóleo, THir estava presente na borda médio-adventicial da arteríola com maior densidade no WKY_S e menor no WKY_T. Os dados quantitativos (Figura 9B) mostraram que a imunoreatividade para TH em arteríolas do músculo gastrocnêmio vermelho foi reduzida em 56% pelo treinamento físico (de 66 ± 5 para 29 ± 2). Também para estas arteríolas, a THir localizava-se na borda médio-adventicial com densidade maior no músculo sedentário e menor no treinado (3 ratos/grupo).

4.3.3 Músculo Grácil

A Figura 10A mostra a imunoreatividade para TH em arteríolas nos cortes transversais do músculo grácil. Os dados quantitativos (correspondendo a arteríolas < 40 µm, 4 ratos/grupo) indicaram redução significativa de 45% na THir de arteríolas do músculo grácil após o treinamento físico. (de 55 ± 1 para 30 ± 9 UA, $p < 0,05$, Figura 10B).

4.3.4 Músculo Temporal

A Figura 11A ilustra cortes de secção transversal das arteríolas do músculo temporal (músculo não-locomotor) em um rato sedentário e outro treinado, submetidos ao processo de imunohistoquímica de fluorescência para TH. Há uma nítida tendência à redução da imunoreatividade após o treinamento, no entanto, dados quantitativos

(Figura 11B) indicaram que a redução de 31% da imunoreatividade para TH após o treinamento físico. (de 67 ± 9 para 46 ± 6) o que não atingiu níveis de significância ($p > 0,05$) (4 ratos/grupo).

4.3.5 Rim

A análise histológica do córtex renal revelou presença de arteríolas maiores do que as analisadas na musculatura esquelética. Desta forma quantificamos arteríolas com diâmetros internos entre 50-60 μm .

A Figura 12A ilustra cortes de secção transversal das arteríolas do rim em um rato sedentário e outro treinado, submetidos ao processo de imunohistoquímica de fluorescência para TH. Observamos densa marcação na borda médio-adventicial, bem como na região do endotélio. A quantidade da TH na borda médio-adventicial revelou que o treinamento físico reduziu em 23% a imunoreatividade para TH (de 44 ± 8 para 34 ± 9 UA, $p > 0,05$, Figura 12B), sem, no entanto, atingir níveis de significância.

Tabela 2. Valores absolutos da imunorreatividade para tirosina hidroxilase em cortes transversais de arteríolas do músculo sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil, temporal e rim nos ratos WKY_S e WKY_T.

ARTERÍOLAS DOS MÚSCULOS	WKY _S	WKY _T
Sóleo, (UA)	71 ± 5	39 ± 8 *
Gastrocnêmio vermelho, (UA)	66 ± 5	29 ± 2 *
Grácil, (UA)	55 ± 1	30 ± 9 *
Temporal, (UA)	67 ± 9	46 ± 6 ,
RIM	WKY _S	WKY _T
Cortex renal, (UA)	44 ± 8	34 ± 9

Média $\pm$ EPM, n= 3-5 ratos/grupo (correspondendo a 3-5 arteríolas/ ratos). Significância ($p < 0,05$) * vs WKY_S (t student).

Músculo sóleo

A

B

Figura 8A. Secções transversais do músculo sóleo de WKY_S e WKY_T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. **8B** Dados quantitativos de imunoreatividade para TH dos grupos S e T Média ± EPM, test.t, * $p < 0,05$ vs S (5 ratos/grupo).

Músculo Gastrocnêmio Vermelho

A

B

Figura 9A Secções transversais do músculo gastrocnêmio vermelho de WKY_S e WKY_T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. **9B** Dados quantitativos de imunoreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, test t, * $p < 0,05$ vs S (3 rato/grupo).

Músculo Grácil

A

B

Figura 10A Secções transversais do músculo gracil de WKY_S e WKY_T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. **10B** Dados quantitativos de imunoreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, test t, * $p < 0,05$ vs S, (4 ratos/ grupo).

Músculo Temporal

A

B

Figura 11A Secções transversais do músculo temporal de WKY_S e WKY_T mostrando arteríolas imunorreativas para TH. **11B** Dados quantitativos de imunorreatividade para TH (músculo temporal) dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, (4 ratos/ grupo).

Rim

Figura 12A Secções transversais das arteríolas do rim de WKYs e WKYt mostrando arteríolas imunorreativas para TH. **12B** Dados quantitativos de imunoreatividade para TH dos grupos S e T Média $\pm$ EPM, (3 ratos /grupo).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA NORADRENALINA PELA TÉCNICA DE HPLC EM ARTÉRIAS FEMORAIS: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO

Para confirmarmos a “quantificação” da síntese/armazenamento de noradrenalina pela imunoreatividade para TH, medimos a concentração do próprio transmissor pela técnica de HPLC em artérias femorais dos dois grupos de ratos. Os registros e valores obtidos (pool de 6 artérias nos WKY_S e 5 artérias nos WKY_T) são mostrados na Figura 13A e B. Observa-se que a concentração de noradrenalina encontrava-se elevada no grupo WKY_S (~543 ng/g) sendo marcadamente reduzida no grupo treinado (~122 ng/g), ratificando o efeito do treinamento físico em reduzir a síntese/ armazenamento e a disponibilidade de noradrenalina nos terminais nervosos de artérias de ratos normotensos.

Figura 13A. Print-out lustrando os picos de noradrenalina (NOR), adrenalina (ADR) e padrão interno (PI). **13B.** Gráficos de barras mostrando a quantificação da concentração de noradrenalina através da técnica de HPLC em artérias femorais de ratos WKY_S e WKY_T (pool de 5-6 artérias/ grupo).

4.4 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA DAS ARTERÍOLAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Com a finalidade de se caracterizar estruturalmente as arteríolas em que a THir foi avaliada e de comparar estes resultados com dados anteriores do laboratório, analisamos possíveis alterações estruturais induzidas nestas arteríolas pelo treinamento físico. Dados quantitativos dos diâmetros interno e externo, espessura da parede e razão parede/luz são apresentados na Tabela 3. Observa-se que as arteríolas musculares esqueléticas apresentavam um tamanho médio entre 22 e 34 μm de diâmetro interno (correspondendo a arteríolas entre 10-40 μm) enquanto que as arteríolas renais tinham em média 50-60 μm , correspondendo a arteríolas pouco maiores (na faixa de 30 a 70 μm). O treinamento físico determinou ligeiras alterações nos diâmetros interno e externo e na espessura das arteríolas, que, no entanto, não atingiram níveis de significância em nenhum dos territórios analisados (Tabela 3, $p>0,05$). A ausência de efeito do treinamento sobre a geometria de arteríolas nos ratos normotensos reflete-se sobre a falta de alteração da razão parede/luz nos diferentes territórios analisados (Tabela 3, Figura 14, $p>0,05$).

Tabela 3. Dimensões das arteríolas em músculos esqueléticos e córtex renal de WKY_S e WKY_T

MÚSCULOS	Diametro interno (D.I., μm)	Diametro externo. (D.E., μm)	ESPESSURA DA PAREDE (μm)	RAZÃO P/L
SÓLEO				
WKY _S	23,42 $\pm$ 2,31	38,69 $\pm$ 2,96	7,63 $\pm$ 0,48	0,35 $\pm$ 0,032
WKY _T	26,907 $\pm$ 2,28	43,56 $\pm$ 2,94	8,33 $\pm$ 1,13	0,35 $\pm$ 0,06
GASTROCNÊMIO V.				
WKY _S	28,26 $\pm$ 2,59	42,69 $\pm$ 2,79	7,21 $\pm$ 0,38	0,28 $\pm$ 0,03
WKY _T	23,14 $\pm$ 2,34	35,78 $\pm$ 3,11	6,32 $\pm$ 0,68	0,29 $\pm$ 0,03
GRÁCIL				
WKY _S	34,09 $\pm$ 4,90	48,41 $\pm$ 4,05	7,04 $\pm$ 0,72	0,25 $\pm$ 0,07
WKY _T	35,69 $\pm$ 3,66	48,94 $\pm$ 3,25	6,62 $\pm$ 0,42	0,19 $\pm$ 0,03
TEMPORAL				
WKY _S	22,39 $\pm$ 3,57	33,21 $\pm$ 3,90	5,41 $\pm$ 0,51	0,28 $\pm$ 0,04
WKY _T	30,78 $\pm$ 4,39	42,29 $\pm$ 3,64	5,76 $\pm$ 0,51	0,25 $\pm$ 0,096
RIM				
WKY _S	60,47 $\pm$ 2,90	87,35 $\pm$ 5,76	13,44 $\pm$ 2,26	0,22 $\pm$ 0,04
WKY _T	51,33 $\pm$ 10,84	70,78 $\pm$ 14,21	9,73 $\pm$ 2,02	0,19 $\pm$ 0,02

Tabela 3. Valores são médias + EPM. Medidas feitas nas arteríolas em que se quantificou a imunoreatividade para TH, mostradas na Tabela 2.

Figure 14. Comparação da razão parede/luz em cortes transversais da microcirculação do músculo sóleo (A), gastrocnêmio vermelho (B), temporal (C), grácil (D) e rim (E) nos ratos WKY treinados e sedentários Média $\pm$ EPM

4.5 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNA DE TH NA SUPRA-RENAL

Pretendíamos quantificar a expressão protéica da enzima TH nos mesmos territórios, em que quantificamos a THir (músculos:locomotores, não locomotores, rins), além das artérias femoral e renal e da supra-renal (síntese de catecolaminas plasmáticas). No entanto, em múltiplas tentativas não foi possível detectar a expressão protéica de TH. Acreditamos que a proteína TH é muito pouco expressa em relação ao conteúdo protéico total destes tecidos, ou seja, o sinal para TH encontrava-se abaixo dos níveis de detecção. Por outro lado, a elevada a concentração de TH nas supra-renais permitiu a sua quantificação nos grupos S e T. Os dados quantitativos (4 ratos/grupo) são apresentados na Figura 15. Observamos que o TF não alterou os níveis de TH na medula supra-renal (de 7913 ± 2800 para 7616 ± 846 UA, $p>0,05$).

Figura 15. Expressão protéica de TH na supra-renal de ratos normotensos sedentários e treinados (4 ratos/grupo).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, associando-se a determinação da imunoreatividade para a tirosina hidroxilase como a técnica de análise de imagem, pudemos demonstrar a eficácia deste procedimento na determinação simultânea da atividade simpática vascular para diferentes territórios. Tratam-se de dados originais mostrando, que o treinamento físico de baixa intensidade determina, em indivíduos normotensos, redução da imunoreatividade para a tirosina hidroxilase em terminais simpáticos de arteríolas de músculos locomotores, sem alterações significativas nos músculos não locomotores, nos terminais nervosos de arteríolas renais e na supra-renal (indicativo de inalteração dos níveis de catecolaminas plasmáticas). Além disto, nossos dados mostrando redução marcante na concentração de noradrenalina na artéria femoral (que irriga a musculatura da pata posterior) confirmam a eficácia do treinamento físico em reduzir a disponibilidade do neurotransmissor simpático (indicativo da atividade simpática vascular) na musculatura esquelética locomotora. Tratam-se de ajustes funcionais tecido-específicos, induzidos pelo treinamento físico, que ocorrem na ausência de alterações estruturais destas arteríolas e na ausência de alteração dos níveis basais de pressão arterial.

A constatação de que a alta morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares encontram-se frequentemente associadas à hiperatividade simpática (BENEDICT,1996; ZOCCALI, 2002) fez com que muitos pesquisadores procurassem desenvolver técnicas adequadas para a quantificação da atividade simpática basal e estimulada. No entanto, quantificar adequadamente o simpático não é uma tarefa fácil, de forma que várias técnicas têm sido propostas.

A dosagem de catecolaminas plasmáticas (GOLDSTEIN, 1981; THOMPSON et al., 1995), o bloqueio ganglionar (JULIEN et al., 1990; SANTA JULIANA et al., 1996; CSIKY et al., 1997) e a análise espectral da variabilidade da pressão arterial; (AKSELROD et al., 1981; PAGANI et al., 1986; MALLIANI et al., 1994), apesar da facilidade de obtenção dos dados, fornecem apenas índices relativos e conjuntos da atividade simpática neuro-hormonal, sendo inespecífica para a inervação vascular. Já a técnica da microdiálise mede os níveis locais de noradrenalina (MEREDITH et al., 1991), mas não indica com precisão a atividade simpática regional uma vez que apenas uma pequena fração do neurotransmissor liberado pelo neurônio pós-ganglionar, atinge o interstício e o espaço vascular. A eletroneuronografia (DICARLO e BISHOP, 1988; GRASSI et al., 1994; NEGRÃO et al., 1993; LATERZA et al., 2007; IRIGOYEN e KRIEGER, 1998; BERGAMASCHI et al., 2006; CARRILO et al., 2007) permite a quantificação da atividade simpática local, mas exige que o animal esteja anestesiado, o que retira o controle a modulação suprabulbar do simpático, além de não permitir a quantificação simultânea do simpático para as diferentes regiões. A grande maioria destas técnicas fornece índices da atividade simpática sem, no entanto particularizá-la aos diferentes territórios, ou, a particularizam apenas para determinado território nos animais anestesiados, situação em que o tônus simpático encontra-se alterado pela retirada de mecanismos modulatórios corticais e/ou hipotalâmicos. Todos estes métodos apresentam uma ou outra limitação de modo que o estudo dos efeitos do treinamento físico (um procedimento que engloba ajustes múltiplos em diferentes territórios) sobre a atividade simpática encontra grande dificuldade metodológica. Ainda hoje não é possível quantificar-se simultaneamente a atividade simpática para os diferentes territórios no animal íntegro. Além destas limitações estudos têm ainda demonstrado que os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática podem ser influenciados

por fatores adicionais como a idade, sexo, tipo de exercício e intensidade, além de diferentes patologias pré-existentes (RAY e HUME,1998; CORNELISSEN e FAGARD,2005; MUELLER, 2007).

Frente a estas limitações experimentais escolhemos a técnica de imunohistoquímica, associada à análise de imagem e a técnica do Western Blot para se estudar os efeitos do TF sobre a atividade simpática simultaneamente em diferentes territórios. O Western Blot, embora eficaz para detectar a expressão protéica de TH nas supra-renais não se mostrou, no entanto, sensível para detectar alterações na expressão de TH nos terminais nervosos vasculares dos diferentes tecidos em que a concentração da TH era muito baixa em relação às proteínas totais. Por outro lado, a imunohistoquímica para TH (ZHOU et al., 2004) fornece dados interessantes sobre a localização e densidade da TH nas arteríolas, permitindo um estudo conjunto dos efeitos do treinamento físico sobre a síntese/armazenamento da noradrenalina nos terminais simpáticos vasculares dos diferentes territórios. Além disto, a quantificação da densidade relativa da imunorreatividade para a TH pela análise de imagem (densitometria em imagens ampliadas dos vasos, conforme recentemente empregado em áreas específicas do sistema nervoso central, HIGA-TANIGUCHI et al, 2007), permitiu a obtenção de dados quantitativos da densidade de TH nos terminais simpáticos vasculares. Portanto, a associação destas técnicas, possibilitou a localização e a quantificação conjuntas dos efeitos do treinamento físico sobre a síntese/armazenamento da enzima limitante para a formação da noradrenalina (indicativo da concentração do neurotransmissor) nos terminais nervosos dos neurônios pós-ganglionares de arteríolas musculares esqueléticas locomotoras e não locomotoras bem como das arteríolas renais.

Utilizando estas técnicas pudemos demonstrar pela primeira vez, que o treinamento físico de baixa intensidade não alterou a expressão protéica de TH na supra-renal (dados obtidos com o Western Blot), mas reduziu a síntese/armazenamento da noradrenalina nas arteríolas de músculos locomotores (sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil) mostrando ainda nítida tendência à redução em músculos não locomotores (temporal), sem alteração significativa nas arteríolas renais.

Não existe consenso na literatura sobre os possíveis efeitos do treinamento físico a atividade simpática de normotensos e/ou hipertensos, dada principalmente à diversidade de técnicas, aos estudos em diferentes territórios e /ou espécies em que a atividade simpática foi quantificada (RAY e HUME, 1998; CORNELISSEN; FAGARD, 2005; MUELLER, 2007).

Com relação à musculatura esquelética e concordantes com nossos achados Chen e DiCarlo (1996) relataram redução da atividade do simpático lombar mediada pelo baroreceptores e Grassi et al. (1994) descreveram redução da atividade simpática do nervo fibular em indivíduos normotensos após o treinamento. Por outro lado, Laterza et al (2007) utilizando o mesmo nervo e a mesma técnica que Grassi não demonstraram redução da atividade simpática em normotensos embora a tenham demonstrado nos hipertensos. Ray e Hume (1998) concluíram que o treinamento físico não afeta a atividade simpática muscular esquelética em humanos. No entanto, Cornelissen e Fagard (2005), revendo dados de noradrenalina plasmática e do “spill over” de noradrenalina na musculatura esquelética, relataram que o treinamento físico as reduzia em 40% ou mais. Considerando-se que o treinamento físico não afeta a síntese de catecolaminas plasmáticas (dados do presente trabalho) a variação dos níveis plasmáticos poderia realmente refletir a atividade simpática nervosa reduzida para a musculatura esquelética.

Por outro lado, dados relativos ao simpático renal têm indicado redução da atividade simpática após o treinamento físico. DiCarlo e Bishop (1988), Meredith et al. (1991) e Negrão et al (1993) demonstram que o treinamento físico em indivíduos normotensos foi acompanhado por uma redução da atividade simpática renal. Nossos dados sobre a síntese/armazenamento da noradrenalina em arteríolas renais não repetiram com estas observações obtidas pela eletroneuronografia (DICARLO e BISHOP, 1988; NEGRÃO et al, 2003) ou “spill over” de noradrenalina (MEREDITH et al, 1991). Embora observássemos uma redução de 23% na imunorreatividade para TH, a queda não atingiu níveis de significância. Tratam-se de técnicas distintas, é certo, mas é importante considerar-se que as arteríolas renais analisadas eram maiores que as dos demais tecidos (vide Tabela 3). Tem sido sugerido que a resposta vascular ao treinamento físico varia entre os diferentes tecidos (LAUGHLIN et al., 2006) e ao longo dos diferentes segmentos da circulação, dentro de um mesmo tecido (LAUGHLIN et al, 2003, INGRAM et al 2007). É possível que a síntese/armazenamento da noradrenalina (e, portanto, a resposta vasoconstritora) varie ao longo das arteríolas renais, com maior efeito nos vasos menores. Esta possibilidade permanece aberta à investigação futura.

Há ainda evidências contrastantes relativas aos efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática no território cardíaco: enquanto Meredith et al. (1991) não observaram alterações do “spill over” de noradrenalina no coração, outros estudos relataram redução do simpático cardíaco em ratos (Negrão et al, 1992) e camundongos (DE ANGELIS et al., 2004). Deve-se ter presente que, além da provável variação da resposta simpática entre os tecidos e segmentos, os efeitos do treinamento físico sobre a atividade simpática podem ser influenciados por uma gama de fatores como espécie, idade, sexo, variação entre indivíduos, doenças pré-existentes, grau de adiposidade, condicionamento prévio, além do tipo, duração, intensidade e frequência de treinamento

utilizado (NG et al., 1994; FADEL et al, 2001; JENNINGS et al, 1986; RAY e HUME, 1998; ALVAREZ et al, 2005, CORNELISSEN e FAGARD, 2005; MUELLER, 2007)

Uma observação importante, que confirma os dados da imunoreatividade para TH terminais nervosos da circulação muscular esquelética (indicativo de redução da atividade simpática a este território após treinamento) foi a intensa redução da concentração da noradrenalina (medida pelo HPLC) em artérias femorais que irrigam a musculatura esquelética locomotora. O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade é realmente eficaz em atenuar a atividade simpática basal a este território. Parece, portanto, que nos ratos normotensos o treinamento físico não altera os níveis circulantes de catecolaminas adrenais, mas tem efeito específico sobre a inervação simpática, reduzindo-a na musculatura esquelética locomotora (que responde com vasodilatação ao exercício), com pouca ou nenhuma alteração a inervação simpática renal, a qual induz vasoconstrição durante o exercício (AMARAL e MICHELINI, 1997; MICHELINI, 1999).

É interessante que a mesma tendência à redução da TH-ir estava presente no músculo temporal (não exercitado). Vale lembrar que o controle central da atividade simpática é tecido-específico de forma que o efeito em músculos locomotores pode estar também presente em músculos não locomotores. Realmente McAllen e May (1994), Campos e McAllen (1997) e Morrison (2001) descreveram que os neurônios simpáticos pré-motores do bulbo ventrolateral tem representação topográfica com distribuição tecido-específica e não região - específica, sugerindo que inervação do tecido muscular esquelético seja feita pelo mesmo grupamento neuronal, justificando os resultados observados. O fato da redução da imunoreatividade para TH não ter sido significativa no músculo temporal sugere que os ajustes na inervação simpática induzidos pelo treinamento físico possam ser modulados por fatores locais (modulação autócrina e

paracrina) liberados durante a hiperemia reativa que não esteve presente no temporal durante o exercício dinâmico (MUSH et al,1987). Além disto, a ausência de efeitos no território renal, innervado por outro grupamento de neurônios pré-motores, poderia também ser explicada pela innervação tecido-específica (McALLEN e MAY, 1994;CAMPOS e McALLEN, 1997; MORRISON, 2001).

É importante ressaltar, que a redução da atividade simpática neural para vasos musculares esqueléticos induzida pelo TF não significa necessariamente menor “drive” simpático durante o exercício. De fato Buckwalter et al. (1997) descreveram elevado tônus simpático basal e magnitude variável de ativação simpática para a musculatura esquelética durante o exercício dinâmico (maior no exercício leve e menor no exercício intenso). O(s) mecanismo(s) que condiciona(m) estas alterações no simpático periférico é (são) ainda desconhecido(s).

Não podemos deixar de mencionar, que a redução na síntese/ armazenamento da noradrenalina nas arteríolas dos músculos locomotores não foi acompanhada de alterações estruturais das mesmas, conforme demonstrado pela inalteração da razão parede/luz das arteríolas dos músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho, grácil. Na realidade também não houve alterações geométricas nas arteríolas do temporal e rins, demonstrando que o treinamento físico em normotensos não é acompanhado por mudanças estruturais de arteríolas em nenhum dos tecidos estudados, o que sugere inalteração da resistência periférica total e é condizente com a inalteração da pressão arterial nos normotensos treinados versus seus controles sedentários. Dados anteriores do laboratório já haviam demonstrado que o treinamento físico, em ratos normotensos, não alterava a razão parede/luz de arteríolas de diferentes tecidos (AMARAL et al, 2000; MELO et al, 2003).

Frente à ausência de alteração da resistência vascular da musculatura esquelética por fatores estruturais, o treinamento físico poderia reduzir a sobrecarga pressora por redução da vasoconstrição simpática (fator funcional), conforme sugerido pela redução da síntese/ armazenamento da noradrenalina neste território. É provável que estes ajustes do simpático vascular sejam mediados centralmente. Evidências experimentais têm sugerido que o treinamento é um estímulo potente para alterar a plasticidade neuronal e modificar o funcionamento de vias centrais de modulação do sistema nervoso autônomo (JACKSON et al., 2005; MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007a; 2007b; HIGA TANIGUCHI ET AL 2007). De fato, estudos recentes tem demonstrado que o TF em ratos normotensos, melhora o ganho da sinalização aferente pelos baroreceptores arteriais (BRUM et al., 2000), aumenta a sinalização catecolaminérgica do núcleo do trato solitário ao núcleo paraventricular (HIGA–TANIGUCHI et al., 2007; MICHELINI, 2007b), facilita a atividade intrínseca de neuronios pré-autonômicos do núcleo paraventricular (JACKSON et al., 2005), aumenta a sinalização OTérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo a regiões dorsais do bulbo, envolvidas no controle autonômico do coração e vasos (MARTINS et al., 2005) e reduz a expressão de receptores V_{1a} no núcleo do trato solitário (MICHELINI et al. 2007a; 2007b), sugerindo que o treinamento modula a atividade da alça supra-bulbar de modulação do controle cardiovascular, alterando o balanço simpato-vagal ao coração e o “drive” simpático aos vasos. A redução do “drive” VPérgico ao bulbo dorsal é um importante fator para reduzir o tono simpático periférico após o treinamento físico (MICHELINI et al., 2006). Em conjunto, estes dados dão forte suporte anátomo-funcional à presente observação que o treinamento físico reduz a síntese/armazenamento do neurotransmissor simpático em arteríolas musculares esqueléticas, sem interferir nos níveis de catecolaminas circulantes.

Por fim, quanto à eficácia do treinamento físico em condicionar as alterações observadas, ela foi comprovada pelo intenso aumento da capacidade aeróbia e pelo aparecimento da bradicardia de repouso, característica marcante do exercício repetitivo. Esta adaptação cardiovascular é usualmente acompanhada por aumento do volume sistólico visando à manutenção do débito cardíaco em níveis normais. Nossos resultados mostrando que o treinamento físico foi acompanhado de bradicardia com aumento simultâneo da pressão de pulso (gerado por volume sistólico maior), confirmam a presença destes ajustes periféricos, que aumentam a eficiência cardíaca com menor gasto energético.

6. CONCLUSÃO

A imunorreatividade para TH, quantificando a síntese/armazenamento de noradrenalina no terminal nervoso, é uma técnica eficaz para aferir, simultaneamente, os efeitos do treinamento físico sobre o simpático periférico em diferentes territórios.

Alterações da TH em arteríolas musculares esqueléticas, indicativas da atividade neural parecem ser moduladas independentemente da resposta hormonal. O efeito de menor magnitude não significativo da imunoreatividade para TH em músculo não-locomotor sugere a possibilidade de a resposta simpática ser modulada por fatores locais.

7 BIBLIOGRAFIA

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F.A.; SHANNON D.C.; BERGER, A.C.; COHEN RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science.*,v.10, n.213,p. 220-222, 1981.

ALVAREZ, G.E.; HALLIWILL, J.R.; BALLARD, T.P.; BESKE, S.D, Sympathetic neural regulation in endurance-trained humans: fitness vs. fatness. *J Appl Physiol*, v.98, n.2, p.498-502, 2005.

AMARAL S.L e MICHELINI L.C. Validation of transit-time flowmetry for chronic measurements of regional blood flow in resting and exercising rats. *Braz J Med Biol Res*, v.30, n.7, p.897-908,1997.

AMARAL, S.L.; SILVEIRA, N.P.; ZORN, T.M.T; MICHELINI, L.C. Exercise training cause skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J. Hipertens*, v.19, 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. *Journal of Hypertension*, v. 18, p.1563-1572, 2000.

BENEDICT CR, SHELTON B, JOHNSTONE DE, FRANCIS G, GREENBERG B, KONSTAM M, PROBSTFIELD JL, YUSUF S. Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators.*Circulation.*; v.94,n. 4, p.690-7,1996.

BEVAN, J.A. Control of peripheral vascular resistance: evidence base on the in vitro study of resistance arteries. *Clin Invest Med*, v.10, n. 6, p. 568-572, 1987.

BEVAN, J.A. Some bases of differences in vascular response to sympathetic activity. *Circ.Res*, v. 45, n. 2, p. 161-171, 1979.

BEVAN, J.A., BEVAN R.D e DUCKLES, S.P. Adrenergic regulation of vascular smooth muscle. In: Bohr, D.F., Somlyo, A.P., Sparks Jr. H.V. (eds). *Handbook of Physiology*, section 2: *The cardiovascular system*, vol.II: *Vascular Smooth Muscle*, Williams e Wilkins, Baltimore, pp.515-566, 1980.

BERGAMASCHI, C; CARILLO, B.A.; FUTURO NETO HA, CAMPOS, R.R. Differential baroreceptor modulation mediated by the ventrolateral medulla. *Auton Neurosci*; v.126-127, p.156-62, 2006.

BLAIR, S.N.; KOHL, H.W.; PATTEHBARGER, J.R.; CLARK, D.G.; COOPER, K.H.; GIBSON, L.W. Physical fitness and all-cause mortality. *JAMA*, v.262, p.2395-2401, 1989.

BRAGA, D.C; MORI, E.; LIGA K.T.; MORRIS, M. AND MICHELINI, L.C. Central oxytocin modulates exercise induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 278, n. 6, p.1474-1482, 2000.

BRAWLEY L, SHAW AM, MACDONALD A. Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*; v.129, n.4, p.637-44, 2000b.

BRUM, P.C.; DA SILVA, G.J.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRAO, 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.

BUCKWALTER, J.B.; MUELLER, P.J.; CLIFFORD, P.S. Sympathetic vasoconstriction in active skeletal muscles during exercise. *J Appl. Physiol*, v. 83, n.5, p.1575-1580, 1997.

BUCKWALTER, J.B.; NAIK, J.S.; VALIC, Z.; CLIFFORD, P.S. Exercise attenuates α -adrenergic-receptor responsiveness in skeletal muscle vasculature. *J Appl. Physiol* v.90, p.172-178, 2001.

CAMPOS RR, MCALLEN RM. Cardiac sympathetic premotor neurons. *Am J Physiol*, v.272, n.2, p.615-20, 1997.

CAMPOS, R.R.; McALLEN, R.M. Tonic Drive to sympathetic premotor neurons of rostral ventrolateral medulla from caudal pressor area neurons. *Am J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol*, v.276, p.1209-1213, 1999.

CARILLO, B.A, BEUTEL, A., MIRANDOLA, D.A.; VIDONHO, A.F.; FURUKAWA, L.N.; CASARINI, D.; CAMPOS, R.R.; DOLNIKOFF, M.S.; HEIMANN, J.C.; BERGAMASCHI, C.T. Differential sympathetic and angiotensinergic responses in rats submitted to low- or high-salt diet. *Regul Pept*; v.140, p.5-11, 2007

CHEN CY e DICARLO SE. Daily exercise and gender influence arterial baroreflex regulation of heart rate and nerve activity. *Am J Physiol.*; v. 271, n.5:p.1840-8, 1996

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, L.G.; BLACK, R.H.; CUSHMAN C.W.; GREEN A.L. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

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

COOPER C.B. The connection between chronic obstructive pulmonary disease symptoms and hyperinflation and its impact on exercise and function. *Am J Med*, v .119 n.10, p.21-31, 2006.

CORNELISSEN V.A., FAGARD R.H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension*, v.46, n.4, p.667-75, 2005.

CSIKY, B.; SIMON, G. Effect of neonatal sympathectomy on development of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol*, v.272, n. 2, p. H648-56, 1997.
DAVIS, M.J. e HILL, H.A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological Reviews*, 79 (2): 387-423,1999.

DE ANGELIS, K.; WICHI, R.B.; JESUS, W.R.A.; MOREIRA, E.D.; MORRIS, M.; KRIEGER E.M. e IRIGOYEN M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol*, v. 96, p. 2174-2178, 2004.

DI CARLO, S.E. e BISHOP, V.S. Exercise training attenuates baroreflex regulation of nerve activity in conscious rabbits. *Am. J. Physio*,v. 255 (Heart Circ. Physiol. 24), p. 974-979, 1988.

DI CARLO, S.E.; ZHENG, H.; HEIDI, C.L.; RODENBAUGH, D.W.; PATEL, K.P. Daily exercise normalizes the number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of hypertensive rats. *Brian research*, v. 955, p. 153- 160, 2002.

DUFLOTH, D.L.; MORRIS, M. e MICHELINI, L.C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am. J Physiol Regl Physiol*, v.273, p. 1271-82, 1997.

FADEL, P.J.; STROMSTAD, M.; HANSEN, J.; SANDER, M., HORN, K.; OGOH, S.; SMITH, M.L.; SECHER, N.H.; RAVEN, P.B.. Arterial baroreflex control of sympathetic nerve activity during acute hypotension: effect of fitness. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun;280(6):p.2524-32, 2001.

GOLDSTEIN, D.S. Plasma norepinephrine as an indicator of sympathetic neural activity in clinical cardiology. *Am J Cardiol*, v.48, n6, p.1147-1154, 1981.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; CALHOUN, D. A.; MANCIA, G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension*, v. 23, n.3, p.294-301,1994.

HIGA-TANIGUCHI, K.T, SILVA, F.C; SILVA, H.H; MICHELINI, L.C; STERN J.E. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(4):R1717-27, 2007.

HIGA-TANIGUCHI, K.T.; MORI, E.; VIANNA, F.F.; MORRIS, M.; MICHELINI L.C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,v. 282, p. 2, n.537-545, 2002.

INGRAM, D.G.; NEWCOMER, S.C; PRICE, E.M.; EKLUND, K.E., MCALLISTER, R.M.; LAUGHLIN, M.H. Chronic nitric oxide synthase inhibition blunts endothelium-dependent function of conduit coronary arteries, not arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.. 292, n. 6,:p.2798-808, 2007.

IRIGOYEN, M.C e KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.9,1213-1220, 1998.

JACKSON, K.; SILVA, H.M.; ZHANG, W., MICHELINI, L.C; STERN, J.E. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol*, v.94, n.5, p.3211-20, 2005.

JENNINGS, G.; NELSON, L; NESTEL, P.; ESLER, M.; KORNER P; BURTON, D.; BAZELMANS, J. The effects of changes in physical activity on major cardiovascular risk factors, hemodynamics, sympathetic function, and glucose utilization in man: a controlled study of four levels of activity *Circulation*.,v. 73, n.1, p. 30-40,1986.

JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRES, C.; LO, M.; CERUTTI, C.; SASSARD, J. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. *Am J Physiol*, v.259, p1337-1342, 1990.

KRAMER, J.M.; BEATTY, J.A.; LITTLE, H.R.; PLOWEY, E.D.; WALDROP, T.G. Cronic exercise alters caudal hypothalamic regulation of the cardiovascular system and hypertensive rats. *Am. J. Physiol.Regul. Integr. Comp. Physiol*, v. 280, p. 389-397, 2001.

KRIEGER, E.M. Regulação da vasomotricidade. In: Fisiologia Cardiovascular. Fundo editorial BYK- Prociex, Porto Alegre:185-198, 1976.

KUNMAI, T.; TANAKA, M.; WATANABE, M.; KOBAYASHI, S. Elevated Tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpnj. Pharmacol*, v.65, n.4, p.367-9, 1994.

LATERZA, M.C; DE MATOS, L.D.; TROMBETTA, I.C.; BRAGA, A.M.; ROVEDA, F.; ALVES, M.J.; KRIEGER, E.M.; NEGRÃO, C.E.; RONDON, M.U.Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients.*Hypertension*; v. 49,n.6,p. 1298-306, 2007.

LAUGHLIN, M.H.; RUBIN, L.J.; RUSH, J.W.; PRICE, E.M.; SCHRAGE, W.G; WOODMAN, C.R. Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *J Appl Physiol*;v. 94, n.1, p.234-44 , 2003

LAUGHLIN, M.H.; COOK, J.D.; TREMBLE, R., INGRAM, D., COLLERAN, P.N., TURK, J.R. Exercise training produces nonuniform increases in arteriolar density of rat soleus and gastrocnemius muscle. *Microcirculation*, v.13, n.3, p.175-86., 2006.

LEON, A.S.; CONNET, J.J.; RAURAMA, A. R. Leisure time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death the multiple risk factors intervention trials. *JAMA*, v. 258, p.2388-2395, 1997.

MALLIANI, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; CERUTTI, S. Power spectral analysis of cardiovascular variability in patients at risk for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol.*, v.5,n. 3, p. 274-86, 1994.

MANSON, J.E.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLD, J.A.; WILLET, W.C.; KROLEWSKI, R.S.; ROSNER, B.; HENNEKENS, C.H.; SPEIZER, F.E. Physical

activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet*, v. 338, n.8770, p. 774-778, 1981.

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, n.4, p.1004-9, 2005.

MARTINS, A.S.; CRESCENZI, A.; STERN, J.E.; BORDIN, S. & MICHELINI LC. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension*, v. 46, n.4, p.1004-1009, 2005

MCALLEN, R.M., MAY, C.N. Differential drives from rostral ventrolateral medullary neurons to three identified sympathetic outflows. *Am J Physiol*, v. 267, n.4, p.935-44, 1994.

MCGINNIS, J.M. e FOEGE, W.H. Actual causes of death in the United States. *JAMA*, v.270, p.2207-2212,1993.

MELO, R.M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L.C. Training-induced, Pressure-Lowering Effect in SHR. *Hipertension*, v. 42, n.2, p. 851-857, 2003.

MENGELKOCH, L.J.; POLLOCK, M.L.; LIMACHER, M.C.; GRAVES, J.E.; SHIREMAN, R.B.; RILEY, W.J.; LOWENTHAL, D.T.; LEON A.S. Effects of age, physical training, and physical fitness on coronary heart disease risk factors in older track athletes at twenty-year follow-up. *J Am Geriatr Soc.*;v.45, n.12, p.1446-53,1997

MEREDITH, I.T.; JENNINGS, G.L.; ESTER, M.D.; DEWAR, E.M.; BRUCE, A.M.; FAZIO, V.A. Time course of the antihypertensive and autonomic effects of regular endurance exercise in human subjects. *J. Hypertens*, v. 8, p. 859-866, 1990.

MEREDITH, I.T; FRIBERG, P.; JENNINGS, G.L.; DEWAR, E.M; FAZIO, V.A;

LAMBERT, G.W.; ESLER, M.D. **Exercise training lowers resting renal but not cardiac sympathetic activity in humans. *Hypertension*, v. 18,n. 5, p.575-82, 1991.**

MICHELINI L.C Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.34, n.4, p.369-76, 2007b.

MICHELINI, L.C. A new modulator of Cardiovascular Control during exercise. *Annals New York Academy of Sciences*, 2001.

MICHELINI, L.C. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. *Curr Hypertens* , v: 9, n.3,p. 214-21, 2007a.

MICHELINI, L.C. e BONAGAMBA, L.G.H. Angiotensin II as a modulator of baroreflex in the brainstem of conscious rats. *Hypertension*, v.15, (suppl.I), p.45-50, 1990.

MICHELINI, L.C. e BONAGAMBA, L.G.H. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of counscious rats. *hypertension*, v. 11, (suppl.I), p. I.75-I.79,1988.

MICHELINI, L.C. e MORRIS, M. Endogenous Vasopressine modulates the cardiovascular responses to exercise. *Ann N.Y. Acad. Sci*, v. 897, p.198-211, 1999.

MICHELINI, L.C. Engenous vasopressin and central control of heart rate during dynamic exercise. *Braz J. Med Biol Res*, v. 3, p.1185-1195,1998.

MICHELINI L.C; FELIX, J.V.; MARTINS, A.S.; SILVA, H.M.V. Opposite effects of hypertension and exercise training (ET) on central vasopressinergic system. *The Faseb J*.v.20. n.5, p. A1414, 2006.

MIKINES, K.J.; SONNE, B.; FARRELL, P.A.; TRONIER, B.; GALBO, H. Effect of training on the dose-response relationship for insulin action in men. *J Appl Physiol*. v.66, n.2, p.695-703, 1989.

MITCHELL, J.H. Neural control of the circulation during exercise. *Med. Sci Sports Exerc.*, v.22, p. 141:154, 1990.

MORRISON, S.F. Differential control of sympathetic outflow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;v.281, n.3, p.683-98, 2001.

MOURA, E.; PINHO COSTA, P.M.; MOURA, D.; GUIMARÃES, S.; VIEIRA COELHO, M.A. Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hipertensive rats. *Life Sci.*, v.76, n.25, p.2953-2964, 2005.

MUELLER, P.J. Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; v. 34, n.4, p.377-84, 2007.

MUNTNER, P.; ROCCELLA, H.E.J.; WHELTON, P.K. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the US population. *Hypertension*, v.30, p.897-902, 2002.

MUSH, T.I; FRIEDMAN, D.B; PIETTL, K.H; HAIDET, G.C.; STRAY-GUNDERSEN, J.; MITCHEL, J.H. Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise. *J.Appl.Physiol*, v.63, p.2269-2277, 1987.

NEGRÃO, C.E.; FRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; FREIRE, P.M.; KRIEGER, E.M. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *Am J Physiol*, v. 265, n.2, p.365-370, 1993.

NEGRAO, C.E; MOREIRA, E.D.; SANTOS, M.C; FARAH, V.M.; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol*.;v.72, n.5, p.1749-53, 1992.

NG, A.V; CALLISTER, R.; JOHNSON, D.G.; SEALS, D.R. Endurance exercise training is associated with elevated basal sympathetic nerve activity in healthy older humans. *J Appl Physiol*.; v.77, n.3, p.1366-74, 1994.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; Malfatto, G., DELL'ORTO, S., PICCALUGA, E. et al.. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.*, v.59, n.2, p.178-93, 1986.

PAZ-DIA, Z .H.; MONTES DE OCA, M.; LOPEZ, J.M.;CELLI, B.R.. Pulmonary rehabilitation improves depression, anxiety, dyspnea and health status in patients with COPD. *Am J Phys Med Rehabi*.,v.86, n.1, p.30-36, 2007.

PETERSEN, O.; BECK-NIELSEN, H.; HEDING, I. Increased Insuline receptors after exercise in patients with insuline dependents Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.*, v.302, p. 886-892, 1980.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITER, J.M. Noradrenergic transmission. *In:Pharmacology.Churchill Livingstone*, third edition, 1995.

RAUTUREAU, Y.; TOUMANIANTZ, G; SERPILLON, S.; JOURDON, P.; TROCHU J.N.; GAUTHIER, C. Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br J Pharmacol*, v.137, n.2, p.153-61, 2002

RAY, C.A.e HUME, K.M. Sympathetic nerve activity during natural stimulation of horizontal semicircular canals in humans. *Am J Physiol*; v.275, n.4 Pt 2, p.1274-8,1998.

REMBOLD, C.M.; CHEN, X.L. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. *Hypertension* v.31,n.3,p:872-7,1998.

SANTAJULIANA, D.; HORNFELDT, B.J.; OSBORN, J.W. Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v.35, n.1, p.45-54,1996.

DE SOUZA, C.G.; MICHELINI, L.C.; FIOR-CHADI, D.R.. Receptor changes in the nucleus tractus solitarii of the rat after exercise training. *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, n.9, p.1471-6, 2001

SVED, A.F.; CANO, G.; CARD, P.J. Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to different targets. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.28, p.115-119, 2001.

THOMPSON, J.M.; O'CALLAGHAN, C.J.; KINGWELL, B.A.; LAMBERT, G.W.; JENNINGS, G.L.; ESLER, M.D. Total norepinephrine spillover, muscle sympathetic nerve activity and heart-rate spectral analysis in a patient with dopamine beta-hydroxylase deficiency. *J. Auton Nerv Syst.*,v.55, n.3, p.198-206,1995.

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

VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction in hipertension. *J. Hypertens*, v. 14, p.83-93, 1996.

WILLIAM, D.W.J. Sistema nervoso. In: Fisiologia. BERNE, RM; LEVY, MN; KOEPPEN, BM; STANTON, BA. In: Sistema Nervoso Autônomico e seu Controle Central, Fisiologia. 5ª edição. Elsevier Editora Ltda, p.215-233, 1991.

ZHOU, M.; HANK SIMMS, H., WANG, P. Increased gut-derived norepinephrine release in sepsis: up-regulation of intestinal tyrosine hydroxylase. *Biochim Biophys*, v.1689,n.3, p.212-8, 2004.

ZIGMOND, R.E; SCHWARZSCHILD, M.A.; RITTENHOUSE, A.R. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann. Rev. Neurosci.*, p. 12415-461, 1989.

ZOCCALI C, MALLAMACI F, PARLONGO S, CUTRUPI S, BENEDETTO FA, TRIPEPI G, BONANNO G, RAPISARDA F, FATUZZO P, SEMINARA G, CATALIOTTI A, STANCANELLI B, MALATINO LS. Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease.*Circulation*;v.105, p.1354-9,2002. Erratum in: *Circulation*; v.105, n.18, p.2230, 2002.