

**CARLA ROCHA DOS SANTOS**

**NEURÔNIOS PRÉ-AUTONÔMICOS DO  
HIPOTÁLAMO E SINALIZAÇÃO  
NORADRENÉRGICA ASCENDENTE: EFEITOS DA  
HIPERTENSÃO, TREINAMENTO AERÓBIO E  
DESNERVAÇÃO SINO AÓRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciência.

São Paulo  
2018

**CARLA ROCHA DOS SANTOS**

**NEURÔNIOS PRÉ-AUTONÔMICOS DO  
HIPOTÁLAMO E SINALIZAÇÃO  
NORADRENÉRGICA ASCENDENTE: EFEITOS DA  
HIPERTENSÃO, TREINAMENTO AERÓBIO E  
DESNERVAÇÃO SINO AÓRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciência.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno  
Michelini

Versão Original

São Paulo  
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos, Carla Rocha dos

Neurônios pré-autonômicos do hipotálamo e sinalização noradrenérgica ascendente: efeitos da hipertensão, treinamento aeróbio e desnervação sino aórtica / Carla Rocha dos Santos; orientadora Lisete Compagno Michelinini. -- São Paulo, 2018. 146 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Modulação suprabulbar. 2. Treinamento aeróbio. 3. Hipertensão. 4. Ocitocina. 5. Vasopressina. I. Michelinini, Lisete Compagno, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): **Carla Rocha dos Santos**

Titulo da Tese: **Neurônios pré-autônômicos do hipotálamo e sinalização noradrenérgica ascendente: efeitos da hipertensão, treinamento aeróbio e desnervação sinoaórtica**

Orientador: **Lisete Compagno Michelini**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou o(a) candidato(a):

(     ) **Aprovado(a)**            (     ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

Of.CEUA. 046.14

São Paulo, 24 1de julho de 2014.

**REF.: Protocolo nº 141/11.**

*"Expressão/Funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da deservação sino-aórtica e do treinamento aeróbio "*

Prezado<sup>(a)</sup> Professor<sup>(a)</sup>,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 20.09.17.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo<sup>(a)</sup>. Sr<sup>(a)</sup>

Prof. <sup>(a)</sup> Dr<sup>(a)</sup> Lisete Compagno Michelini  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.017/2014.

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 141/11/CEUA, datado de 20.09.11, e por solicitação da Profa. Dra. **Lisete Compagno Michelin**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Carla Rocha dos Santos**, nível de doutorando ao Projeto de Pesquisa "*Expressão/Funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da deservação sino-aórtica e do treinamento aeróbio*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

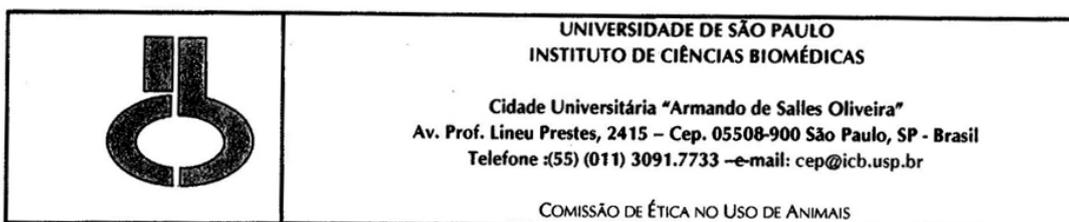
São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP



Decl. CEUA.018/2014.

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 141/11/CEUA, datado de 20.09.11, e por solicitação da Profa. Dra. **Lisete Compagno Michelini**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de duas linhagens ( 50 ratos SHR e 50 ratos WKY) ao Projeto de Pesquisa "*Expressão/Funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da deservação sino-aórtica e do treinamento aeróbio*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

*Dedico a minha família, minha base para tudo,  
meus amigos e ao Justin que coloreminha vida.  
Obrigada por toda motivação para seguir em frente*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Lisete Compagno Michelini**, por ter acreditado em mim e me dado à oportunidade de trabalhar ao seu lado e acima tudo pela grande contribuição para minha formação, percebo o quanto evolui com seus ensinamentos, foram 9 anos de muitos ensinamentos.

Ao **Alexandre Ceroni**, de muita competência técnica, por toda ajuda com cirurgias e pelos ensinamentos, por toda ética no trabalho e cuidado com ratos, e conselhos e conversas na hora do cafezinho, muito obrigada por tudo.

Ao **José Maria e Paloma**, sem a ajuda de vocês eu estaria perdida e ao pessoal da **Biblioteca do ICB I**, sempre muito dispostos a ajudarem.

À **CAPES**, pelo grande auxílio financeiro que propiciou a realização deste trabalho e do Doutorado Sanduíche, foi uma experiência única, pessoal e profissional.

Ao **Corpo Docente do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, onde pude acompanhar excelentes disciplinas, melhorando e ampliando minha formação. Agradeço aos laboratórios dos Prof. Dr. Vagner Antunes e Thiago Moreira, pela disponibilidade de materiais e espaço.

À **Aninha**, uma flor de pessoa de humor cativante, por toda ajuda na imunohistoquímica, agradeço eternamente pelo carinho e disponibilidade.

Ao **Prof. Martin**, por gentilmente disponibilizar seu laboratório e equipamento de microscopia, por todo auxílio dado.

A banca de qualificação por todas as sugestões que melhoram esse trabalho, muito obrigada **Profa. Sandra Lia do Amaral, Profa. Dra. Sara Joyce e Prof. Dr. Vagner Antunes**.

Ao laboratório do **Prof. Dr. David Mendelowitz**, mesmo que nenhum resultado seja apresentado na presente Tese, eles foram essenciais para a minha formação, tive grande

oportunidade de trabalhar com vocês e aprender muito, foram ótimos 7 meses de estudos, corrido, mas faria de novo, muito obrigada: **David Mendelowitz, Jhansi, Olga e Xin.**

**Ao Matheus e Gustavo**, mais que colegas de trabalho para coletas de tecidos, amigos que sempre me apoiaram, agradeço pelas trocas de conhecimento científico, mas principalmente pelos momentos de descontração, foram essenciais para tornar o trabalho menos cansativo.

Aos meus amigos do laboratório: **Tereza e Junoca** por todas discussões científicas e muito mais por aquelas que não foram tão científicas assim, sempre alegraram meu dia, aprendi muito com vocês. Amo vocês.

À **Vanessa de Oliveira**, agradeço pela amizade, pela companhia, pelo apoio, você foi essencial para tudo isso, mesmo não sabendo que a tampinha é o Crânio. Sempre pude desabafar e rir com você. Amo você.

Aos meus amigos eternos **Ariane, Théo, Priscila, Tatiana, Patricia, Fernanda, Rafael** meus psicólogos de plantão, sem ajuda de vocês seria muito difícil esse processo, obrigada por alegrarem minha vida, com nossas saídas de gordinhos regadas com muita risada e comida, são todos muito especiais. Amo todos.

Ao **Justin**, fico muito feliz em tê-lo em minha vida, seu apoio, seu amor me ajudam a ir a diante. Te amo!

À Minha **família**, que também participaram ativamente no meu trabalho, me acompanhando nos fins de semana ajudando nos testes de esforço dos meus ratinhos. Ao meu **pai** que sempre apoio minhas escolhas profissionais, muito obrigada pelo amor e compreensão. Minha **mãe**, a pessoa mais importante do meu mundo, sem palavras para agradecê-la, meu amor por você é incondicional. Meus irmãos, **Carlos e Carina**, sem esses chatos o mundo não seria tão legal... meus amores para vida toda.

O que é o senso comum? Talvez simplesmente dizer que senso comum é aquilo que não é ciência e isto inclui todas as receitas para o dia-a-dia, bem como os ideais e esperanças que constituem a capa do livro de receitas. E a ciência? Não é uma forma de conhecimento diferente do senso comum. Não é um novo órgão. Apenas uma especialização de certos órgãos e um controle disciplinado do seu uso.

Rubem Alves

## RESUMO

Santos CR. Neuronios pré-autonômicos do hipotálamo e sinalização noradrenérgica ascendente: efeitos da hipertensão, treinamento aeróbio e desnervação sino aórtica. [Tese (Doutorado em Ciências – Fisiologia Humana)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2018.

**Introdução:** As vias suprabulbares assim como núcleos bulbares são de vital importância na modulação cardiovascular. As informações aferentes que chegam ao NTS ascendem a áreas suprabulbares por neurônios noradrenérgicos (NORérgicos) projetando-se principalmente a neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em sua maioria oitocinérgicos (OTérgicos) e vasopressinérgicos (VPérgicos), os quais se projetam a áreas bulbares, fechando um pronto circuito modulatório. É nossa hipótese de trabalho que a hipertensão e/ou o treinamento possam alterar a plasticidade de vias NORérgicas ascendentes as quais, modificando a sinalização aferente, desencadeariam respostas plásticas e funcionais nos neurônios pré-autonômicos do PVN, alterando a modulação cardiovascular nestas situações. **Objetivo:** estudar o funcionamento da alça suprabulbar de modulação autonômica, avaliando os efeitos sequenciais da hipertensão e do treinamento sobre a sinalização NORérgica ascendente e sobre a plasticidade/atividade de neurônios OTérgicos e VPérgicos do PVN que se projetam a áreas bulbares de controle cardiovascular. **Material e Métodos:** *Protocolo I* - Ratos Wistar adultos foram submetidos a T de baixa intensidade (50-60% da capacidade máxima, 5 dias/semana, 1h/dia) ou foram mantidos sedentários (S) por 8 semanas. Após registros da hemodinâmica basal nas semanas 0 ( $S_0=T_0$ ), 1 ( $T_1$ ), 2 ( $T_2$ ), 4 ( $T_4$ ) e 8 ( $T_8$  e  $S_8$ ) [protocolo Análise Temporal do Treinamento], após 8 semanas de T ou S [para protocolo de lesão seletiva dos neurônios NORérgicos ascendentes pela saporina], e, após 12 semanas de T ou S [para os protocolos *SHAM & DSA*] os ratos foram eutanasiados para perfusão e fixação do encéfalo. Cortes (30  $\mu$ m) do PVN foram processados para imunohistoquímica de dupla marcação para OT e dopamina beta-hidroxilase (DBH); imagens foram adquiridas pelo microscópio de fluorescência e confocal e analisadas pelo ImageJ e pelo Imaris, respectivamente. *Protocolo II* - SHR e WKY (4 semanas de idade no início dos protocolos) foram mantidos sedentários (S) por 8 semanas. Nas semanas experimentais 0, 1, 2, 4 e 8 avaliamos os parâmetros funcionais (valores basais PA e FC) e a imunohistoquímica para VP e DBH; em outro protocolo, realizamos cirurgia Sham ou *DSA* em animais SHR e Wistar de 41 dias e, após a 13ª semana realizamos estudos funcionais e a análise imunohistoquímica para DBH e VP. **Resultados:** S determinou no PVN diminuição idade-dependente da OTir em todos os subnúcleos magnocelular (*mg*), *dorsal cap* (*dc*), ventromedial (*vm*) e posterior (*Po*), sem alterações significativas de DBHir, e e sem alteração de OTir em áreas bulbares, como DMV, NTS, BVLc e BVLr. T induziu aumento a partir de  $T_2$  da síntese de DBH no NTS caudal, intermediário e BVLc, e o T induziu uma diminuição da de DBH no BVLr. No PVN $vm$  e  $Po$  houve pronto aumento da OTir em  $T_2$  vs  $S_0$ , e DBHir em  $T_2$  vs  $S_0$ , e aumento de botões sinápticos NORérgicos em neurônios OTérgicos, e bradicardia de repouso entre  $T_4$  e  $T_8$ , sem alterar a pressão arterial. A remoção dos barorreceptores diminuiu a densidade das projeções OTérgica no NTS intermediário, BVLr e no PVN *mg*, *dc*, *vm* e *Po*, além disso a desnervação sino-aórtica bloqueiou todos os efeitos induzidos pelo treinamento, como o aumento de DBHir no NTS caudal e intermediário, no caudal e rostral VLM e em todo PVN (*mg*, *dc*, *vm* e *Po*) e impediu o aumento de OTir em ambas as áreas do bulbo quando comparamos *DSA* -T vs. *SHAM*-T. No protocolo de saporina, a marcada redução das projeções NORérgicas induziu um significativa queda na síntese de OT em todo o PVN medial e posterior, e o T não foi capaz em aumentar a OTir. Em áreas bulbares, observamos que a DBHx induziu redução na DBHir e de neurônios NORérgicos no NTS caudal e intermediário e BVLc, porém não houve alteração no BVLr em animais S. No grupo DBHx-T houve aumento na síntese

proteína de DBH em todo o bulbo, com exceção do BVLr. Houve uma marcada redução das projeções Otérgicas em todo bulbo, mas não houve alteração da OTir em DBHx, e não foi observado bradicardia de repouso. No *protocolo II*, WKY e SHR, de 28 dias, possuem PA semelhantes, qual aumentou a partir de S<sub>2</sub> apenas em SHR. Animais SHR em fase pré-hipertensiva já possuem FC aumentada, comparado com os WKY, permanecendo com valores superiores até o final do protocolo, em ambas as linhagens houve uma diminuição da FC basal idade depende. Com a técnica de imunoistoquímica de fluorescência, observamos que a VPir é maior em SHR (vs. WKY) durante as 8 semanas de avaliação apenas no PVN<sub>mg</sub>, no PVN<sub>vm</sub> e posterior o conteúdo de VP é semelhante entre as duas linhagens em S<sub>0</sub> (4 semanas de vida), porém há um aumento significativo e progressivo a partir da S<sub>1</sub>, apenas em animais SHR. Com os experimentos DSA, observamos a eficácia da cirurgia da remoção dos barorreceptores, devido a ausência da resposta reflexa bradicárdica e taquicardia em animais DSA. A DSA impediu o desenvolvimento da hipertensão em animais SHR, assim como houve um bloqueio do aumento de VP em todo PVN medial (*mg*, *vm* e *dc*) e PVN posterior. **Conclusão:** A observação de que a instalação da bradicardia de repouso (a partir de T<sub>4</sub>) ocorria após o aumento da densidade de neurônios Otérgicos do PVN que se projetam ao complexo solitário-vagal sugere que alterações induzidas pelo T no controle autonômico do coração são dependentes da maior modulação Otérgica ao complexo solitário-vagal desencadeado pela sinalização NORérgica ascendente. O bloqueio destes efeitos sugere ainda que a sinalização carregada pelos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos é um fator decisivo em desencadear os efeitos benéficos do T ao sistema cardiovascular. Podemos concluir também que o aumento da PA é acompanhado pelo aumento do conteúdo de VP em áreas que contém neurônios pré-autonômicos, e que os baro e quimiorreceptores desempenham papel chave no desenvolvimento da hipertensão.

## Abstract

Santos CR. Pre autonomic neurons of the hypothalamus and noradrenergic afferent signaling: hypertension, exercise training and sinoaortic denervation effects. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2018.

**Introduction:** Suprabulbar pathways as well as brainstem nuclei are of vital importance in cardiovascular modulation. The afferent information arriving at the NTS ascends to suprabulbar areas by noradrenergic (NORergic) neurons projecting mainly to ocytocinergics (OTergics) and vasopressinergic (VPergicos) pre-autonomic neurons of the Paraventricular Nucleus of Hypothalamus (PVN), which they project to brainstem areas, closing a modulatory circuit. It is our hypothesis that hypertension and / or training may alter the plasticity of ascending NORergic pathways which, by modifying afferent signaling, would trigger plastic and functional responses in pre-autonomic PVN neurons, altering cardiovascular modulation in these situations. **Aim:** To study the functioning of suprabulbar pathway in autonomic modulation, evaluating the sequential effects of hypertension and training on ascending NORergic signaling and on the plasticity / activity of OTergic and VPergic neurons projecting to cardiovascular control brainstem areas. **Methods:** Protocol I - Adult Wistar rats were submitted to training (T) of low intensity (50-60% of the maximum capacity, 5 days / week, 1h / day) or were kept in the sedentary (S) for 8 weeks. After recording baseline hemodynamics at weeks 0 (S0 and T0), 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 8 (T8 and S8) [Time course protocol]; after 8 weeks of T or S [ for protocol of selective lesion of ascending NORergic neurons by saporin]; and after 12 weeks of T or S [for the SHAM & Sino aortic denervation (SAD) protocols] the rats were euthanized for perfusion and fixation of the brain. Slices (30 µm) of the PVN were processed for immunohistochemistry double-labelling for OT and dopamine beta-hydroxylase (DBH); images were acquired by fluorescence and confocal microscopy and analyzed by ImageJ and Imaris, respectively. Protocol II - SHR and WKY (4 weeks old at the beginning of protocols) were kept sedentary (S) for 8 weeks. In the experimental weeks 0, 1, 2, 4, 8 we evaluated the functional [parameters baseline arterial pressure (AP) and heart rate (HR)] and immunohistochemistry for VP and DBH; in another protocol, we performed Sham or SAD surgery in SHR and Wistar animals of 41 days. After the 13th week we performed functional studies and immunohistochemical analysis for DBH and VP. **Results:** Within PVN, there was age-dependent reduction in S group of OT immunoreactivity (ir) all magnocellular (mg), dorsal cap (dc), ventromedial (vm) and posterior (Po) subnuclei, without significant changes in DBHir, and a decrease of OTir in brainstem areas such as DMV, caudal and intermediate NTS, CVLM and RVLM. T induced increase from T2 in the synthesis of DBH in the NTS caudal, intermediate and CVLM, and T induced a decrease in DBH in RVLM. In PVNvm and Po, there was a rapid increase of OTir in T2 vs S0, and DBHir in T2 vs S0, an increase of NORergic synaptic boutons in OTergic neurons and resting bradycardia between T4 and T8, without altering blood pressure. Removal of the baroreceptors decreased the density of the OTergic projections in the NTS intermediate, RVLM and in the PVN mg, dc, vm and Po. Furthermore sino-aortic denervation blocked all training-induced effects, such as increased DBHir in the caudal and intermediate NTS, within caudal and rostral VLM and in the whole PVN (mg, dc, vm and Po) and prevented the increase of OTir in both areas of the

brainstem when we compared SAD-T vs. SHAM-T. In the saporin protocol, the marked reduction of the NORergic projections induced a significant decrease in OT synthesis throughout the medial and posterior PVN, and the T was not able to increase the OTir. In the S group on the brainstem areas, we observed that DBHx induced reduction in DBHir and NORergic neurons in the caudal and intermediate NTS and CVLM, but there was no change in RVLM. In the DBHx-T group there was an increase in protein synthesis of DBH in the whole brainstem, with the exception of RVLM. There was a marked reduction of the OTergics projections in every brainstem, but there was no change of OTir in DBHx, and there was no resting bradycardia. In protocol II, WKY and SHR, of 28 days, have similar PA, which increased from S2 only in SHR. SHR animals in the prehypertensive phase already have HR increased, compared with WKY, remaining with higher values until the end of the protocol, in both strain there was a decrease in HR baseline age dependent. With the fluorescence immunohistochemistry technique, we observed that VPir is higher in SHR (vs. WKY) during the 8-week evaluation only in PVNmg, in PVNvm and posterior the VP content is similar between the two strains in S0 (4 weeks of life), but there is a significant and progressive increase from S1, only in SHR animals. With the SAD experiments, we observed the efficacy of baroreceptor removal surgery, due to the absence of bradycardic and tachycardia reflex response in SAD animals. SAD prevented the development of hypertension in SHR animals, as well as a blockade of the increase of VP in all medial PVN (mg, vm and dc) and posterior PVN. **Conclusion:** The observation that the installation of resting bradycardia (from T4) occurred after increasing the density of PVN OTergic neurons projecting to the solitary-vagal complex suggests that T-induced changes in the autonomic control of the heart are dependent of the greater modulation OTergic to the solitary-vagal complex triggered by ascending NORergic signaling. The blockade of these effects also suggests that the signaling carried by the baroreceptors and peripheral chemoreceptors is a decisive factor in triggering the beneficial effects of T on the cardiovascular system. We can also conclude that increased BP is accompanied by increased VP content in areas containing pre-autonomic neurons, and that baro and chemoreceptors play a key role in the development of hypertension.

## Lista de Figuras

- Figura 1 - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação e os 3 testes de esforço máximo realizados para os grupos time course. .... 37
- Figura 2: Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação, cirurgia e recuperação e os 4 testes de esforço máximo realizados para os grupos SHAM & SAD. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3 - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação, cirurgia e recuperação e os 4 testes de esforço máximo realizados para os grupos SHAM & DBHx. 39
- Figura 4 - Ilustração da remoção dos barorreceptores. .... 41
- Figura 5: Fotomicrografia da região do RVLM contendo neurônios catecolaminérgicos, foram quantificados os neurônios mais laterais (círculo amarelo) ..... 44
- Figura 6 - Evolução temporal do desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço em km/h) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S).. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7 - Evolução temporal da PAM basal (painel à esquerda) e FC basal (painel à direita) durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) nas 8 semanas experimentais..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade de neurônios Noradrenérgicos (em verde) no NTS intermediário de ratos Wistar sedentários (S<sub>0</sub> e S<sub>8</sub>) e treinados (T, T<sub>2</sub> e T<sub>8</sub>)..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9 - Fotomicrografias ilustrativas da imunorreatividade de neurônios Noradrenérgicos no CVLM de ratos Wistar sedentários (S) e treinados (T) nas semanas 0, 2 e 8 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10 - Fotomicrografias ilustrativas da imunorreatividade de neurônios Noradrenérgicos no RVLM de ratos Wistar sedentários (S) e treinados (T) nas semanas 0, 2 e 8 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a densidade (% de área) de DBH<sub>ir</sub> em diferentes núcleos do tronco cerebral: NTS caudal e intermediário, Bulbo rostroventrolateral caudal (CVLM) e rostral (RVLM). .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade de neurônios OTérgicos e terminais NORérgicos no PVN medial de ratos Wistar sedentários (S) e treinados (T) nos semanas experimentais 0, 2 e 8..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a densidade (em % de área) de OT<sub>ir</sub> e DBH<sub>ir</sub> em diferentes subnúcleos do PVN medial: magnocelular **Erro! Indicador não definido.**

Figura 14 - Fotomicrografias adquiridas por Microscopia Confocal com reconstrução 3D de neurônios OTérgicos e das projeções NORérgicas, destacando os botões sinápticos DBH-positivos que fazem sinapse (em roxo) daquelas que não contatam (tons amarelados) os neurônios OT-positivos no PVN ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 15 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a densidade de botões sinápticos por neurônio OTérgico no PVN ventromedial e PVN posterior ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 16 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade de terminações OTérgicas (em vermelho) no NTS intermediário de ratos Wistar sedentários (S<sub>0</sub> e S<sub>8</sub>) e treinados (T, T<sub>2</sub> e T<sub>8</sub>). ...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 17 - Efeitos sequenciais do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a densidade (% de área) de OTir em diferentes núcleos do tronco cerebral ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18 - Evolução temporal do desempenho em esteira nos grupos SHAM e SAD durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19 - Comparação dos valores basais de pressão arterial média (PAM) e da Frequência Cardíaca (FC) e da sensibilidade do reflexo barorreceptor cardíaco ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para DBH em neurônios NORérgicos (verde) no NTS intermediário de ratos SHAM e SAD submetidos a 12 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21 - Fotomicrografias da imunorreatividade de neurônios NORérgicos no CVLM de ratos SHAM e SAD submetidos a 12 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22 - Fotomicrografias da imunorreatividade de neurônios NORérgicos no RVLM de ratos SHAM e SAD submetidos a 12 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) de DBHir em diferentes núcleos bulbares: ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade de neurônios OTérgicos (vermelho, painéis à esquerda) e terminais NORérgicos (verde, painéis à direita) no PVN medial de ratos SHAM e SAD submetidos a 12 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S).. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) de DBHir e de OTir em diferentes subnúcleos do PVN medial. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26 - Fotomicrografias da reconstrução 3D de neurônios OTérgicos e das projeções DBH-positivas obtidas pela Microscopia confocal em um rato SHAM treinado (SHAM-T) e outro SAD treinado (SAD-T). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade de botões sinápticos no PVN ventromedial (painel da esquerda) e no PVN posterior (painel da direita). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28 - Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para projeções OTérgicas (vermelho) no NTS intermediário de ratos SHAM e SAD submetidos a 12 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) de OTir em diferentes núcleos bulbares: ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade de botões sinápticos no PVN ventromedial e no PVN posterior. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31 - Comparação dos efeitos da lesão seletiva dos neurônios NORérgicos (DBHx) que se projetam ao PVN e do treinamento aeróbio sobre valores basais de pressão arterial média (PAM – painel da esquerda) e frequência cardíaca (painel da direita). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32 - Fotomicrografias ilustrando a imunofluorescência de terminais NORérgicos (verde, painéis à esquerda) e neurônios OTérgicos (vermelho, painéis à direita) dos grupos SHAM e DBHx submetidos a 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33 - Comparação dos efeitos da DBH-saporina e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) de DBHir (painéis à esquerda) e OTir (painéis à direita) em diferentes subnúcleos do PVN medial. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34 - Fotomicrografias de neurônios OTérgicos (em vermelho) e de projeções NORérgicas (em verde) obtidas pela microscopia confocal em um rato SHAM treinado (SHAM-T) e outro tratado com saporina também treinado (DBHx-T). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35 - Fotomicrografias ilustrando a imunofluorescência e a densidade de neurônios NORérgicos em diferentes áreas bulbares: NTS intermediário (painéis à esquerda); CVLM (painéis centrais); e RVLN (painéis à direita) dos grupos SHAM e DBHx submetidos a 8 semanas de treinamento (T) ou sedentarismo (S). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36 - Comparação dos efeitos da lesão dos neurônios noradrenérgicos e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) de DBHir (painéis à esquerda) e OTir (painéis à direita) em diferentes núcleos do bulbo ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37 - Comparação dos efeitos da lesão de neurônios NORérgicos e do treinamento aeróbio sobre o número de corpos celulares DBH-positivos em diferentes núcleos bulbares .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38 - Evolução dos níveis basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos (WKY) e hipertensos espontâneos (SHR) durante as 8 semanas experimentais. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 39 - Fotomicrografias da imunorreatividade de terminais NORérgicos e neurônios VPérgicos no PVN medial de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) em diferentes idades ( $S_0 = 4$  semanas de vida;  $S_2 = 6$  semanas de vida; e  $S_8 = 12$  semanas de vida)... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 40 - Alterações sequenciais da densidade (% de área) de terminais NORérgicos e neurônios VPérgicos em diferentes subnúcleos do PVN dos grupos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) durante o estabelecimento da hipertensão.  $S_0$ ,  $S_4$  e  $S_8$  correspondem respectivamente a 1, 2 e 3 meses de idade. A ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41 - Fotomicrografias da imunorreatividade de terminais VPérgicos em animais normotensos (WKY – painel superior) e hipertensos (SHR – painel inferior) com 3 meses de idade. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 42 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica em ratos Wistar e SHR jovens sobre valores basais da pressão arterial diastólica, sistólica e média, da frequência cardíaca e da bradicardia e taquicardia reflexas, indicativas da eficácia da SAD em ambos os grupos experimentais..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 43 - Fotomicrografias da imunorreatividade de neurônios VPérgicos (vermelho, painéis à direita) e terminais NORérgicos (verde, painéis à esquerda) dos grupos SHAM e SAD em animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 44 - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade (% de área) VPir (painéis à esquerda) e DBHir (painéis à direita) em diferentes subnúcleos do PVN medial. .... **Erro! Indicador não definido.**

## Índice de tabela e quadros

<b>Tabela 1</b> - Cronograma das atividades a serem realizadas durante o período restante de doutorado .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Tabela 2</b> - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S). .....	59
<b>Tabela 3</b> - Valores basais e respostas de PAM e FC em ratos Wistar submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). .....	59
<b>Tabela 4</b> – Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos da densidade de DBHir (% área) no NTS caudal e intermediário, CVLM e RVLM . .....	60
<b>Tabela 5</b> - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos em fração de área de DBH e OT no PVN medial e PVN posterior. .....	61
<b>Tabela 6</b> - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a área e volume de neurônios OTérgicos e de botões sinápticos NORérgicos no PVN medial e PVN posterior. .....	62
<b>Tabela 7</b> - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos em fração de área de OT no DMV, NTS caudal e NTS intermediário, CVLM e RVLM. .....	62
<b>Tabela 8</b> - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 6, 12 e ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) . .....	64
<b>Tabela 9</b> - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso e teste da sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de	

bradicardia e taquicardia reflexas nos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).....	64
<b>Tabela 10</b> - Comparação da expressão proteica (em unidades arbitrárias) de DBH no NTS commisural e intermediário; CVLM e RVLM nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S). * vs SHAM; † vs S, p<0,05 .....	65
<b>Tabela 11</b> - Efeitos do treinamento e SAD sobre valores relativos em fração de área de DBH e OT no PVN medial e PVN posterior .....	65
<b>Tabela 12</b> - Efeitos do treinamento (T) e SAD sobre a área e volume de neurônios OTérgicos e de botões sinápticos NORérgicos no PVN medial e PVN posterior.....	65
<b>Tabela 13</b> - Comparação da expressão proteica (em unidades arbitrárias) de OT no NTS commisural e intermediário; CVLM e RVLM nos grupos SHAM e SAD, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S). .....	66
<b>Tabela 14</b> - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e lesão das projeções noradrenérgicas do PVN (DBHx).....	66
<b>Tabela 15</b> - Valores absolutos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso nos SHAM e DBHx submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). .....	66
<b>Tabela 16</b> - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de DBH e OT no PVN medial e PVN posterior. * vs SHAM, † vs S, P<0,05. ....	67
<b>Tabela 17</b> - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de OT em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; CVLM e RVLM .....	67
<b>Tabela 18</b> - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de DBH em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; CVLM e RVLM.....	67
<b>Tabela 19</b> - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos de número dos neurônios DBH+ em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; CVLM e RVLM. ....	67
<b>Tabela 20</b> - Valores basais e respostas de PAM e FC em ratos WKY e SHR ao longo de 8 semanas de análise.....	68
<b>Tabela 21</b> - Efeitos temporal sobre valores relativos em fração de área de VP no PVN medial e PVN posterior .....	68
<b>Tabela 22</b> - Efeitos temporal sobre valores relativos em fração de área de DBH no PVN medial e PVN posterior. * vs Semana 0, † vs WKY, P<0,05.....	69
<b>Tabela 23</b> - Valores absolutos de pressão arterial diastólica (PAD), PA sistólica (PAS), PA média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso e Sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas nos SHAM e SAD das duas linhagens Wistar e SHR. ....	70

**Tabela 24** - Efeitos da hipertensão e SAD sobre valores relativos em fração de área de VP no PVN medial e PVN posterior. \* vs Sham, † vs Wistar,  $p < 0,05$ . ..... 70

**Tabela 25** - Efeitos da hipertensão e SAD sobre valores relativos em fração de área de DBH no PVN medial e PVN posterior ..... 71

### Lista de abreviaturas e siglas

<b>3V</b> – 3°. ventrículo	<b>OTérgicos</b> – ocitocinérgicos
<b>AP</b> – área postrema	<b>PAS</b> – pressão arterial sistólica
<b>b/min</b> – batimentos por minuto	<b>PA</b> – pressão arterial
<b>BVLc</b> – bulbo ventro-lateral caudal	<b>PAM</b> – pressão arterial média
<b>BVLr</b> – bulbo ventro-lateral rostral	<b>PB</b> – phosphate buffer (tampão fosfato)
<b>CV</b> – capacitância venosa	<b>PFA</b> – paraformoldeído
<b>DBH</b> – dopamina beta hidroxilase	<b>post</b> – posterior
<b>DBHx</b> – lesão seletiva de neurônios DBH+	<b>PVN</b> – Núcleo do Paraventricular
<b>Dc</b> – dorsal cap	<b>RP</b> – resistência periférica
<b>DMV</b> – núcleo dorsal motor do vago	<b>RT-PCR</b> – reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa
<b>DAS</b> – desnervação sinoaórtica	<b>RV</b> – retorno venoso
<b>EPM</b> – erro padrão da média	<b>S</b> – sedentário
<b>FC</b> – frequência cardíaca	<b>SHR</b> – ratos espontaneamente hipertensos
<b>ICB</b> – Instituto Ciências Biomédicas	<b>SON</b> – Núcleo do Supraóptico
<b>Ip</b> – intraperitoneal	<b>SPF</b> – specific pathogen free
<b>Iv</b> – intravenoso	<b>T</b> – treinado
<b>Km/h</b> – quilômetros por hora	<b>Vm</b> - ventromedial
<b>M</b> – molar	<b>VP</b> – vasopressina
<b>Mg</b> – magnocelular	<b>VPérgicos</b> – vasopressinérgicos
<b>NA</b> – Núcleo Ambigus	<b>WKY</b> – wistar kyoto
<b>NTS</b> – Nucleo do trato solitário	<b>ADI</b> - área de interesse
<b>NORérgicos</b> – noradrenérgicos	
<b>OT</b> – ocitocina	

<b>1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Plasticidade neuronal induzida pelo Treinamento e Ocitocina .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2 Vasopressina e implicações com hipertensão .....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Animais experimentais .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Razões pela mudança de animais .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Protocolo I.....</b>	<b>36</b>
3.3.1 <i>Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais .....</i>	36
3.3.2 <i>Protocolo de treinamento Físico ou Sedentarismo .....</i>	36
3.3.2.1 <i>Análise Temporal do Treinamento .....</i>	37
3.3.2.2 <i>SHAM &amp; DSA .....</i>	37
3.3.2.3 <i>Lesão neurônios noradrenérgicos que se projetam ao PVN e Sham.....</i>	38
<b>3.4 Protocolo II .....</b>	<b>39</b>
3.4.1 <i>Efeitos temporais da instalação da hipertensão .....</i>	39
3.4.2 <i>Efeitos da desnervação sino-aórtica em animais pré-hipertensos e normotensos.....</i>	40
<b>3.5 Desnervação sino-aórtica (DSA) ou cirurgia fictícia (SHAM).....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Comprovação da desnervação sino-aórtica .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Canulação arterial e venosa e registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais.....</b>	<b>41</b>
<b>3.8 Análise espectral de parâmetros cardiovasculares.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9 Obtenção do tecido cerebral para análise da imuno-histoquímica.....</b>	<b>42</b>
<b>3.10 Obtenção de imagens por confocal e quantificação.....</b>	<b>45</b>
<b>3.11 Apresentação dos dados e análise estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
<b>4.1 Protocolo I.....</b>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1 <i>Efeitos sequenciais do T aeróbio .....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.1 <i>Desempenho em esteira .....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.2 <i>Alterações sequenciais dos parâmetros hemodinâmicos durante T e S .....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.3 <i>Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre os neurônios Noradrenérgicos em áreas bulbares de integração cardiovascular. ....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.4 <i>Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre a expressão de DBH e OT nos diferentes subnúcleos do PVN.....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.5 <i>Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre a densidade de botões sinápticos NORérgicos em neurônios OTérgicos do PVN.....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
4.1.1.6 <i>Efeitos temporais do treinamento e sedentarismo sobre a densidade de projeções sinápticas OTérgicas a áreas bulbares de controle cardiovascular .....</i>	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>

4.1.1.7 Efeitos temporais do treinamento da correlação da circuitaria suprabulbar e modulação parassimpática e bradicardia de repouso. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2 Efeitos da desnervação sino-aórtica sobre os parâmetros funcionais em ratos sedentários e treinados (protocolo DSA vs SHAM).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2.1 Desempenho em esteira.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2.2 Alterações dos parâmetros hemodinâmicos induzidos pelo treinamento e DSA... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.1.2.3 Efeitos do treinamento e DSA sobre a expressão proteica de DBH nas diferentes áreas bulbares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2.4 Efeitos do treinamento e DSA sobre a expressão proteica de OT e DBH nos diferentes subnúcleos do PVN .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2.5 Efeito do treinamento aeróbio e sedentarismo associados à DSA sobre a densidade de botões sinápticos NORérgicos em neurônios OTérgicos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2.6 Efeitos do treinamento e DSA sobre a expressão proteica de OT nas diferentes áreas bulbares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3 Efeitos da lesão específica de neurônios DBH-positivos em ratos sedentários e treinados (protocolo DBH-SAPORINA).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3.1 Desempenho em esteira.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3.2 Alterações dos parâmetros hemodinâmicos induzidas pelo treinamento e DBHx <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.1.3.3 Efeitos do treinamento e DBHx sobre a expressão proteica de DBH nas diferentes áreas bulbares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3.4 Efeitos do treinamento e DBHx sobre a expressão proteica de OT e DBH nos diferentes subnúcleos do PVN .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3.5 Efeitos do treinamento e DBHx sobre a densidade de botões sinápticos NORérgicos em neurônios OTérgicos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.3.6 Efeitos do treinamento e DBHx sobre a expressão proteica de OT e DBH nas diferentes áreas bulbares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.2 Protocolo II .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1 Evolução dos níveis pressóricos da fase pré-hipertensiva à fase crônica da hipertensão. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.1 Evolução temporal dos níveis basais de pressão arterial e frequência cardíaca em SHR e WKY .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2 Efeitos temporais sobre a expressão proteica de VP e DBH nos diferentes subnúcleos do PVN .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.3 Correlação entre valores do conteúdo de DBH e VP e pressão arterial média nos animais hipertensos e seus controles normotensos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2 Efeito da desnervação sinoaórtica em SHR ainda na fase pré-hipertensiva SHR <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.2.2.1 Efeito da desnervação sinoaórtica sobre parâmetros hemodinâmicos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.2 Efeito da desnervação sinoaórtica sobre a expressão de projeções NORérgicas e neurônios VPérgicos no PVN .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>Apêndice I .....</b>	<b>59</b>

## **1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

É de suma importância que a pressão arterial (PA) seja mantida em níveis adequados frente a qualquer situação fisiológica como o repouso, o sono, a vigília, o exercício ou mesmo em diferentes patologias, a fim de propiciar, a todos os tecidos, suprimento de sangue com pressão e volume adequados às necessidades momentâneas. Diversos mecanismos são responsáveis por controlar/manter a PA, envolvendo respostas a longo-prazo (balanço entre a ingestão/excreção de água e sal e alterações estruturais) e respostas a médio- e curto-prazo como mecanismos neurais, hormonais e locais (MICHELINI, 2012). A regulação a curto- e médio-prazo, ou regulação neuro-hormonal da PA, envolve basicamente mecanismos reflexos intrínsecos ao sistema cardiovascular mediados pelos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais e receptores cardiopulmonares, sendo de grande importância para a manutenção da PA tanto no repouso quanto no exercício físico. A regulação comandada pelos barorreceptores arteriais é considerada o principal mecanismo de controle momento-a-momento da PA. (MICHELINI, 2001 e 2012; SVED & GORDON, 1994).

As aferências dos barorreceptores são ativadas através do estiramento de seus receptores localizados na parede da aorta e do seio carotídeo durante a sístole cardíaca. A magnitude da deformação arterial é codificada pela frequência de disparos e integrada em áreas específicas do sistema nervoso central, promovendo ajustes específicos através da ação simpática e parassimpática aos efetores cardiovasculares (MICHELINI, 2007; MICHELINI & STERN, 2009).

É bem conhecido que, no “circuito neural” de regulação da PA, o núcleo do trato solitário (NTS) constitui-se na 1ª estação sináptica no sistema nervoso central das informações carreadas pelos barorreceptores arteriais, como demonstrado na Figura 1 (MICHELINI & MORRIS, 1999). A cada sístole arterial, os potenciais de ação gerados pela distensão dos barorreceptores trafegam pelas fibras aferentes em direção ao bulbo dorsal, onde contatam e excitam neurônios de segunda ordem localizados no NTS. Neurônios glutamatérgicos do NTS projetam-se para o bulbo ventrolateral caudal (BVLc) onde ativam neurônios inibitórios gabaérgicos que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral (BVLr),

área em que se situam os corpos celulares dos neurônios bulbo espinhais simpato-excitatórios (glutamatérgicos) que se projetam aos pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal (colinérgicos), os quais por sua vez excitam os pós-ganglionares (noradrenérgicos) ao coração e vasos. Durante elevações da PA, frente à inibição do BVLr pelo BVLc, ocorre redução do tono simpático com aumento da capacitância venosa (CV) e redução do retorno venoso (RV), redução da frequência e contratilidade cardíaca e redução da resistência periférica (RP). Paralelamente, outros neurônios glutamatérgicos do NTS projetam-se e excitam os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (colinérgicos) localizados no núcleo motor dorsal do vago (DMV) e no núcleo ambíguo (NA), os quais se projetam aos pós-ganglionares localizados intra-muralmente no coração reduzindo, quando estimulados, a frequência cardíaca (FC) (MICHELINI, 2012). Há, portanto durante estimulação aumentada dos barorreceptores, queda da PA, corrigindo sua elevação inicial e trazendo a PA de volta a seus níveis basais. Respostas opostas (aumentos do RV, da FC, da contratilidade, do DC e aumento da RP, resultando em aumento da PA) ocorrem durante quedas transitórias da PA que estimulam menos ou não estimulam os barorreceptores (MICHELINI, 2012). Desta forma os barorreceptores arteriais, sensíveis a variações instantâneas da PA, mantêm momento-a-momento o controle do tônus simpático e parassimpático para o sistema cardiovascular (MICHELINI & MORRIS, 1999). Esta circuitaria neuronal constitui o *arco-reflexo primário* ou *alça bulbar do controle cardiovascular*.

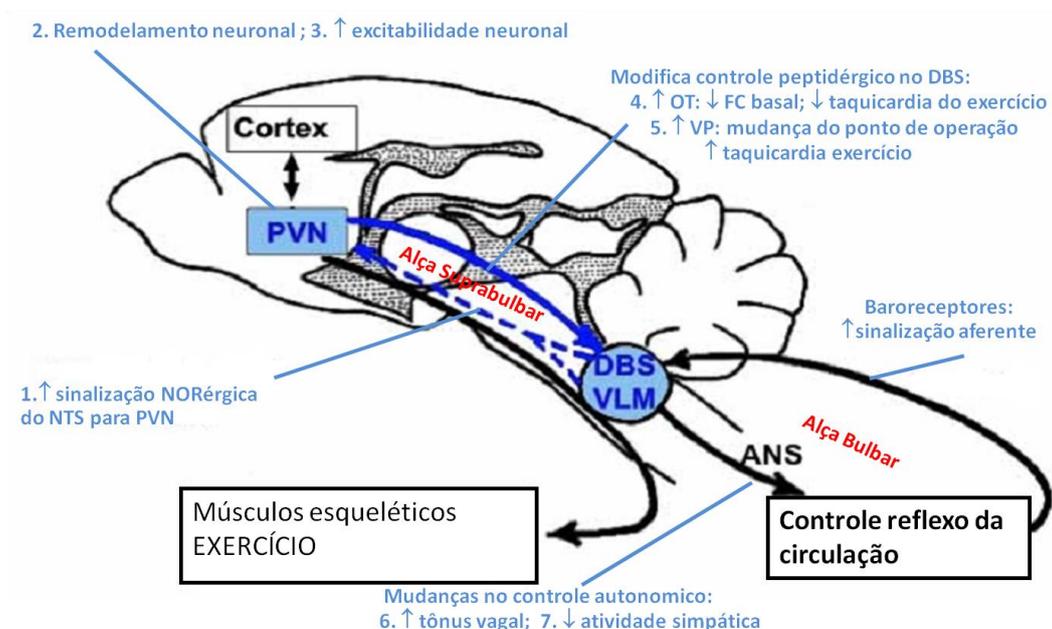
Além da alça primária de integração bulbar do reflexo, o controle cardiovascular conta com outros circuitos suprabulbares de integração e modulação, os quais propiciam ajustes finos e diferenciais da circulação em situações específicas como, por exemplo: o exercício, o sono, situações de estresse, etc.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

É grande o contingente de fibras NORérgicas ascendentes do NTS e BVLc que se projetam a neurônios parvocelulares do PVN (os chamados neurônios pré-autonômicos), VPérgicos e OTérgicos (SAWCHENKO & SWANSON, 1982), os quais se projetam diretamente a áreas bulbares e espinais (NTS, DMV, NA, BVL, coluna intermediolateral, SAWCHENKO & SAWNSON 1982) envolvidas no controle autonômico da circulação, fechando um circuito modulatório, que constitui a chamada *alça secundária* ou *alça suprabulbar* de modulação do controle autonômico do sistema cardiovascular. Portanto, no controle da função cardiovascular há envolvimento conjunto de áreas bulbares e suprabulbares, cujas conexões recíprocas (NTS-PVN e PVN-NTS e outras áreas bulbares) formam um pronto circuito modulatório de integração bulbar, podendo inclusive modular a própria sinalização aferente ao NTS (BAILEY et al., 2006; PETERS et al., 2008). As alças de integração bulbar e suprabulbar ativadas pelos barorreceptores funcionam sincronicamente de forma a garantir um controle mais eficaz da PA, principalmente durante atividades comportamentais (como é o caso do exercício físico) quando a integração suprabulbar torna-se preponderante em garantir, por exemplo a taquicardia do exercício durante elevação da PA gerados pela atividade motora, a qual garante a eficiência circulatória (MICHELINI & MORRIS, 1999; MICHELINI, 2001, MICHELINI & STERN, 2009).

Estudos do laboratório demonstraram que as projeções descendentes hipotalâmicas participam de ajustes do controle cardiovascular induzidas tanto pelo exercício crônico (treinamento) como pelo exercício agudo. Sabe-se que durante o exercício crônico há em ratos treinados ativação das projeções OTérgicas do PVN ao bulbo, uma vez que apenas neste grupo houve aumento da liberação endógena de OT na região dorsal do bulbo (abrangendo NTS/DMV), sem nenhuma alteração significativa nos ratos sedentários (BRAGA et al., 2000). Esta resposta era acompanhada de ativação vagal ao coração e menor resposta taquicárdica nos ratos treinados quando comparados aos controles sedentários para a mesma carga de exercício (MICHELINI, 2001; MICHELINI & STERN, 2009; HIGATANIGUCHI et al, 2009). Higa et al (2002) e Michelini (2007) também demonstraram que a administração de OT no NTS/DMV durante a ativação dos barorreceptores causava ativação vagal e maior resposta bradicárdica, a qual era revertida pelo bloqueio dos receptores de OT nesta área.

Por outro lado, Michelini e Bonagamba (1988) observaram que a administração de VP no NTS não alterava a sensibilidade do reflexo, mas deslocava o ponto de operação do

reflexo para níveis mais elevados de FC, diminuindo a resposta bradicárdica por reduzir a inibição simpática durante elevações transitórias da PA, situação similar encontrada em uma sessão aguda de exercício, em que há uma redução da inibição simpática, permitindo que ocorra, concomitante ao aumento da PA, a taquicardia de exercício, essencial para manter débito cardíaco aumentado e fornecer apropriado aporte sanguíneo para músculos exercitados (MITCHEL, 1990; MICHELINI, 2007).



**Figura 1** - Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares. As áreas mencionadas facilitam o controle autônomo da circulação durante o exercício. Fonte: Adaptado de Michelini; Stern, 2009, Santos (2013).

### 1.1 Plasticidade neuronal induzida pelo Treinamento e Ocitocina

Tradicionalmente a OT era conhecida por seus efeitos no utero e ejeção de leite (NICKERSON et al, 1954). Trabalhos posteriores, no entanto, demonstraram que indivíduos machos possuem a mesma quantidade de neurônios OTérgicos que o observado em fêmeas (CITAÇÃO). Vários estudos demonstraram que neurônios OTérgicos possuem diferentes funções periféricas, como a natriurese (VERBALIS & DOHANICS, 1991); a redução da PA (PETTY et al., 1985) e da FC (FAVARETTO et al., 1997), além de inúmeros efeitos sociais como o aumento na confiança humana (KOSFELD et al.; 2005); a alteração no cuidado parental e maternal (NABER et al., 2010); a maior afinidade de casais (NUMAN & YOUNG, 2010); a grande empatia entre pessoas ou a melhora da comunicação social (BURKETT et al., 2016) além do envolvimento com doenças psiquiátricas (Autismo,

esquizofrenia, depressão; BERNSTEIN et al., 2018). Em conjunto esses trabalhos comprovaram o papel fundamental da OT em várias funções fisiológicas além de seu papel na reprodução.

Pinol e colaboradores (2014) demonstraram que fotoestimulação de fibras OTérgicas do hipotálamo ao bulbo ativa receptores OTérgicos, os quais por co-liberação de OT e glutamato, facilitam excitação de neurônios cardio-vagais do DMV que possuem projeções ao coração. Demonstraram ainda que a OT aumentava a facilitação de pulsos pareados e prolongava a neurotransmissão glutamatérgica, aumentando a excitação dos cardio-vagais e mantendo um elevado disparo desses neurônios responsáveis por gerar atividade parassimpática ao coração.

Trabalhos do laboratório já demonstrava que essas mesmas projeções OTérgicas do PVN-NTS/DMV eram são capazes de alterar a bradicardia reflexa induzida pela variação pressórica. Pré tratamento de OT no NTS aumentava a sensibilidade da bradicardia reflexa, enquanto seu bloqueio endógeno reduzia a resposta bradicardica (HIGA et al, 2002; MICHELINI, 2007). Este efeito estava ausente em ratos tratados com atropina, mas ainda observado em ratos tratados com propranolol i.v., indicando que a melhora do ganho do barorreflexo era mediado pelo aumento do tônus vagal ao coração induzido pela ativação de receptores de OT (HIGA et al, 2002; MICHELINI, 2007).

Uma outra forma de melhorar o ganho barorreflexo e a atividade parassimpática ao coração é a prática continuada da atividade física (treinamento aeróbio de baixa a moderada, MICHELINI et al., 2015). Uma linha de investigação à qual o grupo da Dra. Michelini tem se dedicado na última década é a de que os ajustes cardiovasculares observados durante o treinamento (redistribuição de fluxo, a manutenção de elevada FC frente a aumento da PA durante exercício, a bradicardia de repouso após treinamento, etc.) seriam mediados pela ação conjunta de vias bulbares e suprabulbares (MICHELINI & STERN, 2009). É conhecido que o treinamento induz alterações plásticas do sistema OTérgico central modulando os ajustes específicos da FC. Estudos mais recentes, associando técnicas funcionais às de biologia molecular, mostraram que o treinamento determinava aumento significativo da expressão gênica e proteica de OT seja na região biossintética (PVN) e maior densidade de projeções OTérgicas no NTS/DMV, indicando que o treinamento produzia intensa ativação das projeções OTérgicas do PVN à regiões bulbares envolvidas no controle cardiovascular (CAVALLERI et al, 2011; CRUZ et al, 2012; MARTINS et al, 2005). Evidenciou-se também em normotensos e hipertensos treinados, que o aumento da

densidade de neurônios OTérgicos no PVN correlacionava-se positivamente com a bradicardia de repouso e com a menor resposta taquicárdica ao exercício (HIGATANIGUCHI et al, 2007; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al, 2012).

De fato, Braga e colaboradores (2000) já haviam demonstrado a importância fisiológica da liberação de OT em áreas pre autonômicas. O pré-tratamento do NTS com antagonista de receptores de OT não alterava a resposta pressora, mas potencializava a taquicardia do exercício apenas nos ratos treinados, indicando que o treinamento ativava mecanismos OTérgicos supra-bulbares de controle da FC os quais, determinavam redução da taquicardia do exercício nos indivíduos treinados; nenhuma alteração significativa de PA ou FC após bloqueio dos receptores de OT foi observada em ratos sedentários submetidos ao exercício dinâmico (BRAGA et al., 2000). Por outro lado, tanto nos grupos treinados quanto sedentários, a administração exógena de OT no NTS determinou redução significativa e similar da taquicardia do exercício, sugerindo que o treinamento não alterava receptores, mas apenas a disponibilidade do neurotransmissor, significativamente aumentada após treinamento (BRAGA et al., 2000).

Um possível mecanismo molecular para esse efeito foi demonstrado por Peters e colaboradores (2008). Em registros de correntes pós sinápticas excitatórias em neurônios de segunda ordem do NTS durante administração local de OT, demonstraram haver um aumento da sinalização carregada pelos barorreceptores, uma vez que a OT aumentava a probabilidade de liberação glutamatérgica (mecanismo pré sináptico) e facilitava o fechamento de canais de potássio (mecanismo pos sináptico) com consequente aumento da resposta bradicárdica. A ativação das projeções OTérgicas ao NTS/DMV (observada apenas nos grupos treinados) a qual explicava a redução da taquicardia do exercício em cargas submáximas. A redução da FC basal e da resposta taquicárdica ao exercício é um importante índice de treinabilidade. É importante lembrar que o treinamento é acompanhado de aumento do volume sistólico, o que permite a manutenção do DC com menor gasto energético (MICHELINI, 2007; MICHELINI & STERN 2009).

Em conjunto estas observações demonstraram a eficácia do treinamento aeróbio em ativar as vias eferentes da alça suprabulbar de modulação ajustando o controle bulbar da função cardíaca e aumentando sua eficiência em indivíduos treinados, mas não indicava mecanismos que desencadeavam estas alterações. Buscando identificar esse(s) mecanismos(s), trabalhos do laboratório, em colaboração com o Dr. Javier E. Stern nos EUA, observaram que o treinamento induz alterações plásticas em projeções

catecolaminérgicos ascendentes ao PVN, aumentando a imunorreatividade para Dopamina  $\beta$  hidroxilase (DBH) em diferentes subnúcleos do PVN e, principalmente, aumentando a densidade de botões sinápticos DBH-positivos em neurônios pré-autonômicos OTérgicos que se projetam ao NTS/DMV (Higa-Taniguchi et al, 2007). O aumento da inervação noradrenérgica ascendente ao PVN foi também, após treinamento, acompanhada de aumento da excitabilidade intrínseca e da razão “input/output” (patch clamp em fatias do hipotálamo) especificamente em neurônios pré-autonômicos VPérgicos e/ou OTérgicos, com redução da razão input/output nos neurônios magnocelulares do PVN (JACKSON et al, 2005). Estas observações indicaram que a ativação da projeções OTérgicas pelo treinamento é específica aos neurônios pré-autonômicos (parvocelulares) não modificam a liberação de OT plasmática pelos neurônios magnocelulares e que dependia da ativação mediada por projeções DBH positivas aos neurônios OT positivos, mas não indicavam a origem das projeções NORérgicas. É, portanto, um dos objetivos deste trabalho investigar qual(is) área(s) se projeta(m) aos neurônios pré-autonômicos OT positivos do PVN buscando identificar toda a circuitaria neuronal envolvida. Brum et al, (2000) demonstraram que o treinamento facilitava a sinalização aferente dos níveis de PA pelos barorreceptores arteriais por aumentar o ganho da atividade do nervo depressor aórtico durante variações transitórias da PA. Além disto, observação recente do nosso laboratório, mostrou que a desnervação sinoaórtica (DSA) abole os efeitos benéficos do treinamento sobre a FC bloqueando a bradicardia de repouso (CERONI et al, 2009). É, portanto, possível que a sinalização aferente mediada pelos barorreceptores arteriais seja um dos mecanismos desencadeantes da plasticidade de neurônios pré-autonômicos OTérgicos do PVN induzidos pelo exercício. Embora saibamos que os barorreceptores se projetam ao NTS no tronco cerebral (DAMPNEY, 1994) e que informações aferentes ascendem do tronco cerebral ao PVN por projeções catecolaminérgicas (KALIA; SWANSON & SAWCHENKO, 1981), desconhecemos de quais núcleos elas se originam. Também não se conhecem os efeitos da DSA sobre a plasticidade/funcionabilidade da alça supra bulbar de modulação. Portanto, na presente tese, buscamos identificar as alterações plásticas/funcionais induzidas pela remoção seletiva dos barorreceptores arteriais sobre expressão dos sistemas NORérgicos e OTérgicos centrais e sobre as respostas cardiovasculares. Além disto, todas as observações anteriores sobre efeitos do treinamento aeróbio de baixa intensidade e alterações plásticas foram obtidos apenas ao final do protocolo de treinamento. Nada se sabe sobre a sequência temporal com que estes efeitos se estabelecem. Faz-se necessária uma investigação mais

detalhada destas alterações no decorrer de todo o protocolo experimental para a caracterização do perfil temporal das alterações plásticas do sistema OTérgico central induzidos pelo treinamento.

### *1.2 Vasopressina e implicações com hipertensão*

Sabe-se que o PVN é núcleo altamente heterogenio. Além de neurônios OTérgicos, há neurônios positivos para somatostatina, met- e leu-encefalina, hormônio liberador de corticotrofina e vasopressina (VP) (SWANSON & SAWCHENKO, 1982). A VP possui diferentes efeitos periféricos e centrais. Nos rins, aumenta a permeabilidade das células dos túbulos renais à água (VP é também inicialmente como hormônio anti diurético), através de seus receptores V2 (NIELSEN et al., 2002); nos vasos através dos receptores V1, promove vasoconstrição arteriolar e, em casos de hipotensão severa, como por exemplo na hemorragia, os níveis de VP podem elevar-se para valores mais altos, contribuindo expressivamente com vasoconstrição generalizada e aumento da pressão arterial (OHLSTEIN & BERKOWITZ, 1986). Centralmente a VP atua como neurotransmissor, seus receptores são encontrados em várias estruturas do sistema nervoso central, estando a VP relacionada ao comportamento social, a agressividade (ALBERS, 2015), a aspectos emocionais, ao aprendizado e memória, ansiedade, depressão (IOVINO et al., 2018), além da regulação do ritmo circadiano (KALSBECK et al., 2010), controle da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ZELENA et al., 2015). A VP participa também do controle autonômico de respostas fisiológicas como o exercício (MICHELINI & MORRIS, 1999) e patológicas como a hipertensão (MARTINS et al., 2005) e a insuficiência cardíaca (POTAPENKO et al., 2012).

Diversos estudos demonstraram haver projeções VPérgicas do PVN a áreas de controle autonômico do bulbo, como BVLr (BIANCARDI et al, 2010; GRIFFITHS et al, 2017) e NTS, área me que demonstraram seus efeitos durante a prática do exercício (DUFLOTH et al, 1997; MICHELINI & MORRIS, 1999; MICHELINI, 2007). A ativação de projeções VPérgicas ao NTS (que ocorre tanto nos grupos sedentários quanto nos treinados) determina, durante o exercício agudo, deslocamento temporário do controle reflexo da FC para níveis mais elevados de pressão, permitindo a oclusão da bradicardia reflexa durante as elevações de pequena magnitude da PA (faixa de 10~15 mmHg) que ocorrem durante a atividade física. Esta oclusão, característica do exercício dinâmico,

permite o aparecimento da resposta taquicárdica essencial ao aumento do DC (MICHELINI, 2007; MICHELINI & STERN 2009). Pré-tratamento do NTS com antagonista V<sub>1</sub> não alterou a resposta pressora, mas determinou redução da taquicardia do exercício em ratos sedentários e treinados, com resposta de maior magnitude nos indivíduos treinados sugerindo que a ativação das projeções VPérgicas ao NTS/DMV facilita o aparecimento da taquicardia do exercício (DUFLOTH et al, 1997; MICHELINI et al, 2015). De fato observou-se durante exercício aumento do conteúdo endógeno de VP especificamente na região dorsal do bulbo que abrange o NTS e o DMV, indicando que a ativação das projeções VPérgicas a reduz a inibição simpática durante elevações da PA induzidas pelos exercício contribuindo, ao deslocar a faixa de funcionamento do reflexo barorreceptor, para a oclusão da bradicardia reflexa (DUFLOTH et al, 1997; MICHELINI, 2007). Nesta linha de raciocínio, Bailey et al (2006) demonstraram que a administração de VP no NTS reduz a ativação de neurônios de 2<sup>a</sup>. ordem pelos barorreceptores, determinando menor resposta bradicardia reflexa. Observou-se também que embora não houvesse alteração da densidade de receptores V<sub>1</sub> no NTS, o treinamento era eficaz em aumentar a sensibilidade destes receptores ao agonista endógeno (SOUZA et al, 2001).

Interessante foi a observação de que embora ativadas durante exercício agudo, a densidade de neurônios VP positivos não era modificada pelo treinamento aeróbio (Santos, 2013) mas aumentada na hipertensão (BIANCARDI et al, 2010; CRUZ & MICHELINI, dados não publicados), sugerindo que os neurônios pré-autonômicos VPérgicos do PVN teriam funções distintas daquelas desempenhadas pelos neurônios OTérgicos no controle da circulação. De fato, estudos anteriores já haviam demonstrado elevados níveis plasmáticos de VP e aumento de sua expressão no PVN de ratos hipertensos (MORRIS et al, 1981) sugerindo que, além da vasoconstrição periférica, VP agiria como um neurotransmissor nas projeções PVN-BVLr e PVN-neurônios espinhais, modulando a atividade simpática aos rins, medula adrenal e coração (COOTE, 2004). Demonstrou-se também que a estimulação do PVN aumentava a atividade simpática renal e a PA, efeitos estes que eram bloqueados pela administração intratecal do antagonista de VP (MALPAS & COOTE, 1994).

Observamos também que a hipertensão, além da facilitação do sistema VPérgico central, aumentava a expressão de receptores V<sub>1</sub> na região dorsal do bulbo, conforme evidenciado pelas técnicas de RT-PCR (sigla em inglês de *Reverse transcription polymerase chain reaction*, Transcrição Reversa- reação em cadeia da polimerase) e hibridização *in situ* (MARTINS et al, 2005; FELIX & MICHELINI, 2007). Estas alterações poderiam

condicionar os déficits da regulação reflexa da PA que caracterizam a hipertensão (MOREIRA et al, 1992; SANTOS et al, 1998; BEZERRA et al, 2001). Realmente a eficiência do reflexo barorreceptor encontra-se bastante comprometida na hipertensão arterial crônica (KRIEGER et al, 1982): durante elevações mantidas da PA, os barorreceptores deslocam sua faixa de funcionamento para os níveis da hipertensão, adaptando-se ao novo nível pressórico e possibilitando a manutenção da função barorreflexa (KRIEGER et al, 1982). No entanto a adaptação à hipertensão é acompanhada de redução na sensibilidade dos aferentes aórticos e carotídeos em sinalizar as alterações pressóricas (KRIEGER et al, 1982), prejuízo da integração bulbar (MICHELINI & BONAGAMBA, 1989), alteração do balanço simpato-vagal ao coração, com predomínio do tônus simpático (BEZERRA et al, 2001). Embora as alterações induzidas pela hipertensão na alça primária do controle barorreflexo sejam relativamente bem conhecidas, pouco se sabe sobre os efeitos da hipertensão na alça supra-bulbar de integração e em especial sobre os neurônios pré-autonômicos VP positivos. Uma observação recente de nosso laboratório (CERONI et al, 2009) tem indicado que o treinamento aeróbio de baixa intensidade é eficaz em minimizar o déficit do controle reflexo da FC em ratos hipertensos espontâneos (SHR) porém não sabemos quais mecanismos centrais que condicionam este efeito.

Trabalho em andamento no laboratório tem mostrado que a desnervação sinoaórtica também reduz a densidade de neurônios VPérgicos no PVN de SHR (Michelini, *comunicação pessoal*), mas desconhecemos as vias neurais pelas quais os barorreceptores e quimiorreceptores mantem a tonicidade dos neurônios VP positivo nos hipertensos. Estaria a sinalização NORérgica ascendente ao PVN envolvida ou não alteração da densidade dos neurônios VP positivos na hipertensão e após desnervação sinoaórtica? Também não sabemos se os SHR já nascem com maior número de neurônios VPérgicos, ou se sua expressão aumentaria durante o estabelecimento da hipertensão. Pretendemos, portanto, neste trabalho identificar os efeitos sequenciais do estabelecimento da hipertensão e da desnervação sinoaórtica sobre a densidade de neurônios VPérgicos no PVN, bem como a participação da informação aferente (plasticidade dos terminais DBH-positivos que se projetam a estes neurônios) nestas respostas.

Foi, portanto, nossa hipótese de trabalho que o treinamento aeróbio e a hipertensão arterial, via projeções NORérgicas ascendentes do bulbo ao hipotálamo, determinariam alterações plásticas específicas a diferentes grupos de neurônios pré-autonômicos do PVN – os OTérgicos no caso do treinamento e os VPérgicos no caso da hipertensão. Foi também

nossa hipótese de trabalho que o estímulo desencadeante dessas adaptações cardiovasculares ao treinamento e a hipertensão seja iniciado pela maior ou menor atividade dos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais.

## **2 OBJETIVOS**

Essa tese de doutorado envolveu na realidade 2 subprojetos distintos em que buscamos estudar o funcionamento da alça suprabulbar de modulação do controle cardiovascular no treinamento e na hipertensão, seja em ratos intactos, seja naqueles submetidos à remoção dos barorreceptores arteriais. São eles: 1) Estudo dos efeitos sequenciais do treinamento sobre neurônios ocitocinérgicos do PVN e sua sinalização noradrenérgica, e, 2) Estudo dos efeitos sequenciais da instalação da hipertensão sobre neurônios vasopressinérgicos do PVN e sua sinalização noradrenérgica.

Foram nossos objetivos específicos:

1. utilizando-se ratos normotensos e dupla marcação com DBH e OT, identificou-se os efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a expressão de neurônios OTérgicos em áreas pré-autonômicas do PVN e sobre a plasticidade de terminações NORérgicas que se projetam a estes neurônios (microscopia confocal),
2. avaliou-se em ratos treinados e seus controles sedentários os efeitos da desnervação sinoaórtica sobre a expressão de neurônios OTérgicos do PVN e sobre a plasticidade de terminações NORérgicas que se projetam a estes neurônios,
3. avaliamos os efeitos da lesão específica dos neurônios NORérgicos que se projetam ao PVN em animais submetidos ao treinamento ou sedentarismo por 8 semanas,
4. utilizando-se SHR na fase pré-hipertensiva e a dupla marcação com DBH e VP, identificamos os efeitos temporais da instalação da hipertensão sobre a expressão de neurônios VPérgicos em áreas pré-autonômicas do PVN e sobre a plasticidade de terminações NORérgicas que se projetam a estas subáreas,
5. avaliamos em ratos SHR e em controles Wistar pareados por idade os efeitos da desnervação sinoaórtica sobre a expressão de neurônios VPérgicos do PVN e sobre a plasticidade de terminações NORérgicas que se projetam a estes neurônios,
6. correlacionamos a plasticidade de alça suprabulbar de modulação às adaptações funcionais do sistema cardiovascular induzidas pelo treinamento e pela hipertensão na presença e ausência da desnervação sinoaórtica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Animais experimentais*

De acordo com os objetivos propostos, realizamos dois protocolos diferentes, um para se avaliar os efeitos temporais do treinamento a plasticidade de neurônios OTérgicos e a participação da inervação NORérgica a estes neurônios neste processo e atividade dos barorreceptores (Protocolo I) e outro, relativo aos efeitos da instalação da hipertensão sobre plasticidade de neurônios VPérgicos e a participação da inervação NORérgica a estes neurônios (Protocolo II). Em ambos os protocolos foram avaliados os efeitos da remoção das aferências periféricas sobre a plasticidade e funcionamento da alça suprabulbar de modulação.

Os ratos (descritos nos pontos 5.1 e 5.2) foram provenientes do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo–SP e do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia – CEDEME da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, e todos foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica durante todo o período de experimentação. Foram alocados em gaiolas coletivas (3-4 ratos/caixa), à temperatura ambiente adequada (entre 22-24° C), umidade relativa constante (50-55%), renovação do ar ambiente (15-20 trocas/h) e controle automático de iluminação (foto-período de 12:12 h, com luz das 7 às 19 hs). A ração foi fornecida *ad libitum*, sendo livre o acesso dos animais à água. O peso corporal (balança Filizzola) foi aferido semanalmente. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Bioética do ICB (registrado sob nº141 na folha 110 do livro 02 para uso de animais em experimentação).

#### 3.2 *Razões pela mudança de animais*

No projeto inicial proposto foi descrito, no objetivo 5 trabalhar com animais SHR e animais pareados com a idade WKY (Wistar Kyoto), porém foi necessário mudar a linhagem controle, pois não foi possível desnervar os animais WKY, portanto optamos pelos animais Wistar. Além da alteração da linhagem, os animais eram fornecidos pelo Biotério de Criação do ICB da Universidade de São Paulo, porém, a partir de agosto de 2015 esse biotério e suas Matrizes de ratos foram extintos, e iniciou-se atividades do Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP, produzindo ratos de padrão sanitário SPF (*Specific Pathogen Free*).

Para a desnervação dos nervos dos barorreceptores, nos guiamos por determinados pontos anatômicos, no entanto, esses animais do novo biotério não permitiu achar essas marcações anatômicas e não possibilitou a desnervação desses animais, sendo assim procuramos outras fontes de produção de animais, como o CEDEME.

### ***3.3 Protocolo I***

Para Protocolo I, foram utilizados um total de 65 ratos para análise sequencial do treinamento (objetivo 1) e 45 ratos para o protocolo SHAM & DSA (objetivo 2), Wistar com ~12 semanas de idade no início dos protocolos, foram utilizados ratos nessa faixa etária pois é correspondente à idade de animais utilizado em estudos anteriores do laboratório envolvendo os efeitos do T (CAVALLERI et al, 2011). Adicionalmente, para os estudos do objetivo 3, foi realizado o protocolo de lesão de neurônios NORérgicos que se projetam ao PVN, utilizando saporina conjugado com DBH, para esse protocolo foram utilizados 25 animais Wistar, também com 12 semanas de vida.

#### *3.3.1 Avaliação da capacidade aeróbia máxima dos animais*

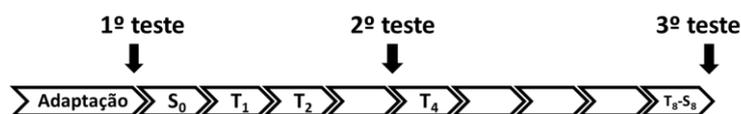
Inicialmente, a primeira semana foi destinada à adaptação ao espaço no Biotério de Manutenção e à esteira, e a segunda à familiarização com a corrida na esteira (5 sessões, durante 10 minutos, a 0,4- 0,7Km/h, com 0% de inclinação VERAS-SILVA et al, 1997). Os ratos foram selecionados segundo a habilidade em andar/correr na esteira ergométrica, sendo excluído dos protocolos os animais inaptos para andar/correr na esteira. A intensidade do esforço físico foi avaliada indiretamente (distância máxima percorrida) através do teste de esforço máximo durante exercício escalonado em esteira ergométrica (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos). O teste foi iniciado com a velocidade de 0,3 km/h, com incremento de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal. A carga máxima considerada foi aquela em que o animal não conseguiu mais correr espontaneamente.

#### *3.3.2 Protocolo de treinamento Físico ou Sedentarismo*

Os protocolos de treinamento ou sedentarismo foram similares entre todos os protocolos aplicados no presente projeto, o único diferencial foi o período em esses protocolos foram aplicados. Para os experimentos de Análise Temporal do Treinamento e Lesão de Neurônios Noradrenérgicos, o período de treinamento ou sedentarismo foi de 8 semanas, enquanto para os experimentos Sham e DSA o período foi de 12 semanas.

### 3.3.2.1 Análise Temporal do Treinamento

No início dos experimentos, os ratos Wistar passaram por um período de adaptação, como descrito no item 4.3.1. No final da segunda semana, aqueles considerados aptos foram então submetidos ao teste máximo de esforço em esteira. O teste de esforço máximo também foi realizado em 3 momentos durante os protocolos experimentais. O primeiro teste, na semana 0, foi utilizado para determinar a capacidade aeróbia máxima de cada animal, o que possibilitou classificar animais com igual desempenho aos grupos experimentais (S: sedentário e T: treinado) e determinou a intensidade do treinamento aeróbio. O segundo teste na 4ª semana do treinamento serviu para ajustar a intensidade do grupo T às novas capacidades máximas. No final do experimento (8ª semana), o teste foi realizado para possibilitar a comparação do desempenho entre os grupos e para avaliar a eficácia do treinamento, assim como demonstrado na Figura 1. O protocolo de T foi similar ao utilizado para o grupo SHAM & DSA. De forma complementar, com intuito de acostumar os animais ao manuseio experimental e permitir que os animais dos grupos sedentários pudessem ser avaliados nos testes máximos e no final do protocolo, os mesmos foram mantidos sedentários por período equivalente ao treinamento físico e colocados uma vez por semana na esteira (0,4-0,7 km/h) por 5-10 minutos.



**Figura 2** - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo e os 3 testes de esforço máximo realizados para os grupos **Análise Temporal do Treinamento**.

### 3.3.2.2 SHAM & DSA

Após o período de recuperação cirúrgica, os ratos dos grupos SHAM & DSA foram submetidos a novo teste de esforço máximo (semana zero) para quantificação do desempenho individual inicial, cujo resultado foi utilizado para alocar-se ratos com desempenho similar aos subgrupos sedentário (S) e treinado (T): DSA -S (n=9), DSA -T (n=12) e SHAM-S (n=12), SHAM-T (n=12). Estes resultados foram também utilizados para cálculo da intensidade de T. Segundo protocolo padronizado em nosso laboratório (DUFLOTH *et al.*, 1997; BRAGA *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2000), T aeróbio de baixa a moderada intensidade (T=50-60% da velocidade atingida no teste de esforço) foi realizado

durante 5 dias/semana, 1h/dia, entendendo-se por 3 meses. A intensidade do exercício foi aumentada gradativamente pela combinação da velocidade e duração, sem inclinação, até atingir velocidade estabelecida. Nas semanas 6 e 12 foram realizados novos testes de esforço máximo para reajuste de intensidade de treinamento nos grupos T e cálculo de sua eficácia ao final dos protocolos, respectivamente, assim como ilustrado na Figura 2. Os ratos alocados aos grupos S foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas 1 vez/semana colocados na esteira (5-10 min. com velocidade de 0,3-0,6 Km/h) para que se habituassem à manipulação experimental e aprendesse a realizar os testes máximos. Ambos os grupos (S e T) realizaram o teste de esforço máximo nos mesmos períodos supra-citados.

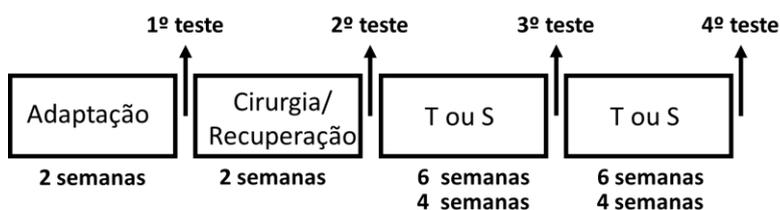
### 3.3.2.3 Lesão neurônios noradrenérgicos que se projetam ao PVN e Sham

Assim como os animais dos grupos *DSA* & Sham, após o primeiro teste de esforço máximo, foram realizados os experimentos em estereotaxia para lesão dos neurônios DBH positivos, com saporina-DBH. Animais anestesiados foram adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo Kopf 1760) e após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o *lambda* e o *bregma* foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais.

Nos animais alocados para os grupos sedentários e treinados foram realizados 2 microinjeções bilaterais de 100nl, na concentração de 0,21 ng/nl (SILVA, TAKAKURA E MOREIRA, 2016) da toxina saporina conjugada anti-dopamina beta hidroxilase (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA), ou salina, como grupo controle. Foram realizadas utilizando uma seringa Hamilton (5ul), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora com o diâmetro interno de 0,3mm. As coordenadas para as injeções na região do PVN seguiram os seguintes parâmetros: antero-posterior = -1,6 e - 2,0 mm em relação ao *bregma*; lateral =  $\pm$  0,4 mm em relação ao seio venoso e dorso-ventral = - 7,6 mm ventral à dura mater.

Após a cirurgia encefálica, os ratos receberam dose subcutâneo de analgésico (cetoprofeno 3 mg/kg, subcutâneo) e antibiótico (Pentabiótico Veterinário 18.000 UI/kg, subcutâneo). Esses animais repousaram em caixas individuais por 24 horas, e foram reagrupados em caixas de 3-4 animais por caixa. Permaneceram em recuperação por 2 semanas, e foram submetidos a um segundo teste de esforço para determinar a velocidade do treino. Os animais dos grupos treinados foram submetidos ao protocolo de treinamento de 8 semanas, 1 hora/dia, 5 dias/semana, enquanto os animais sedentários foram para esteira uma

vez por semana por apenas 10 minutos. Ao final dos protocolos de treinamento e sedentarismo, os animais foram canulados, registrados e eutanasiados para coleta do tecido encefálico para imunistoquímica. A confirmação da microinjeção de Saporina-DBH no PVN foi realizada através da quantificação da marcação de DBH no PVN.



**Figura 3** - Esquema do protocolo de treinamento ou sedentarismo incluindo o período de adaptação, cirurgia e recuperação e os 4 testes de esforço máximo realizados para os protocolos Desnervação sino aórtica e Lesão dos neurônios noradrenérgicos.

### 3.4 Protocolo II

Para as análises experimentais do Protocolo II foram utilizados cerca de 40 ratos Wistar, 60 ratos WKY e 100 ratos espontaneamente hipertensos (SHR - *spontaneously hypertensive rats*), com 4 semanas no início dos protocolos. Esta faixa etária foi necessária para avaliarmos as alterações no conteúdo proteico de VP desde a fase pré-hipertensiva até a fase adulta com a hipertensão arterial já instalada, que está por volta de 12 semanas de vida. Ratos do protocolo II não foram submetidos ao treinamento. Assim como o protocolo I, houve duas abordagens distintas: análise temporal nas semanas 0, 1, 2, 4 e 8 dos protocolos, ou seja, quando os ratos estavam com 4, 5, 6, 8 e 12 semanas de idade, e, análise dos efeitos da desnervação sino-aórtica ao final dos protocolos. A remoção das aferências periféricas foi realizada em animais de 39 a 42 dias de vida, e seus efeitos foram avaliados quando estavam com 13 semanas de vida.

#### 3.4.1 Efeitos temporais da instalação da hipertensão

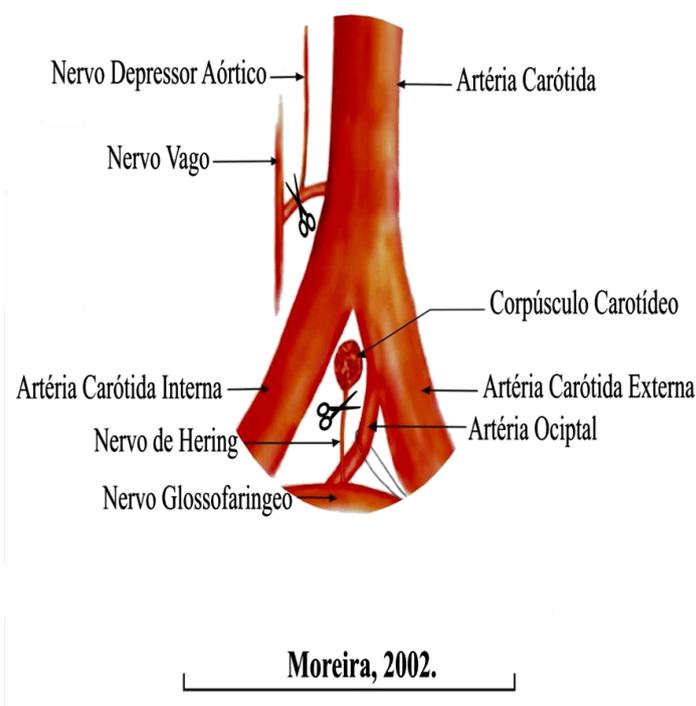
No início dos experimentos, os ratos WKY e SHR foram alocados no biotério, assim como descrito no item 4.1, foram mantidos sedentários por, no máximo, 8 semanas. A cada período selecionado (semana 0, 1, 2, 4 e 8 experimental) alguns animais foram selecionados, de maneira aleatória, para eutanasia e coleta de tecidos centrais e periféricos. Esse desenho experimental resultou em 10 grupos experimentais: WKY S<sub>0</sub>, WKY S<sub>1</sub>, WKY S<sub>2</sub>, WKY S<sub>4</sub>, WKY S<sub>8</sub>, SHR S<sub>0</sub>, SHR S<sub>1</sub>, SHR S<sub>2</sub>, SHR S<sub>4</sub> e SHR S<sub>8</sub>.

### 3.4.2 Efeitos da desnervação sino-aórtica em animais pré-hipertensos e normotensos

Os procedimentos cirúrgicos foram os mesmos que aplicados ao protocolo I, como descrito no ponto 4.5. Foi realizada as cirurgias em animais de 39-42 dias de idade, que foram mantidos no biotério até completarem 12-13 semanas de idade. Assim obtivemos 4 grupos experimentais desse protocolo II da desnervação: Wistar-SHAM; Wistar- DSA; SHR-SHAM; e SHR-DSA.

### 3.5 Desnervação sino-aórtica (DSA) ou cirurgia fictícia (SHAM)

Após o primeiro teste de esforço máximo, os ratos alocados a este grupo experimental foram submetidos à cirurgia de desnervação sinoaórtica (DSA) ou à cirurgia fictícia (SHAM). A remoção dos barorreceptores arteriais foi realizada de acordo com a técnica descrita por Moreira e Krieger (CERONI et al., 2009). Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica contendo 100 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Ketalar, Parke-Davis) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xilasina (Rompum, Bayer, *i.p.* Realizou-se uma incisão médio-cervical anterior para separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vaso-nervoso (carótida, vago e tronco simpático, vide Figura 4). Foram identificadas e seccionadas as fibras barorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado. O outro contingente de fibras barorreceptoras que podem situar-se junto ao nervo laríngeo inferior foi interrompido através da secção do nervo laríngeo superior. A seguir localizou-se bilateralmente a bifurcação das carótidas, que foi exposta e dissecada para destruição completa das fibras carotídeas, destruindo-se inclusive o corpúsculo carotídeo. Os ratos do grupo SHAM foram submetidos à operação fictícia, que consiste nas mesmas etapas cirúrgicas, exceto a secção/remoção das fibras baro- e quimiorreceptoras. Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (cetoprofeno 3 mg/kg, subcutâneo) e antibiótico (Pentabiótico Veterinário 18.000 UI/kg, subcutâneo) e foram mantidos em caixas individuais até a completa recuperação cirúrgica.



**Figura 4** - Ilustração da remoção dos baro- e quimiorreceptores.

### **3.6 Comprovação da desnervação sino-aórtica**

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

### **3.7 Canulação arterial e venosa e registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais**

Nos diferentes tempos experimentais todos os ratos foram anestesiados com a combinação de 100 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina, *i.p.* A fossa ilíaca foi dissecada para isolamento e canulação da artéria e veia femorais (cânulas intra-arteriais confeccionadas com Tygon, preenchidas com salina, mantidas ocluídas por pino de aço inoxidável). Após a introdução dos cateteres e a fixação dos mesmos na artéria e veia, a parte externa de ambas as cânulas foi exteriorizada no dorso

dos animais, onde foram fixadas com fios de algodão. Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (3mg/kg de Cetoprofeno subcutâneo) e foram mantidos em caixas individuais para recuperação pós-cirúrgica. Os registros basais de PA e FC (cânula arterial acoplada ao sistema de registro) foram obtidos 24 horas subseqüentes à canulação, com os animais acordados e com livre movimentação. A cânula arterial exteriorizada foi devidamente conectada à um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs., Lakewood, CO, USA), o qual estará acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) que, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália). A frequência de aquisição utilizada para as medidas hemodinâmica foi de 2000 Hertz. Foi aguardado um período suficiente (~20-30 min) para redução da atividade exploratória do animal e estabilização dos parâmetros cardiovasculares. PA e FC foram registradas continua e simultaneamente por um período de 40-50 min.

### ***3.8 Análise espectral de parâmetros cardiovasculares***

Resumidamente, as análises, abrangendo tanto o domínio do tempo quanto o da frequência, foram avaliadas em condição de repouso para cada animal, utilizando-se um período de 5 min de registro contínuo, selecionado após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. A densidade da análise espectral foi obtida através da transformação rápida de Fourier pelo método de Welch e janelas de Hanning com sobreposição de 50%. Os componentes da análise espectral para os componentes de muito baixa frequência (MBF, <0,20 Hz), *baixa* (BF, 0,20-0,75 Hz) e *alta frequência* (AF, >0,75 Hz) foram obtidos pelas médias da integração das densidades dos espectros dentro da largura das bandas de frequência, utilizando-se uma rotina customizada (MATLAB R2012a, Mathworks, Natick, MA, USA)

### ***3.9 Obtenção do tecido cerebral para análise da imuno-histoquímica***

Após os registros funcionais, aproximadamente 3-5 animais/grupo foram profundamente e anestesiados. Imediatamente após a parada respiratória foi realizada a perfusão (fluxo constante de 40 ml/min) do cérebro, via ventrículo esquerdo, com 300ml de solução Dubecco's Modified Eagle's Medium (Sigma) previamente resfriada, seguida de perfusão com fixador (Paraformaldeído 4% - PFA em 0,1 M de tampão fosfato  $\pm$  *phosphate buffer*, PB, Sigma). Após a perfusão o animal foi decapitado para a remoção do encéfalo. O

encéfalo foi pós-fixado em PFA em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 48 horas e depois crioprotelado em solução de sacarose 20% e 30% em PB em temperatura ambiente por 24 horas cada. Os encéfalos foram armazenados em geladeira (~4 °C) até a realização dos experimentos de imunistoquímica. Os encéfalos foram seccionados em criostato (cortes coronais de 30 µm, Leica, CM 3050, Germany) abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse: PVN, NTS/DMV, BVLc e BVLr (PAXINOS & WATSON, 2009).

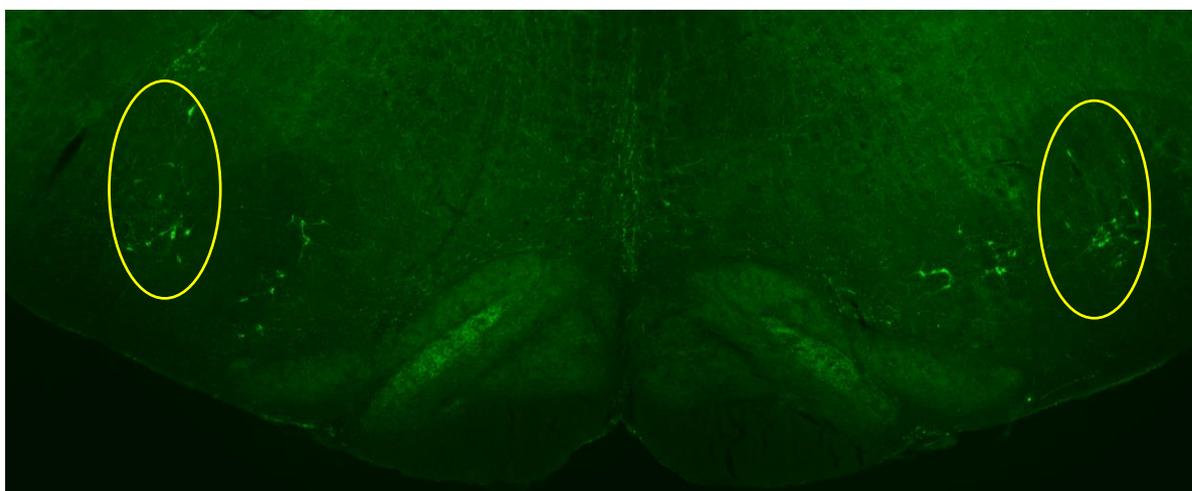
Como demonstrado na Figura 6, foi fotografado e quantificado o PVN medial (3-4 slices) e posterior (2 slices) 1,80 a 2,04 mm caudal ao Bregma; o NTS/A2 na porção do caudal (3-4 slices), o qual foi considerado a partir da separação do Núcleo grácil; e intermediário (3-4 slices) fotografado e quantificado a região que possuía Área Postrema até abertura do 4º ventrículo (-14,40 ao -13,68 em relação ao Bregma); o BVLc /A1 (6-8 slices) quantificado nos slices contendo a área postrema e região mais caudal (-14,40 ao -13,68 do Bregma); e a área do BVLr/C1 (3 slices) foi fotografada nos cortes caudal ao Núcleo Facial e por haver duas populações de neurônios catecolaminérgico, foi quantificado os neurônios da porção mais lateral, como demonstrado na Figura 5 (-12,24 ao -12,48). Os cortes coronais foram coletados sequencialmente em tampão fosfato (0,1 M) em placas divididos em 6 poços para o bulbo e 3 poços para o PVN (devido a sua menor extensão), sendo assim os cortes analisados possuíam 150 µm de distância entre um corte e outro para as áreas do bulbo e 60 µm para os cortes do PVN, todos os cortes foram armazenados em uma solução anti-congelante até a realização da reação de imunistoquímica.

No processo de incubação de anticorpos da imunistoquímica, inicialmente as secções foram lavadas com uma solução tampão, contendo 0,3% de Triton, sendo a seguir incubadas em solução de soro normal de burro 10%. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários para OT (cobaia anti ocitocina - Millipore, 1:200.000) e DBH (camundongo anti DBH n-terminal - 1:3000), e VP (cobaia anti-Arg 8-vasopressina, 1:25.000) e DBH durante 24 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com tampão fosfato os cortes foram incubados com anticorpo secundário Alexa-594 anti-OT ou VP e Alexa 488 anti-DBH (ambos 1:500 - Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) durante 5 horas à temperatura ambiente. Após lavagens com tampão fosfato os cortes foram então montados em lâminas previamente gelatinizadas, as quais foram examinadas em microscópio de fluorescência (Axioimager A1, Zeiss, Muenchen, Germany) e a quantificação da expressão de VP, OT e DBH foi realizada pelo software ImageJ (NIH).

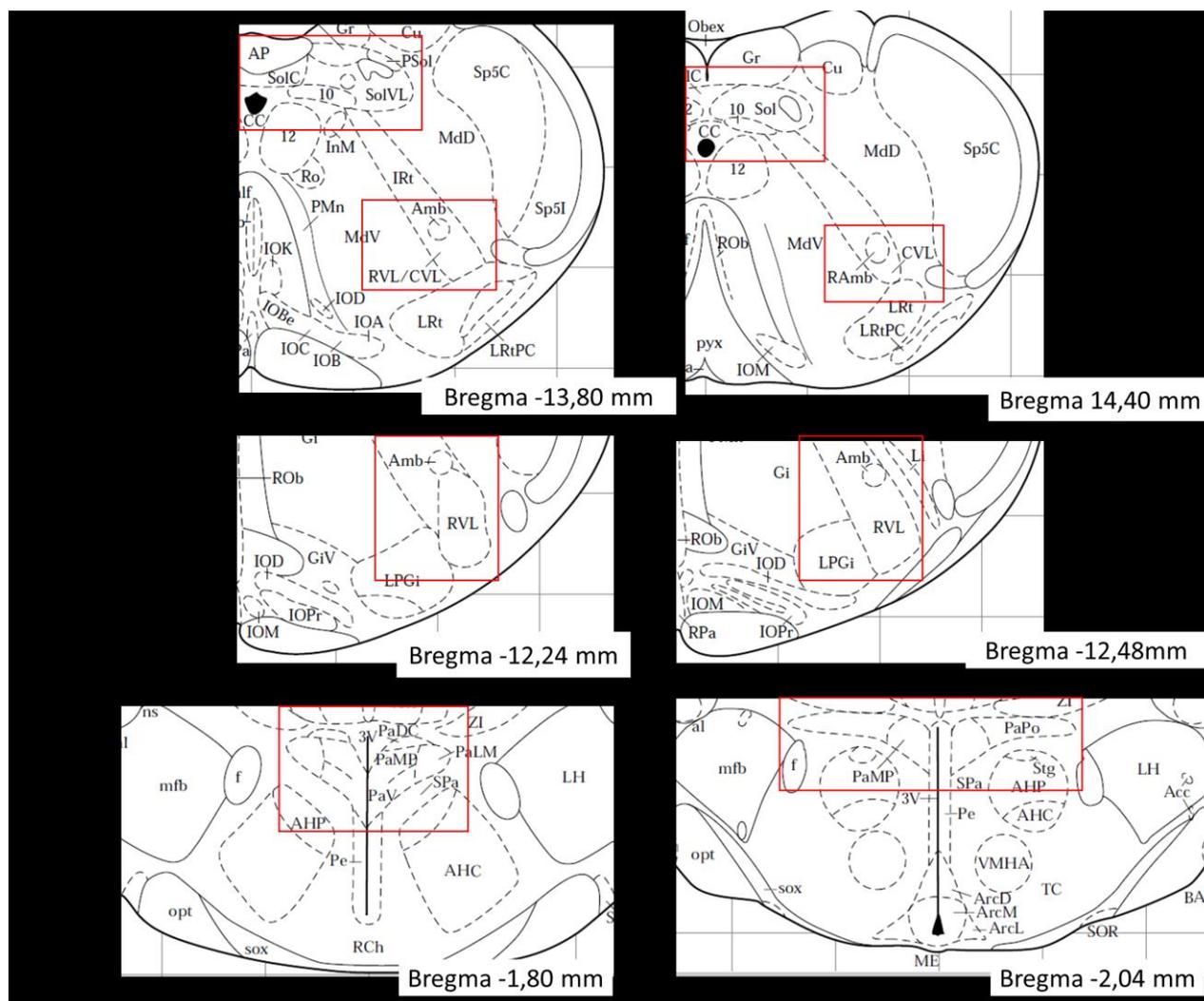
Após a análise das lâminas por microscopia de fluorescência, alguns cortes foram selecionados para análise por microscopia confocal.

Após a montagem das lâminas, prior à aquisição das imagens, o tempo de exposição foi padronizado para que os mesmos parâmetros fossem utilizados para todas as lâminas sem que nenhum grupo ou rato tivesse o tempo de exposição extrapolado, sendo assim todas as imagens do mesmo filtro e de um mesmo protocolo tiveram os mesmos tempos de exposição, ganho e intensidade.

Seguida da aquisição das imagens, essas foram analisadas no software ImageJ. Inicialmente, desenhou-se áreas de interesse para quantificação dos subnúcleos e para *background*, todas as imagens 8-bits tiveram o *background* e a média da intensidade quantificado, os valores de intensidade das imagens foram adquiridos com a subtração dos valores de média do *background* dos valores das áreas de interesse. Para quantificação de fração de área, as imagens foram transformadas em escalas de cinza e os valores de *background* foram multiplicados por valores constantes, 1,5 para os corpos celulares de OT; 2,0 para os corpos celulares de VP e DBH; e 3,0 para os terminais de DBH, VP e OT, constantes que foram padronizados previamente. As imagens analisadas estavam em posição rostro-caudal semelhante.



**Figura 5:** Fotomicrografia da região do BVLr contendo neurônios catecolaminérgicos, foram quantificados os neurônios mais laterais (círculo amarelo)



**Figura 6** - Quadro esquemático das áreas analisadas incluindo núcleo do trato solitário (NTS), dorso motor do vago (DMV), bulbo ventro-lateral caudal (BVLc), bulbo ventro-lateral rostral (BVLr) e núcleo do Paraventricular (PVN). Fonte: Paxinos & Watson (2009)

### 3.10 Obtenção de imagens por confocal e quantificação.

Todos os animais analisados por microscopia de fluorescência de ambos os desenhos experimentais do Protocolo I (Análise Temporal do Treinamento e Sham& DSA), foram fotografados por microscopia Confocal e, posteriormente, quantificado para análise de botões sinápticos noradrenérgicos em neurônios OTérgicos. Todas as imagens foram adquiridas em Microscópio Confocal Zeiss LSM 780-NLO (Zeiss, Alemanha) disponível no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP), operado pelo

responsável do equipamento. As imagens, foram excitadas pelos filtros 488 (Argon) e 543 (HeNe), escaneadas no eixo z em fatias de 0,5 um para futura reconstrução e análise em 3D. Resumidamente, de cada animal, de ambos os experimentos (Decurso temporal e SHAM & DSA) foram fotografados 3 campos do subnúcleo ventromedial do PVN medial e 3 campos do PVN posterior, ambas as áreas foram selecionadas por mostrarem ter maior respostas experimentais induzidas pelo treinamento. As análises foram realizadas pelo software *Imaris* (Bitplane, Zurique-Suíça). Esse software permite a reconstrução das imagens em 3D e a análise de contato sináptico entre os dois marcadores.

### ***3.11 Apresentação dos dados e análise estatística***

Os resultados foram submetidos ao teste Levene para homogeneidade das variâncias e foram apresentados como médias  $\pm$  EPM. Para análise dos dados de teste de esforço do protocolo I foi realizada análise ANOVA com medidas repetidas e *pos hoc* em Fisher. Dados funcionais e da expressão proteica dos sistemas aminérgicos e peptidérgicos encefálicos do protocolo Decurso Temporal foi realizado a análise de variância ANOVA de uma via, comparando os efeitos temporal do treinamento (T0, T1, T2, T4 e T8) e ANOVA fatorial de duas vias da condição (T x S) nos diferentes tempos experimentais (0 e 8) com *pos hoc* em Fisher; dados funcionais e da expressão proteica para os protocolos SHAM & DSA e SHAM & DBHx foi realizado ANOVA fatorial analisando os efeitos da cirurgia (SHAM ou DSA /DBHx) e condição (T x S) *pos hoc* em Bonferroni. Para o protocolo da instalação da hipertensão a análise estatística foi semelhante ao do protocolo I. Realizamos análise de variância (ANOVA) fatorial para os efeitos das linhagens (WKY X SHR) e nos diferentes tempos (S0, S1, S2, S4 e S8), e também para o efeito da cirurgia (SHAM ou DSA) e linhagem (WISTAR X SHR) o teste *post-hoc* foi *Tucker*. Para todas estas análises foi utilizado o software STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc.) e o nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ .

## 7 CONCLUSÃO

Nossos resultados experimentais sugerem que:

- o treinamento aeróbio, via projeções NORégicas que conduzem ao hipotálamo as informações provenientes dos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos ao NTS, aumenta a densidade e ativa os neurônios OTérgicos do PVN ventromedial e posterior, os quais se projetam ao complexo solitário-vagal, aumentando o tônus vagal e modulando o balanço autonômico para o coração,

- a instalação da bradicardia de repouso observada nos ratos treinados depende da atividade conjunta da *alça primária* (que codificam ao sistema nervoso central as informações provenientes da periferia e as integram a nível bulbar) e da *alça secundária* de controle cardiovascular (de integração hipotalâmica e que modula continuamente a alça bulbar),

- em animais SHR o conteúdo de VP no subnúcleo magnocelular já está aumentado na fase pré-hipertensiva, e no ventromedial e posterior o aumento da síntese proteíca, o que ocorre na S1, parece preceder o aumento da pressão arterial, a qual mostrou-se aumentada apenas na S2;

- as aferências dos baro e quimiorreceptores parecerem serem fundamentais para o desenvolvimento da hipertensão, assim como para o aumento crescente da síntese proteíca de VP em todo o PVN.

## REFERÊNCIAS

ABDALA, A.P.; MCBRYDE, F.D.; MARINA, N.; HENDY, E.B.; ENGELMAN, Z.J.; FUDIM, M.; SOBOTKA, P.A.; GOURINE, A.V.; PATON, J.F. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **J Physiol.** V.17, p.4269-4277. 2012.

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

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

BAILEY, T.W.; JIN, Y.H.; DOYLE, M.W.; SMITH, S.M.; ANDRESEN, M.C. Vasopressin inhibits glutamate release via two distinct modes in the brainstem. **J.Neurosci.**, v.26, p. 6131-42, 2006.

BARTHELEMY, I.; MARTINEAU, D.; ONG, M.; MATSUNAMI, R.; LING, N.; BENATTI, L.; CAVALLARO, U.; SORIA, M.; LAPPI, D.A. The expression of saporin, a ribosome-inactivating protein from the plant *Saponaria officinalis*, in *Escherichia coli*. **J Biol Chem.** v. 268, p. 6541-6548, 1993.

BEZERRA S.M.M.S., SANTOS C. M., MOREIRA E.D., KRIEGER E.M AND MICHELLINI L.C. Chronic AT1 receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. *Hypertension*;38(part 2):569-575, 2001.

BIANCARDI, V.C.; CAMPOS. R.R.; STERN, J.E. Altered balance of gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic afferent inputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of renovascular hypertensive rats. **J Comp Neurol.** V.5, p. 567-585. 2010

BIENKOWSKI, M.S.; RINAMAN, L. Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin exposure. **Neuroscience**. v. 156, p. 1093–1102, 2008.

BOHUS, B.; DE WIED, D. The vasopressin deficient Brattleboro rats: a natural knockout model used in the search for CNS effects of vasopressin. **Prog Brain Res**. v. 119, p. 555-73, 1998.

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

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

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

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

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

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

COOTE, J. H. The hypothalamus and cardiovascular regulation. In: DUN, N. J.; MACHADO, B. H.; PILOWSKY, P. M. Neural mechanisms of cardiovascular regulation. London: Kluwer. 2004. P. 117-146.

COWLEY, A.W.JR.; MONOS, E.; GUYTON, A.C. Interaction of vasopressin and the baroreceptor reflex system in the regulation of arterial blood pressure in the dog. **Circ Res.** v. 4, p. 505-514, 1974.

CROFTON, J. T.; SHARE, L.; SHADE, R. E.; ALLEN, C.; TARNOWSKI, D. Vasopressin in the rat with spontaneous hypertension. **Am J Physiol.** v. 235, p. H361-H366, 1978.

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

CUMMINGS, S.; SEYBOLD, V. Relationship of alpha-1- and alpha-2-adrenergic-binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopressin neurons. **Neuroendocrinology.** v. 47, p.523–532, 1988.

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

DEL RIO, R.; ANDRADE, D.C.; LUCERO, C.; ARIAS, P.; ITURRIAGA, R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. **Hypertension.** V. 68(2), p. 436-445, 2016.

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

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

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. *Am. Physiol. Society.* V. 62, p. 347-504, 1982.

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

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

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

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

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

KRIEGER, E. M.; SALGADO, H. C.; MICHELINI, L. C. Resetting of the baroreceptors. In: *Cardiovascular Physiology, IV*. Edited by Guyton, A. C.; Hall, J. E. Baltimore: University Park Press. *International Review of Physiology*, v. 26, p. 119-145, 1982.

LAIS, L. T.; RIOS L. L.; BOUTELLE, S.; DIBONA, G. F.; BRODY, M. J. Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. **Blood Vessels**. v. 14, p. 277-284, 1977.

LEE, R. M. K. W.; BORKOWSKI, K. R.; LEENEN, F. H.; TSOPORIS, J.; COUGHLIN, M. Interaction between sympathetic nervous system and adrenal medulla in the control of cardiovascular changes in hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 7, pS114-S116, 1991.

LEE, S.K.; RYU, P.D.; LEE, S.Y. Differential distributions of neuropeptides in hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Neurosci Lett.** V. 27, P. 160-165, 2013.

LIPOSITS, Z.; SHERMAN, D.; PHELIX, C.; PAULL, W.K. A combined light and electron microscopic immunocytochemical method for the simultaneous localization of multiple tissue antigens. Tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. **Histochemistry.** v. 85, p.95–106, 1986

MACK, S.O.; KC, P.; WU, M.; COLEMAN, B.R.; TOLENTINO-SILVA, F.P.; HAXHIU, M.A. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. **J Appl Physiol** (1985). V. 92(2), p. 826-834, 2002.

MADDEN, C.J.; STOCKER, S.D.; SVED, A.F. Attenuation of homeostatic responses to hypotension and glucoprivation after destruction of catecholaminergic rostral ventrolateral medulla neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 291, p. R751–R759, 2006.

MALPAS, S.C.; COOTE, J.H. Role of vasopressin in sympathetic response to paraventricular nucleus stimulation in anaesthetized rats. **Am.J. Physiol.**, vol. 266, p-R228-236, 1994.

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

MASSON, G.S.; COSTA, T.S.; YSHII, L.; FERNANDES, D.C.; SOARES, P.P.; LAURINDO, F.R.; SCAVONE, C.; MICHELINI, L.C. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One.** V. 1;9(5), 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MORRIS, M.J.; DEVYNCK, M.A.; WOODCOCK, E.A.; JOHNSTON, C.I.; MEYER, P. Specific changes in hypothalamic alpha-adrenoceptors in young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v. 3, p. 516-520, 1981.

MORRIS, M. Neurohypophyseal response to dehydration in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**. V. 4(1), p. 161-6, 1982.

MOTAWEI, K.; PYNER, S.; RANSON, R. N.; KAMEL, M., COOTE, J. H. Terminal of paraventricular spinal neurones are closely associated with adrenal medullary sympathetic preganglionic neurones: immunohistochemical evidence for vasopressin as a possible neurotransmitter in this pathway. **Exp. Brain Res.**, v. 126, p. 68-76. 1999.

MUELLER, S.M.; ERTEL, P.J. Association Between Sympathetic Nerve Activity and Cerebrovascular Protection in Young Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke*. V. 14, p. 88-92, 1983.

NIEWIŃSKI, P.; JANCZAK, D.; RUCINSKI, A.; JAZWIEC, P.; SOBOTKA, P.A.; ENGELMAN, Z.J.; FUDIM, M.; TUBEK, S.; JANKOWSKA, E.A.; BANASIAK W.; HART, E.C.; PATON, J.F.; PONIKOWSKI, P. Carotid body removal for treatment of chronic systolic heart failure. *Int J Cardiol*. V. 168(3), p. 2506-9, 2013.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. v. 27, p. 282-93, 1963.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2.ed. New York: Academic Press, 1986.

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

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

PIJACKA, W.; MCBRYDE, F.D.; MARVAR, P.J.; LINCEVICIUS, G.S.; ABDALA, A.P.L.; WOODWARD, L.; LI, D.; PATERSON, D.J.; PATON, J.F.R. Carotid sinus denervation ameliorates renovascularhypertension in adult Wistar rats. *J Physiol*. V. 594.21, P.6255–6266, 2016.

POTES C.S.; TUREK, V.F.; COLE, R.L.; VU, C.; ROLAND, B.L.; ROTH, J.D.; RIEDIGER, T.; LUTZ, T.A. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin's hypophagic action. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 299, p. R623–R631, 2010.

RINAMAN, L. Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci*. v. 23, p. 10084–10092, 2003.

RIOUX, F., B. A. BERKOWITZ. Role of the thyroid gland in the development and maintenance of spontaneous hypertension in rats. **Circ. Res.** v. 40, p. 306–312, 1977.

RITTER, S.; BUGARITH, K.; DINH, T.T. Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. **J Comp Neurol.** v. 432, p. 197–216, 2001.

RITTER, S.; WATTS, A.G.; DINH, T.T.; SANCHEZ-WATTS, G.; PEDROW, C. Immunotoxin lesion of hypothalamically projecting norepinephrine and epinephrine neurons differentially affects circadian and stressor-stimulated corticosterone secretion. **Endocrinology.** v. 144, p. 1357–1367, 2003.

ROMANO, A.; POTES, C.S.; TEMPESTA, B.; CASSANO, T.; CUOMO, V.; LUTZ, T.; GAETANI, S. Hindbrain noradrenergic input to the hypothalamic PVN mediates the activation of oxytocinergic neurons induced by the satiety factor oleoylethanolamide. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** V. 305(10), p. 1266-73, 2013.

RUGGERI, A. Evolução temporal do controle autonômico e respostas cardiovasculares associadas em SHR jovens submetidos ao treinamento aeróbio. 119 p. 2016. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

SANGALETI, C.T.; CRESCENZI, A.; MICHELINI, L.C. Endogenous angiotensin and pressure modulate brain angiotensinogen and AT1A mRNA expression. **Hypertension.** v. 43, p. 317–323, 2004.

SANTOS, C.R. Expressão/funcionalidade de vias noradrenérgicas ascendentes ao hipotálamo: Efeitos da desnervação sino-aórtica e do treinamento aeróbio. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

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

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

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

SILVA Jr, S. D.; ZAMPIERI, T.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; ARAGÃO, D. S.; FERNANDES, F. B.; CASARINI, D. E.; MICHELINI, L. Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training. *Circ. J.*, v. 79, n. 6, p. 1372-1380, 2015

SILVA, T.M.; TAKAKURA, A.C.; MOREIRA, T.S. Acute hypoxia activates hypothalamic paraventricular nucleus-projecting catecholaminergic neurons in the C1 region. **Exp Neurol.** V. 285, p. 1-11, 2016.

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

STERN, J.E.; SONNER, P.M.; SON, S.J.; SILVA, F.C.; JACKSON, K.; MICHELINI L.C. Exercise training normalizes an increased neuronal excitability of NTS-projecting neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in hypertensive rats. **J Neurophysiol.** V. 107(10), p. 2912-21, 2012.

SUN, M.K.; GUYENET, P.G. GABA-mediated baroreceptor inhibition of reticulospinal neurons. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** V. 249, p. R672–R680, 1985.

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

SVED AF; GORDON FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. **News Physiol. Sci.**, v.9, p.243–6, 1994.

SCHORK, N. J.; OKELAINEN, P.; GRANT, J. E. J.; SCHORK, M. A.; WEDER, A. B. Relationship of growth and blood pressure in inbred rats. **Am. J. Physiol.** v. 266 p. R702–R708, 1994.

SHARE, L.; CROFTON, J.T. Contribution of vasopressin to hypertension. **Hypertension.** V.4, p. 85-92. 1982

SHEN, Y. T.; COWLEY, J. R. A. W.; VATNER. S.F. Relative roles of cardiac and arterial baroreceptors in vasopressin regulation during hemorrhage in conscious dogs. **Circ. Res.**, v. 68, p. 1422-1436. 1991.

THRASHER, T. N.; CHEN, H. G.; KEIL, L. C. Arterial baroreceptors control plasma vasopressin responses to graded hypotension in conscious dogs. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 278, p. R469-R475. 2000.

TOLEDO, C.; ANDRADE, D.C.; LUCERO, C.; SCHULTZ, H.D.; MARCUS, N.; RETAMAL, M.; MADRID, C.; DEL RIO, R. Contribution of peripheral and central chemoreceptors to sympatho-excitation in heart failure. **J Physiol.** v. 595(1), p. 43-51, 2017.

TSUJI, T.; SU, C.; LEE, T. J. F. Enhanced presynaptic  $\beta_2$ -adrenoceptor mediated facilitation of the pressor responses in the prehypertensive SHR. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 14, p. 737–746, 1989.

TUCKER, D. C.; JOHNSON, A. K. Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. **Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.** v. 246, p. R570–R577, 1984.

VAN TOL, H. H; VAN DEN BUUSE, M.; DE JONG, W.; BURBACH, J. P. Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension. **Brain Res.**, v. 464, p. 303-311. 1988.

VERAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K. C.; GAVA, N. S.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 273(6Pt2), p. H2627-H2631, 1997.

YANG, Z.; COOTE, J. H. The influence of vasopressin on tonic activity of cardiovascular neurones in the ventrolateral medulla of the hypertensive rat. **Auton. Neurosci.: Basic Clin.**, v. 104, p. 83-87. 2003.

## Apêndice I

### *Protocolo I ± Análise Temporal do Treinamento*

**Tabela 1** - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S).

	<b>Wistar-S (km/h)</b>	<b>Wistar-T (km/h)</b>
<b>Semana 0</b>	1.11±0.07 (n=21)	1.10±0.04 (n=44)
<b>Semana 4</b>	0,95±0,07 (n=11)	1,50±0,05*† (n=22)
<b>Semana 8</b>	0,85±0,12* (n=11)	1,70±0,12*† (n=11)
<b>Ganho (S<sub>8</sub> ± S<sub>0</sub>)</b>	-0,27±0,08#	+0,58±0,10#†

Valores são média±EPM, \* vs. Semana 0; † vs. Wistar-S, # diferente de 0, p<0,05.

**Tabela 2** - Valores basais e respostas de PAM e FC em ratos Wistar submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).

<b>Valores basais</b>	<b>T0 (n=3)</b>	<b>S0=T0 (n=3)</b>	<b>T1 (n=7)</b>	<b>T2 (n=9)</b>	<b>T4 (n=7)</b>	<b>T8 (n=9)</b>	<b>S8 (n=9)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	108±2	118±7	109±2	114±3	110±2	113±2	117±3
<b>FC (b/min)</b>	418±9	412±5	399±7	399±8	399±9	378±13*†	406±10

Valores são média±EPM, \* vs semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 3** - Alterações na variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) e respectivos componentes espectrais induzidos pelos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S)

Semanas	Var PAS (mmHg <sup>2</sup> )	BF-PAS (mmHg <sup>2</sup> )	Var IP (ms <sup>2</sup> )	AF-IP (ms <sup>2</sup> )	BF-IP (ms <sup>2</sup> )	$\alpha$ AF (ms <sup>2</sup> /mmHg <sup>2</sup> )
<b>S0</b> (n=3)	11.66±1.25	4.95±0.79	24.28±3.87	3.24±0.47	1.19±0.21	1.54±0.25
<b>T0</b> (n=3)	11.18±1.10	3.37±0.29	23.38±5.29	3.04±0.57	1.63±0.24	1.44±0.16
<b>T1</b> (n=7)	10.63±2.21	4.66±1.11	30.98±8.28	3.98±0.93	1.75±0.76	1.48±0.19
<b>T2</b> (n=9)	9.81±0.97	3.85±0.30	35.89±6.20	5.21±0.81	1.28±0.19	1.93±0.19
<b>T4</b> (n=7)	10.42±1.08	3.26±0.19	34.13±8.58	4.06±0.60	1.25±0.23	1.37±0.06
<b>T8</b> (n=9)	9.70±0.89	4.05±0.50	47.30±8.07	6.78±1.44*†	2.08±0.28	2.43±0.17*†
<b>S8</b> (n=9)	11.38±1.56	4.73±0.55	19.92±7.01	2.76±0.62	2.42±1.51	1.44±0.26

Valores são médias±EPM. BF, componente de baixa frequência; AF, componente de alta frequência.  $\alpha$ AF representa a sensibilidade barorreflexa espontânea calculada com o component de AF do IP e correspondente a componente PAS. Significancias são \* T8 vs. T0 e † T8 vs. S8.

**Tabela 4** – Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos da densidade de DBHir (% área) no NTS, BVLc e BVLr.

	NTS	BVLc	BVLr
<b>S0 (n=2)</b>	9,24±1,99	8,14±0,16	6,20±0,60
<b>T0 (n=2)</b>	9,05±0,67	8,70±0,54	5,59±0,52
<b>T1 (n=4)</b>	8,58±0,67	8,57±0,91	5,31±0,61
<b>T2 (n=4)</b>	11,49±0,65*	10,52±0,63*	4,74±0,34
<b>T4 (n=4)</b>	11,94±0,55*	10,00±1,73*	4,74±0,51
<b>T8 (n=4)</b>	6,71±0,44*†	10,533±0,59*†	6,45±0,54
<b>S8 (n=4)</b>	11,75±0,58*	5,85±0,44*	4,01±0,15

8-12 imagens/rato; 4 ratos /grupo\* vs Semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 5** - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos em fração de área de DBH no PVN medial e PVN posterior.

	<b>Magnocelular</b>	<b>Dorsal cap</b>	<b>Ventromedial</b>	<b>Posterior</b>
<b>S0 (n=2)</b>	25,07±4,09	32,68±8,38	9,97±1,27	12,96±1,28
<b>T0 (n=2)</b>	22,47±0,40	29,43±7,49	10,67±1,54	12,38±1,67
<b>T1 (n=4)</b>	25,60±1,89	31,17±1,73	10,58±1,09	12,38±2,07
<b>T2 (n=4)</b>	27,47±2,87*	36,62±3,70*	28,51±7,25	19,10±2,90
<b>T4 (n=4)</b>	27,65±6,52*	48,60±5,93*	33,22±2,64	21,79±1,83
<b>T8 (n=4)</b>	48,03±6,52*†	57,28±3,91*†	42,95±5,56	28,55±1,83
<b>S8 (n=4)</b>	24,98±2,42*	31,41±4,59*	11,59±0,37	11,01±1,57

8-12 imagens/rato; 4 ratos /grupo, \* vs Semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 6** - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos em fração de área de OT no PVN medial e PVN posterior.

	<b>Magnocelular</b>	<b>Dorsal cap</b>	<b>Ventromedial</b>	<b>Posterior</b>
<b>S0 (n=2)</b>	38,55±1,87	20,19±0,84	42,56±1,42	11,50±1,55
<b>T0 (n=2)</b>	40,61±4,14	16,17±0,96	34,05±2,66	10,49±1,30
<b>T1 (n=4)</b>	33,31±2,12	13,52±2,18	38,62±1,22	9,12±1,58
<b>T2 (n=4)</b>	33,83±4,49*	19,82±4,77*	49,46±11,00	15,79±2,10
<b>T4 (n=4)</b>	24,46±6,60*	20,90±3,04*	61,59±3,01	20,55±4,03
<b>T8 (n=4)</b>	25,48±4,31*†	18,09±3,04*†	61,59±2,86	18,69±1,32
<b>S8 (n=4)</b>	21,56±2,95*	13,19±1,12*	16,87±5,13	6,77±1,43

8-12 imagens/rato; 4 ratos /grupo\* vs Semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 7** - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre a área e volume de neurônios OTérgicos e de botões sinápticos NORérgicos no PVN medial e PVN posterior.

		<b>S0=T0</b>	<b>T2</b>	<b>T8</b>	<b>S8</b>
<b>PVN medial ventromedial</b>	Área neuronal ( $\mu\text{m}^2$ )	1615,08±84,63	1738,44±85,19	1623,38±58,04	1780,77±55,86
	Volume neuronal ( $\mu\text{m}^3$ )	785,38±66,84	873,41±60,60	721,21±67,72	726,02±64,97
	Botões/neurônio	16±3	22±2	20±4	13±3
<b>PVN posterior</b>	Área neuronal ( $\mu\text{m}^2$ )	1464,68±80,11	1500,70±109,17	1544,18±90,70	1523,19±219,64
	Volume neuronal ( $\mu\text{m}^3$ )	765,25±68,79	794,83±67,95	719,29±52,74	731,53±110,10
	Botões/neurônio	15±1	36±5*	20±1†	5±1*

10-20 neurônios/rato; 3 ratos /grupo, \* vs Semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 8** - Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre valores relativos em fração de área de OT no DMV, NTS, BVLc e BVLr

	<b>NTS</b>	<b>DMV</b>	<b>BVLc</b>	<b>BVLr</b>
<b>S0 (n=2)</b>	1,24±0,13	1,03±0,10	1,10±0,12	0,71±0,05
<b>T0 (n=2)</b>	1,29±0,01	1,21±0,10	1,00±0,12	0,79±0,01
<b>T1 (n=4)</b>	1,28±0,09	0,98±0,07	1,20±0,09	0,76±0,06
<b>T2 (n=4)</b>	1,74±0,09*	2,02±0,24*	1,71±0,12	1,08±0,06
<b>T4 (n=4)</b>	1,60±0,0,10*	1,56±0,09*	1,52±0,10	1,06±0,14
<b>T8 (n=4)</b>	1,84±0,20*†	2,03±0,15*†	1,51±0,17	1,16±0,27
<b>S8 (n=4)</b>	0,93±0,06*	0,75±0,05*	0,76±0,07	0,57±0,12

8-12 imagens/rato; 4 ratos /grupo; \* vs Semana 0, † vs S, P<0,05.

**Tabela 9** - Coeficientes de correlação e valores de p das equações de regressão correlacionando treinamento e alterações idade-dependente na atividade parassimpática (AF-IP) e FC basal com alterações plásticas com a circuitaria sulprabulbar.

Áreas encefálicas	Equações de regressão	Valores R	Valores P
<b>Bulbo</b>			
<i>NTS neurônios DBH+ x AF-IP</i>	$Y = 0,47x - 1,10$	0,596	0,002
<i>BVLc neurônios DBH+ x AF-IP</i>	$Y = 0,36x + 0,59$	0,480	0,015
<b>Hipotálamo</b>			
<b>PVN Posterior</b>			
<i>Botões DBH+/neurônios OT+ x AF-IP</i>	$Y = 0,13x + 2,44$	0,546	0,035
<i>neurônios OT+ x AF-IP</i>	$Y = 0,15x + 2,07$	0,497	0,007
<b>PVN Ventromedial</b>			
<i>Botões DBH+/neurônios OT+ x AF-IP</i>	$Y = 0,20x + 0,99$	0,545	0,020
<i>neurônios OT+ x AF-IP</i>	$Y = 0,06x + 1,73$	0,466	0,011
<b>Bulbo</b>			
<i>NTS fibras OT+ x AF-IP</i>	$Y = 3,73x - 1,51$	0,703	<0,001
<i>DMV fibras OT+ x AF-IP</i>	$Y = 2,57x + 0,30$	0,720	<0,001
<i>BVLr fibras OT+ x AF-IP</i>	$Y = 2,91x + 1,30$	0,509	0,011
<i>BVLc fibras OT+ x AF-IP</i>	$Y = 2,90x + 0,14$	0,532	0,007
<b>Bulbo</b>			
<i>NTS neurônios DBH+ x FC basal</i>	$Y = -3,42x + 432$	-0,463	0,023
<i>BVLc neurônios DBH+ x FC basal</i>	$Y = -3,53x + 426$	-0,492	0,015
<b>Hipotálamo</b>			
<b>PVN Posterior</b>			
<i>Botões DBH+/neurônios OT+ x FC basal</i>	$Y = -1,33x + 4,15$	-0,580	0,030
<i>neurônios OT+ x FC basal</i>	$Y = -1,48x + 4,18$	-0,483	0,011
<b>PVN Ventromedial</b>			
<i>Botões DBH+/neurônios OT+ x FC basal</i>	$Y = -1,70x + 4,21$	-0,534	0,027
<i>neurônios OT+ x FC basal</i>	$Y = -0,62x + 4,24$	-0,530	0,003
<b>Bulbo</b>			
<i>NTS fibras OT+ x FC basal</i>	$Y = -32,0x + 4,41$	-0,653	<0,001
<i>DMV fibras OT+ x FC basal</i>	$Y = -21,0x + 4,24$	-0,646	<0,001
<i>BVLr fibras OT+ x FC basal</i>	$Y = -22,8x + 4,17$	-0,447	0,029
<i>BVLc fibras OT+ x FC basal</i>	$Y = -22,1x + 4,24$	-0,434	0,034

BVLc, bulbo ventro-lateral caudal; NTS, núcleo do trato solitário; PVN, núcleo do paraventricular do hipotálamo; BVLr, bulbo ventro-lateral rostral. Essas análises envolvem todos os pontos analisados durante 8 semanas de protocolo. Correlações dos dados de expressão de DBH e OT foram feitos com 24-29 observações/área, 3-4 rats/group; correlações com botões DBH/neurônios OT+ são médias por ratos e corresponde a 14-17 observações /área, 3 ratos/grupo.

**Protocolo I ± Sham & DSA**

**Tabela 10** - Velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nos grupos SHAM e DSA nas semanas 0, 6, 12 e ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S) .

	<b>Wistar-S</b> <b>(n=14)</b>	<b>Wistar-T</b> <b>(n=16)</b>	<b>DSA-S</b> <b>(n=14)</b>	<b>DSA-T</b> <b>(n=17)</b>
<i>Semana 0</i>	1,07±0,06	1,07±0,06	0,97±0,05	0,97±0,05
<i>Semana 6</i>	0,81±0,11	1,37±0,07*†	0,72±0,08*	1,24±0,07*†
<i>Semana 12</i>	0,96±0,11	1,59±0,08*†	0,71±0,07*	1,36±0,07*†
<i>Ganho (S<sub>12</sub>- S<sub>0</sub>)</i>	-0,04±0,12	+0,47±0,10#†	-0,36±0,09#	+0,33±0,11#†

Valores são médias±EPM \* vs semana 0; † vs S, # diferente de zero, p < 0,05

**Tabela 11** - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso e teste da sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas nos SHAM e SAD submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).

		<b>SHAM</b>		<b>DSA</b>	
		<b>S</b> <b>(n=12)</b>	<b>T</b> <b>(n=12)</b>	<b>S</b> <b>(n=9)</b>	<b>T</b> <b>(n=12)</b>
<b>Valores basais</b>	PAM (mmHg)	122±3	118±2	131±3*	135±3*
	FC (b/min)	378±10	328±8†	364±9	407±15*†
<b>Sensibilidade</b> <b>(b/min/mmHg)</b>	Bradicardia reflexa	1,96±0,23	2,44±0,24†	0,33±0,10*	0,21±0,02*
	Taquicardia reflexa	2,68±0,18	3,59±0,22†	0,48±0,08*	0,31±0,07*

† vs S; \* vs Sham; p < 0,05

**Tabela 12** - Comparação da expressão proteica (em unidades arbitrárias) de DBH no NTS; BVLc e BVLr nos grupos SHAM e DSA, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S). \* vs SHAM; † vs S,  $p < 0,05$

	SHAM-S	SHAM-T	DSA-S	DSA-T
NTS	7,99±0,90	12,59±0,87†	5,60±0,52	5,40±0,84*
BVLc	4,84±0,38	6,44±0,48†	4,46±0,24	4,93±0,28*
BVLr	7,26±0,15	3,12±0,31†	3,44±0,13*	5,32±0,42*†

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo † vs S; \* vs Sham;  $p < 0,05$

**Tabela 13** - Efeitos do treinamento e DSA sobre valores relativos em fração de área de DBH e OT no PVN medial e PVN posterior .

		SHAM-S (n=4)	SHAM-T (n=4)	DSA-S (n=4)	DSA-T (n=4)
<b>Magnocelular</b>	DBH	29,40±1,68	32,31±0,97	19,27±0,38*	25,22±0,51
	OT	16,08±0,38	14,91±1,09	7,80±0,35*	6,40±0,23*
<b>Dorsal cap</b>	DBH	39,02±1,55	49,71±1,72	35,93±0,98*	41,90±0,57
	OT	9,87±0,03	10,56±0,55	5,89±0,38*	5,51±0,35*
<b>Ventromedial</b>	DBH	13,37±1,15	22,23±0,36†	10,32±0,42	10,74±0,62*
	OT	11,69±0,86	21,24±2,25†	6,72±0,25*	6,17±0,49*
<b>Posterior</b>	DBH	16,46±0,61	25,47±1,43	12,23±0,46	13,08±0,71*
	OT	3,43±0,12	5,79±0,14†	1,94±0,10*	1,92±0,17*

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo \* vs SHAM; † vs S,  $p < 0,05$

**Tabela 14** - Efeitos do treinamento (T) e DSA sobre a área e volume de neurônios OTérgicos e de botões sinápticos NORérgicos no PVN medial e PVN posterior.

		SHAM-S (n=4)	SHAM-T (n=4)	DSA-S (n=4)	DSA-T (n=4)
<b>PVN medial ventromedial</b>	Área neuronal ( $\mu\text{m}^2$ )	1992,70±179,02	1999,10±188,98	1896,43 ±45,31	1821,89±56,57
	Volume neuronal ( $\mu\text{m}^3$ )	994,70±39,41	925,08±97,47	829,09±56,33	836,91±41,86
	Botões/neurônio	10±2	14±2	6±1*	7±1*
<b>PVN posterior</b>	Área neuronal ( $\mu\text{m}^2$ )	1846,76±110,29	1704,09±100,74	1828,90±166,81	1805,75±76,77
	Volume neuronal ( $\mu\text{m}^3$ )	965,74±97,30	880,62±111,59	933,79±147,13	863,96±58,41
	Botões/neurônio	10±1	13±1	5±1*	5±1*

10-20 neurônios/ratos; 4 ratos/grupo \* vs SHAM; † vs S,  $p < 0,05$

**Tabela 15** - Comparação da expressão proteica (em unidades arbitrárias) de OT no NTS commisural e intermediário; BVLc e BVLr nos grupos SHAM e DSA, submetidos ao treinamento (T) ou mantidos sedentários (S).

	<b>SHAM-S</b> (n=4)	<b>SHAM-T</b> (n=4)	<b>DSA-S</b> (n=4)	<b>DSA-T</b> (n=4)
<b>NTS</b>	2,29±0,13	6,51±0,30†	1,46±0,11*	1,71±0,04*
<b>DMV</b>	0,87±0,06	2,85±0,53†	0,88±0,11*	1,06±0,05*
<b>BVLc</b>	0,80±0,05	1,91±0,04†	0,56±0,05	0,70±0,03*
<b>BVLr</b>	0,74±0,12	1,47±0,07†	0,39±0,04*	0,56±0,02*

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo \* vs SHAM; † vs S, p<0,05

**Protocolo I ± Lesão neurônios noradrenérgicos que se projetam ao PVN (DBHx)**

**Tabela 16** - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de esforço máximo nas semanas 0, 4 e 8 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento (T) e lesão das projeções noradrenérgicas do PVN (DBHx).

	<b>Sham-S</b> (n=4)	<b>Sham-T</b> (n=5)	<b>DBHx-S</b> (n=4)	<b>DBHx-T</b> (n=4)
<b>Semana 0</b>	0,98±0,19	0,98±0,14	0,98±0,14	0,98±0,14
<b>Semana 4</b>	0,90±0,12	1,20±0,12*	0,83±0,08	1,20±0,12*
<b>Semana 8</b>	0,75±0,09	1,35±0,09*†	0,75±0,09	1,35±0,09*†
<b>Ganho (S8- S0)</b>	-0,23±0,14	0,38±0,08	-0,23±0,14	0,38±0,08

Valores são médias±EPM \* vs. Semana 0; † vs. Sedentário, p<0,05.

**Tabela 17** - Valores absolutos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso nos SHAM e DBHx submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S).

		<b>SHAM-S</b> (n=4)	<b>SHAM-T</b> (n=4)	<b>DBHx-S</b> (n=4)	<b>DBHx-T</b> (n=4)
<b>Valores basais</b>	PAM (mmHg)	113±1	112±1	113±2	110±1
	FC (b/min)	352±2	321±4†	352±5	350±3*
<b>Sensibilidade</b> (b/min/mmHg)	Bradicardia reflexa	1,81±0,11	2,37±0,24†	1,61±0,09*	2,25±0,10*
	Taquicardia reflexa	2,47±0,09	3,28±0,19†	2,30±0,14*	3,06±0,17*

\* vs SHAM; † vs S, p < 0,05

**Tabela 18** - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de DBH em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; BVLc e BVLr.

	SHAM-S	SHAM-T	DBHx-S	DBHx-T
NTS	7,06±0,45	11,39±1,07†	4,20±0,40*	7,18±0,30†
BVLc	5,86±0,24	8,66±0,86†	3,72±0,32*	6,19±0,20*†
BVLr	6,34±0,87	3,94±0,22†	4,70±0,76	5,51±0,47

\* vs SHAM; † vs S, p < 0,05

**Tabela 19** - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos de número dos neurônios DBH+ em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; BVLc e BVLr.

	SHAM-S	SHAM-T	DBHx-S	DBHx-T
NTS	17±1	20±1	12±1*	12±1*
BVLc	12±1	12±1	8±1*	9±1*
BVLr	11±1	9±1	10±1	10±1

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo. \* vs SHAM, † vs S, P<0,05.

**Tabela 20** - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de DBH e OT no PVN medial e PVN posterior. \* vs SHAM, † vs S, P<0,05.

		SHAM-S	SHAM-T	DBHx-S	DBHx-T
<b>Magnocelular</b>	DBH	18,38±0,26	21,39±1,21	6,71±0,46*	5,86±0,48*
	OT	17,58±0,38	19,69±1,52	6,27±0,71*	5,43±2,62*
<b>Dorsal cap</b>	DBH	21,88±0,97	28,70±1,85	6,44±0,59*	8,59±0,63*
	OT	8,03±0,71	8,80±1,15	4,30±0,51*	3,04±0,87*
<b>Ventromedial</b>	DBH	9,53±0,32	16,23±0,79†	4,17±0,43*	5,67±0,35*
	OT	13,61±0,95	26,65±3,01†	7,91±0,51*	7,80±0,69*
<b>Posterior</b>	DBH	8,06±0,22	13,59±0,85†	3,41±0,34*	5,27±0,94*
	OT	3,13±0,05	5,21±0,12†	1,36±0,13*	1,62±0,22*

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo. \* vs SHAM, † vs S, P<0,05.

**Tabela 21** - Efeitos do treinamento (T) e DBHx sobre valores relativos em fração de área de OT em áreas bulbares: DMV; NTS caudal e intermediário; BVLc e BVLr

	SHAM-S	SHAM-T	DBHx-S	DBHx-T
NTS	1,01±0,02	2,52±0,02†	0,82±0,05	1,14±0,06*
DMV	0,49±0,05	1,51±0,09†	0,40±0,03	0,70±0,07*
BVLc	0,42±0,08	1,12±0,16†	0,37±0,03	0,56±0,07*
BVLr	0,38±0,04	1,15±0,10†	0,40±0,04	0,52±0,08*

8-12 imagens/ratos; 4 ratos/grupo. \* vs SHAM, † vs S, P<0,05.

**Protocolo II ± Análise Temporal da hipertensão**

**Tabela 22** - Valores basais e respostas de PAM e FC em ratos WKY e SHR ao longo de 8 semanas de análise.

		S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>8</sub>
<b>PAM (mmHg)</b>	WKY	98±2 (n=9)	100±3 (n=7)	105±3 (n=7)	113±6* (n=6)	120±2* (n=6)
	SHR	106±5 (n=7)	110±6 (n=7)	130±3*† (n=6)	157±4*† (n=8)	183±4*† (n=9)
<b>FC basal (bpm)</b>	WKY	391±14	373±17	360±19*	338±13*	332±9*
	SHR	488±9†	387±8*	390±16*	380±12*†	395±11*†

Valores em média±EPM. \* vs semana 0, † vs WKY, P<0,05.

**Tabela 23** - Efeitos temporal sobre valores relativos em fração de área de VP no PVN medial e PVN posterior .

		S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>8</sub>
<b>Magnocelular</b>	WKY	12,97±1,81	9,95±4,21	15,99±0,36	16,77±1,91	10,53±2,38
	SHR	23,38±1,94†	28,63±1,42†	29,27±1,13†	34,84±2,11*†	31,72±1,07*†
<b>Dorsal cap</b>	WKY	3,38±0,82	2,57±0,78	2,59±0,44	3,88±0,66	2,06±0,46
	SHR	2,15±0,13	4,20±0,63	2,56±0,30	4,91±0,81*	6,76±1,95*†
<b>Ventromedial</b>	WKY	6,84±0,51	4,17±0,66	6,66±0,47	6,24±0,72	5,76±0,23
	SHR	6,88±1,10	13,51±1,11*†	17,76±1,55*†	21,00±1,48*†	24,34±1,32*†
<b>Posterior</b>	WKY	1,13±0,18	0,89±0,15	1,11±0,22	1,39±0,19	0,86±0,16
	SHR	1,09±0,07	2,10±0,21*†	2,58±0,44*†	2,91±0,11*†	3,09±0,24*†

8-12 imagens/rato; 4 ratos/grupo. \* vs Semana 0, † vs WKY, P<0,05.

**Tabela 24** - Efeitos temporal sobre valores relativos em fração de área de DBH no PVN medial e PVN posterior. \* vs Semana 0, † vs WKY, P<0,05.

		<b>S<sub>0</sub> (n=4)</b>	<b>S<sub>1</sub> (n=4)</b>	<b>S<sub>2</sub> (n=4)</b>	<b>S<sub>4</sub> (n=4)</b>	<b>S<sub>8</sub> (n=4)</b>
<b>Magnocelular</b>	WKY	24,31±1,56	25,53±1,12	20,67±1,84	24,90±1,79	21,26±1,27
	SHR	26,65±1,02	28,69±0,77	32,31±1,43†	32,31±1,43†	31,18±0,77†
<b>Dorsal cap</b>	WKY	32,42±1,91	33,78±2,83	30,7±1,03	33,16±2,07	31,05±2,88
	SHR	26,65±0,62	33,48±2,07	33,54±1,57	33,26±1,44	34,50±1,60
<b>Ventromedial</b>	WKY	15,10±1,19	18,69±1,72	14,13±1,10	13,61±0,98	17,63±0,99
	SHR	19,23±0,23	25,90±2,62*†	29,95±1,54*†	26,18±1,22*†	27,79±1,38*†
<b>Posterior</b>	WKY	14,71±1,51	15,69±1,86	15,47±1,08	11,91±1,21	12,02±1,05
	SHR	19,08±0,90†	19,58±1,09†	18,72±0,83	20,12±0,68†	20,07±1,15†

8-12 imagens/rato; 4 ratos/grupo. \* vs Semana 0, † vs WKY, P<0,05.

**Tabela 25** - Correlações entre conteúdo de VP e DBH no PVN medial e PVN posterior e a PAM.

<b>Áreas encefálicas</b>	<b>Equações de regressão</b>	<b>Valores R</b>	<b>Valores P</b>
<b>WKY</b>			
<i>Magnocelular neurônios DBH+ x MAP</i>	$Y = 0,12x + 16,37$	0,60	0,005
<i>Dorsal cap neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,10x + 21,21$	0,36	0,121
<i>Ventromedial neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,10x + 15,01$	0,30	0,198
<i>Posterior neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,02x + 16,96$	0,19	0,432
<i>Magnocelular neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,22x + 5,93$	0,64	0,003
<i>Dorsal cap neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,09x - 5,87$	0,53	0,018
<i>Ventromedial neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,35x - 20,99$	0,74	0,002
<i>Posterior neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,03x - 1,26$	0,55	0,013
<b>SHR</b>			
<i>Magnocelular neurônios DBH+ x MAP</i>	$Y = 0,04x + 23,86$	0,55	0,012
<i>Dorsal cap neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,06x + 24,58$	0,53	0,016
<i>Ventromedial neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,05x + 19,27$	0,39	0,091
<i>Posterior neurônios DBH + x MAP</i>	$Y = 0,01x + 18,14$	0,21	0,374
<i>Magnocelular neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,07x + 19,28$	0,58	0,007
<i>Dorsal cap neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,04x - 1,10$	0,59	0,007
<i>Ventromedial neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,15x - 3,78$	0,85	0,001
<i>Posterior neurônios VP+ x MAP</i>	$Y = 0,02x + 0,18$	0,70	0,001

Essas análises envolvem todos os pontos analisados durante 8 semanas de protocolo. Correlações dos dados de expressão de DBH e VP foram feitos com 20 observações/área, 4 ratPs/grupo.

**Protocolo II ± Sham & DSA****Tabela 26** - Valores absolutos de pressão arterial diastólica (PAD), PA sistólica (PAS), PA média (PAM) e frequência cardíaca (FC) obtidos durante o repouso e Sensibilidade do barorreflexo, avaliada à partir do cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas nos SHAM e DSA das duas linhagens Wistar e SHR.

	<b>Wistar-SHAM</b> (n=11)	<b>Wistar-DSA</b> (n=4)	<b>SHR-SHAM</b> (n=7)	<b>SHR-DSA</b> (n=9)
<b>PA diastólica</b> (mmHg)	96±2	97±14	148±5*	104±6†
<b>PA sistólica</b> (mmHg)	126±2	124±18	180±2*	133±5†
<b>PAM (mmHg)</b>	106±2	106±14	159±4*	113±5†
<b>FC basal</b> (bpm)	344±11	339±46	360±4	352±10
<b>Sensibilidade</b> <b>bradicardia</b> (b/min/mmHg)	1,91±0,16	0,48±0,18†	1,55±0,16	0,33±0,06†
<b>Sensibilidade</b> <b>taquicardia</b> (b/min/mmHg)	2,40±0,29	0,59±0,22†	1,68±0,18	0,38±0,04†

Valores em média±EPM. † vs SHAM; \* vs Wistar, p &lt; 0,05.

**Tabela 27** - Efeitos da hipertensão e DSA sobre valores relativos em fração de área de VP no PVN medial e PVN posterior. \* vs Sham, † vs Wistar, p<0,05.

	<b>Wistar-Sham</b>	<b>Wistar-DSA</b>	<b>SHR-Sham</b>	<b>SHR-DSA</b>
<b>Magnocelular</b>	17,39±0,97	16,40±0,58	37,20±1,94*	22,49±5,20
<b>Dorsal cap</b>	3,61±0,57	3,81±0,47	5,05±0,65	2,30±0,65
<b>Ventromedial</b>	4,25±1,03	4,22±0,36	13,49±1,40*	4,53±1,15
<b>Posterior</b>	0,53±0,24	0,62±0,28	3,11±1,16*	0,69±0,14

8-12 imagens/rato; 4 ratos/grupo. † vs SHAM; \* vs Wistar, P&lt;0,05.

**Tabela 28** - Efeitos da hipertensão e DSA sobre valores relativos em fração de área de DBH no PVN medial e PVN posterior

	<b>Wistar-Sham (n=2)</b>	<b>Wistar-DSA (n=2)</b>	<b>SHR-Sham (n=5)</b>	<b>SHR-DSA (n=5)</b>
<b>Magnocelular</b>	19,73±1,98	18,22±2,37	21,12±1,71	27,40±2,35*†
<b>Dorsal cap</b>	35,98±6,03	24,01±1,44†	18,34±1,22*	25,77±2,47
<b>Ventromedial</b>	19,37±1,53	14,75±1,22	15,8±1,53	16,50±1,02
<b>Posterior</b>	18,82±1,05	14,8±2,14	12,48±1,27*	11,93±1,71

8-12 imagens/rato; 4 ratos/grupo. † vs SHAM; \* vs Wistar, P<0,05.

## Apêndice II

# Exercise training abrogates age-dependent loss of hypothalamic oxytocinergic circuitry and maintains high parasympathetic activity

C. R. Santos | A. Ruggeri | A. Ceroni | L. C. Michelini 

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo/SP, Brazil

## Correspondence

Lisete C. Michelini, Department of Physiology and Biophysics, ICB University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.  
Email: michelin@usp.br

## Funding information

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: FAPESP 11/15676-4, FAPESP 11/51410-9 and FAPESP 15/24935-4; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: CNPq 304060/2011-9 and CNPq 305940/2015-5

Neuroanatomical studies associating neuronal tract tracing and immunohistochemistry identified reciprocal (ascending noradrenergic/descending oxytocinergic; OTergic) connections between brainstem cardiovascular nuclei and the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN). Previous functional studies indicated that exercise training (T) augmented the expression/activity of the OTergic pathway and improved the autonomic control of the heart. Knowing that ageing is associated with autonomic dysfunction and also that sinoaortic denervation blocked T-induced beneficial effects, we hypothesised that T was able to reduce age-dependent impairment by improving the afferent signalling to PVN and augmenting OTergic modulation of cardiovascular control. We evaluated the combined effects of T and age on plastic remodelling of ascending dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)+ and descending oxytocin (OT)+ pathways and correlated them with cardiovascular parameters. Male Wistar rats were submitted to T or kept sedentary for 8 weeks. After evaluating arterial pressure, heart rate (HR), their variabilities and spectral components in conscious rats at rest, brains were harvested to analyse the plastic remodelling of brain autonomic nuclei (immunofluorescence + confocal microscopy). The density of DBH+ neurones within the nucleus of solitary tract (NTS) and caudal ventrolateral medulla, the number of DBH+ terminals overlapping OT+ neurones in PVN preautonomic nuclei, as well as the density of OT+ neurones and their projections to the NTS and dorsal motor nucleus of the vagus, were markedly reduced in sedentary rats during 8 weeks of inactivity. By contrast, these effects were completely blocked by T and reversed to a large augmentation of DBH+ and OT+ densities in both cell bodies and terminals within autonomic nuclei and target areas. All plastic changes observed correlated positively with parasympathetic activity to the heart (high frequency pulse interval, but not with low frequency pulse interval) and negatively with resting HR. Data indicate that T, by increasing beneficial neuroplastic adaptive changes within the brainstem-PVN reciprocal network, abrogates age-dependent deleterious remodelling and augments parasympathetic modulation of the heart, therefore improving autonomic function.

## KEYWORDS

age, autonomic brain nuclei, brainstem, exercise, hypothalamus, noradrenergic pathways, oxytocinergic pathways, parasympathetic activity



Journal Name	JNE
Manuscript No.	12601
WILEY	
No. of pages: 13	Dispatch: 18-4-2018
PE: Rajasekaran S.	CE: Liyagath Ali B

## 1 | INTRODUCTION

Classical neuroanatomical studies associating neuronal tract tracing and immunohistochemistry techniques have shown that preautonomic parvocellular neurones of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) receive afferent information from cardiovascular areas in the brainstem and project back to the nucleus of the solitary tract (NTS), dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) and rostroventrolateral medulla (RVLM), besides the intermediolateral cell column in the spinal cord.<sup>1-7</sup> The reciprocal connections between primary integrative autonomic centres in the brainstem and parvocellular PVN neurones provide anatomical support for prompt feedback control loops through which the PVN, a master integrative forebrain area, could modulate the cardiovascular function.<sup>8</sup>

Although the ascending information to PVN is carried out mainly by noradrenergic (NORergic) fibres,<sup>2,5-7</sup> the long-descending monosynaptic projections from the PVN to spinal cord and brainstem areas involved in cardiovascular control have been shown to contain oxytocin (OT) and vasopressin (VP), somatostatin, met- and leu-enkephalin.<sup>4</sup> The majority of them contained OT and VP, which represents approximately 16% and 5%, respectively, of PVN neurones projecting to medulla and/or spinal cord.<sup>1,3,4,9</sup> Investigating the autonomic control of the heart during both an acute bout of exercise and loading/unloading of baroreceptors, we observed that OT administration into the NTS/DMV complex (mimicking the activation of long-descending OTergic pathway) reduced the magnitude of exercise tachycardia and augmented the sensitivity of reflex bradycardia.<sup>10,11</sup> By contrast, pretreatment of NTS with VP caused opposite effects: it augmented the magnitude of exercise tachycardia and displaced baroreflex function towards high heart rate (HR) values.<sup>12,13</sup> We also showed these effects were differentially mediated by the autonomic nervous system because OT-induced slowdown of the heart was caused by increased vagal outflow, whereas a VP-dependent increase in HR values was mediated by reduced sympathetic withdrawal during pressure increase.<sup>14</sup> These findings imply the reciprocal connections between NTS/DMV and PVN in the autonomic control of the heart.

Age is a major contributor to cardiovascular morbidities and mortalities.<sup>15</sup> Although it is known that the normal ageing process is accompanied by deleterious changes in homeostatic control of the heart favouring increased sympathetic/reduced parasympathetic activity and blunted baroreflex sensitivity,<sup>16</sup> the reasons why homeostatic systems deteriorate in the elderly are not well understood. Experimental evidence has shown that ageing in spontaneous hypertensive rats (SHR) courses with loss of cardiac vagal preganglionic neurones.<sup>17</sup> Indeed, previous studies have shown that SHR exhibited an important deficit in the vagal capacity to reduce HR, which was not a result of decreased cardiac parasympathetic responsiveness or cardiac neuroeffector mechanisms.<sup>18,19</sup> These observations indicated that ageing is accompanied by an abnormal function of central vagal preganglionic neurones. On the other hand, studies from our laboratory revealed that exercise training was able to augment the density of PVN OT-positive neurones and

to improve both vagal control of the heart and baroreflex sensitivity.<sup>20-22</sup> Training-induced effects, however, were completely blocked in exercised rats submitted to sinoaortic denervation or ligation of carotid body arteries.<sup>20,21,23</sup> Taken together, these data suggest that changes in vagal control of the heart observed in both ageing and training depend on plastic remodelling of supramedullary OTergic pathway and are driven by peripheral afferent signalling conveyed by baroreceptors and chemoreceptors to the NTS. Based on these findings, we hypothesised that exercise training is able to block age-dependent autonomic dysfunction by avoiding deleterious and inducing beneficial neuroplastic adaptive changes in the supramedullary circuitry and that these changes restore the vagal control of the heart. In addition, we proposed that the stimuli driven plastic remodelling of OT-positive neurones originate in the periphery and ascend to PVN via NORergic projection from brainstem.

Therefore, in the present study, we investigated the combined effects of age and aerobic exercise training on: (i) the plasticity of both dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)+ neurones in the NTS (the first synaptic relay of peripheral receptors in the central nervous system) and other brainstem areas, as well as their ascending projections to the PVN, and also on OT-positive neurones in PVN preautonomic nuclei and their descending projections to brainstem areas involved in cardiovascular control, and (ii) on cardiovascular parameters and their autonomic modulation.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals and ethical approval

The present study was carried out in compliance with the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College of Animal Experimentation. All surgical procedures and experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Sao Paulo.

Two-month-old male Wistar rats were housed under a 12:12 hour light/dark cycle, with free access to standard laboratory chow and water. During a 10-day acclimatisation period, rats were preselected for their ability to walk on a treadmill (KT-300; Inbramed, Porto Alegre, Brazil; 10 sessions, 10-15 min day<sup>-1</sup>, 0.3-0.6 km hour<sup>-1</sup>, 0% grade). Only active rats were used in the present study. Rats were then subjected to a progressive maximal exercise test (MET) on the treadmill, as described previously.<sup>20</sup> MET, an index of VO<sub>2</sub> max,<sup>24</sup> was used to determine the training intensity.

### 2.2 | Exercise training and sedentary protocols

Rats with equivalent capability were allocated to training protocol (T = 50%-60% of maximal exercise capacity, performed 1 hour day<sup>-1</sup>, 5 days week<sup>-1</sup> for 8 weeks) or kept sedentary (S) for a similar period of time.<sup>22,25</sup> METs were repeated at the 4th and 8th week to adjust the training intensity and compare the efficacy of T and S protocols, respectively.<sup>22,25</sup> Rats assigned to the S protocol were handled every day.

## 2.3 | Functional measurements

Resting values of arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were measured in conscious rats resting in their cages at weeks 0 ( $S_0$  and  $T_0$ ), 1 ( $T_1$ ), 2 ( $T_2$ ), 4 ( $T_4$ ) and 8 ( $T_8$  and  $S_8$ , which was used as a time-control). One day before the functional experiments, rats were anaesthetised i.p. with ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>; Fort Dodge, IA, USA) plus xylazine (12 mg kg<sup>-1</sup>; Fort Worth, TX, USA) for chronic catheterisation of the femoral artery.<sup>20,23</sup> The arterial catheter was connected to the recording system (PowerLab; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia; 2000 Hz of sampling 148 frequency) and a variable period of time (20-40 minutes) was allowed for stabilisation of cardiovascular parameters before starting the simultaneous measurement of AP and HR for 30 minutes (basal values). Functional measurements were made 26-30 hours after the last training session.

Time series of systolic AP (SAP) and pulse interval (PI) were used to analyse pressure and HR variabilities, as described previously.<sup>26</sup> Briefly, frequency domain was evaluated using fast Fourier transformation by Welch's method and Hanning windows with 50% overlap. Power spectral density for low frequency (LF, 0.20-0.75 Hz, indicating mainly the sympathetic activity to vessels and sympathetic + parasympathetic modulation of the heart) and high frequency (HF, 0.75-3.0 Hz, indicating the vagal activity to the heart) domains were obtained by means of power spectrum density integration within each frequency bandwidth, using a customised routine in MATLAB, version 6.0 (Mathworks, Natick, MA, USA).<sup>22,23</sup> The spontaneous baroreflex sensitivity was assessed via the  $\alpha$ HF index, which represents baroreflex sensitivity at the HF band.<sup>27,28</sup>

## 2.4 | Immunofluorescence assays

After functional measurements, rats were deeply anaesthetised with a bolus of ketamine + xylazine (300 mg kg<sup>-1</sup> + 60 mg kg<sup>-1</sup>) and submitted to transcardiac perfusion with 0.01 Dulbecco's modified Eagle's medium (300 mL of DMEM, D-8900; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; Daigger Pump, Vernon Hills, IL, USA) followed by fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate-buffered saline [PBS], pH 7.2, 500 mL) immediately after the respiratory arrest. Rats were decapitated, brains were removed, post-fixed (4% paraformaldehyde for 48 hours) and cryoprotected (0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris-PBS containing 20% sucrose for a minimum of 24 hours followed for 0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris-PBS containing 30% sucrose) at room temperature and stored at 4°C until processing. Hypothalamic (from 1.72 to 2.04 mm caudal to bregma) and brainstem (NTS: from 14.40 to 13.68 mm caudal to bregma; RVLM/C1 from 12.24 to 12.48 mm caudal to bregma; caudal ventrolateral medulla [CVLM]/A1 from 14.40 to 13.68 mm caudal to bregma)<sup>29</sup> coronal sections (30  $\mu$ m; cryostat CM3050; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) were collected in tissue culture wells with 0.01 mol L<sup>-1</sup> PBS at 4°C. Sections were incubated with 0.01% Triton X-100 and 10% normal donkey serum for 30 minutes. For double immunofluorescence reactions, sections were incubated for 24 hours in a

mixture of primary antibodies that included a polyclonal guinea pig anti-oxytocin (dilution 1:200 000; Bachem, Torrance, CA, USA), a mouse monoclonal anti-DBH (dilution 1:3000). Reactions with primary antibodies were followed by a 5-hour incubation with secondary antibodies (donkey anti-guinea pig Alexa 594 labelled, dilution 1:500 dilution; donkey anti-mouse Alexa 488 labelled, dilution 1:500 dilution), diluted in Tris-PBS containing 0.01% Triton X-100 and 1% normal donkey serum. Sequential coronal sections were placed on gelatinised slides and mounted with a coverslip and Slowfade medium. Control experiments were performed by omitting primary or secondary antibodies. Antibodies and serum were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

The histological sections were carefully examined (Zeiss, Wetzlar, Germany) to localise the regions of interest (ROIs). Images from the medial and posterior PVN, NTS, DMV, CVLM and RVLM were digitised with identical acquisition settings. Immunofluorescence signals were acquired and quantified as described previously.<sup>20,30</sup> Briefly, the background intensity was calculated from random adjacent areas in the neuropil and threshold was set to pass intensities above the background immunofluorescence (1.5-fold for OT+ neurones; 2.0-fold for DBH+ neurones and 3.0-fold for DBH and OT fibres/terminals). The ROIs of predetermined sizes were drawn within preautonomic PVN subnuclei (posterior [post]; ventromedial [vm]) and brainstem areas (NTS, DMV, CVLM and RVLM) and the density of the OT and DBH signals (expressed as a percentage area) were measured (IMAGEJ; NIH, Bethesda, MD, USA). Quantifications were performed in both the left and right sides of the nuclei; values from sections were averaged to give a mean value for the nucleus for each rat in each condition.

## 2.5 | Confocal analysis

The same PVN histological slices from groups  $S_0$ ,  $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_8$  and  $S_8$  were examined with a LSM 780-NLO confocal microscope (Zeiss) at the Core Facilities of Biomedical Science Institute-University of São Paulo. Argon (488 nm) and HeNe (543 nm) lasers were used to excite the Alexa 488 and Alexa 594 fluorochromes. Images from T and S experimental groups were digitised with identical microscope settings. Stacks of confocal images containing the 2 channels and spanning the whole extension of double-labelled neurones (~50 sections, Z-step: 0,5  $\mu$ m, image size 1024  $\times$  1024 pixels,  $\times$ 63 oil immersion lens) were obtained from 2 rostrocaudal levels of the PVN (bregma: -1.80 and -2.10 mm interesting the PVNvm and PVNpost,<sup>5</sup> respectively). All double-labelled neurones whose somata were fully contained within the Z-stack were selected for quantification.<sup>30</sup> The image stacks were imported into IMARIS (Bitplane; Oxford Instruments, Zurich, Switzerland), which has algorithms that enable the 3-dimensional reconstruction of the neurone and the colocalisation analysis, discriminating between boutons that overlap with the neurone from those that do not. The density of overlapping boutons was calculated and expressed as DBH+ boutons/OT+ neurone. Because the enzyme DBH converts dopamine into norepinephrine,

the presence of DBH immunoreactivity indicates that DBH+ fibres (and neurones) are noradrenergic.

## 2.6 | Statistical analysis

Data were submitted to Levene's test for homogeneity of variance and expressed as the mean  $\pm$  SEM. The treadmill performance during T and S protocols was analysed by two-way ANOVA with repeated measurements (time). The effects of exercise on haemodynamic parameters and immunofluorescence data during the 8 experimental weeks were analysed by one-way factorial ANOVA, whereas the differences between T and S groups at weeks 0 and 8 were made by two-way factorial ANOVA. Fisher's least significant difference was used as the post-hoc test. Correlation analyses were performed using Pearson's statistics. All analyses were conducted using STATISTICA, version 12.0 (Vince Stat Software Inc.).  $P < .05$  was considered statistically significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Time course changes on treadmill performance, haemodynamic parameters and their variabilities

As depicted in Table 1, T rats exhibit increased treadmill performance since the 4th (+36%) up to the 8th week of training (+55%), whereas S rats showed decreased performance at the 8th week (-23%). Therefore, in contrast to the T group that presented a significant gain, S rats lost their treadmill performance when kept sedentary for 8 weeks (Table 1). Resting values of MAP were not changed during T or S protocols; T rats, however, exhibited significant resting bradycardia at the 8th week of training (a 9% decrease vs  $T_0$ ), whereas baseline HR values were not changed in S controls (Table 2). Consistent with unchanged pressure levels, SAP variability and LF-SAP (an index of sympathetic vasomotor modulation) were not altered in S and T groups during the 8-week protocols (Table 3). After 8 weeks of S protocol, the parasympathetic modulation of the heart was unchanged (HF-PI = -13%,  $P > .05$ ), whereas LF-PI was

**TABLE 1** Absolute values of velocity attained on the treadmill during maximal exercise tests and performance gain at the end of sedentary (S) and trained (T) protocols

Attained velocities (km h <sup>-1</sup> )	S rats	T rats
Week 0	1.11 $\pm$ 0.07 (n = 21)	1.10 $\pm$ 0.04 (n = 44)
Week 4	0.95 $\pm$ 0.07 (n = 11)	1.50 $\pm$ 0.05*** (n = 22)
Week 8	0.85 $\pm$ 0.12* (n = 11)	1.70 $\pm$ 0.12*** (n = 11)
Performance gain	-0.27 $\pm$ 0.08***	+0.58 $\pm$ 0.10****

Values are the mean  $\pm$  SEM. Performance gain represents the difference between experimental weeks 8 and 0. ANOVA with repeated measurements,  $F_{5,74} = 23.6$ ;  $P < .001$ . \* $P < .05$  vs week 0. \*\* $P < .05$  vs S rats. \*\*\*Significant change in the performance gain.

increased by 75%, although the large SEM precluded a significant change (Table 3). The S group showed no significant change in PI variability (-17% at  $S_8$ ). By contrast, after 8 weeks of training parasympathetic modulation of the heart was largely augmented (a 2.2-fold increase in HF-PI,  $T_8$  vs  $T_0$ ), despite no significant change in the LF-PI component (Table 3). PI variability was also high at  $T_8$ , although the large SEM precluded a significant change (Table 3). Note that the improvement of parasympathetic activity was accompanied by a significant increase in spontaneous baroreflex sensitivity, as indicated by  $\alpha$ HF (+63%,  $T_8$  vs  $T_0$ ) (Table 3).

### 3.2 | Sequential training-induced plasticity on supramedullary pathways involved in HR control

Knowing that HR levels depend on afferent signalling of baroreceptors (primarily integrated at the brainstem) to generate parasympathetic and sympathetic outflow<sup>31,32</sup> and are continuously modulated by supramedullary pathways,<sup>2,4,31-33</sup> we evaluated the effects of training on afferent/efferent hypothalamic circuitry where higher modulatory autonomic nuclei are located. Considering that information conveyed by baroreceptors ascends from dorsal (NTS) and ventral (CVLM) brainstem areas to the hypothalamus via NORergic pathways,<sup>2,5-7</sup> we first analysed the effects of training on the expression of DBH+ neurones in brainstem nuclei. Photomicrographs taken at different times during T and S protocols (Figure 1A) revealed that DBH density was more pronounced within the NTS and CVLM of trained rats compared to sedentary controls. Quantitative data indicated that DBH+ neurones occupied an area of 10.3  $\pm$  0.7% and 8.4  $\pm$  0.5% in the NTS and CVLM, respectively, at the beginning of the protocols (Figure 1B). Data also confirmed that, during the 8-week S protocol, rats exhibited a 30% reduction in DBH density. Training blocked this and augmented DBH density in both nuclei after the 2nd week (Figure 1B): there were 18%, 26% and 19% increases in the NTS and 26%, 17% and 25% in the CVLM for  $T_2$ ,  $T_4$  and  $T_8$ , respectively, compared to  $T_0$ . At the end of protocols, a robust difference in DBH content was observed between T rats and age-matched S controls (12.3  $\pm$  0.6 vs 7.1  $\pm$  0.5% and 10.5  $\pm$  0.8 vs 5.9  $\pm$  0.5%, corresponding to 73% and 79% augmentation within the NTS and CVLM, respectively) (Figure 1B). Interestingly, opposed effects were observed in the RVLM, which is the main location of the cell bodies of premotor neurones innervating the sympathetic preganglionic neurones in the intermediolateral column of the spinal cord: when compared with  $T_0$ , significant reductions of 23%, 22% and 36% were observed at  $T_2$ ,  $T_4$  and  $T_8$ , respectively (Figure 1A,B). Note that the density of DBH+ neurones within the RVLM was not changed in S rats during the 8-week protocol.

Next, we evaluated the effects of T and S protocols on the density of DBH+ projections ascending to PVN preautonomic nuclei and its relationship with OTergic neurones projecting to the brainstem,<sup>1,3,4</sup> which are shown to be involved in baroreceptor-mediated HR control.<sup>20,33,34</sup> Consistent with the effects observed in the brainstem, training significantly increased the density of DBH terminals in selected areas of interest (AOIs) within the PVNvm (Figure 2A) and

**TABLE 2** Baseline values of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) of rats during the 8 wk of training (T) or sedentary (S) protocol

Baseline values	S <sub>0</sub> (n = 3)	T <sub>0</sub> (n = 3)	T <sub>1</sub> (n = 7)	T <sub>2</sub> (n = 9)	T <sub>4</sub> (n = 7)	T <sub>8</sub> (n = 9)	S <sub>8</sub> (n = 9)
MAP (mmHg)	108 ± 2	118 ± 7	119 ± 2	114 ± 3	110 ± 2	113 ± 2	117 ± 3
HR (bpm)	418 ± 9	412 ± 5	399 ± 7	399 ± 8	398 ± 9	369 ± 10 <sup>*,**</sup>	406 ± 10

Values are the mean ± SEM. Training effect (one-way ANOVA) for MAP:  $F_{4,30} = 1.167$ ,  $P = .345$ ; for HR:  $F_{4,30} = 4.592$ ,  $P = .005$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for MAP: no significant effects for condition, weeks or interaction; for HR: condition  $F_{1,20} = 5.942$ ,  $P = .024$ , weeks  $F_{1,20} = 6.087$ ,  $P = .023$ ; interaction  $F_{1,20} = 3.750$ ,  $P = .067$ . \* $P = .006$ : T<sub>8</sub> vs T<sub>0</sub>. \*\* $P = .006$ : T<sub>8</sub> vs S<sub>8</sub>.

**TABLE 3** Changes in systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI) variabilities and respective spectral components induced by training (T) or sedentary (S) protocols

Weeks	SAP var (mmHg <sup>2</sup> )	LF-SAP (mmHg <sup>2</sup> )	PI var (ms <sup>2</sup> )	HF-PI (ms <sup>2</sup> )	LF-PI (ms <sup>2</sup> )	αHF (ms <sup>2</sup> /mmHg <sup>2</sup> )
S <sub>0</sub> (n = 3)	11.66 ± 1.25	4.95 ± 0.79	24.28 ± 3.87	3.24 ± 0.47	1.19 ± 0.21	1.54 ± 0.25
T <sub>0</sub> (n = 3)	11.18 ± 1.10	3.37 ± 0.29	23.38 ± 5.29	3.04 ± 0.57	1.63 ± 0.24	1.44 ± 0.16
T <sub>1</sub> (n = 7)	10.63 ± 2.21	4.66 ± 1.11	30.98 ± 8.28	3.98 ± 0.93	1.75 ± 0.76	1.48 ± 0.19
T <sub>2</sub> (n = 9)	9.81 ± 0.97	3.85 ± 0.30	35.89 ± 6.20	5.21 ± 0.81	1.28 ± 0.19	1.93 ± 0.19
T <sub>4</sub> (n = 7)	10.42 ± 1.08	3.26 ± 0.19	34.13 ± 8.58	4.06 ± 0.60	1.25 ± 0.23	1.37 ± 0.06
T <sub>8</sub> (n = 9)	9.70 ± 0.89	4.05 ± 0.50	47.30 ± 8.07	6.78 ± 1.44 <sup>*,**</sup>	2.08 ± 0.28	2.43 ± 0.17 <sup>*,**</sup>
S <sub>8</sub> (n = 9)	11.38 ± 1.56	4.73 ± 0.55	19.92 ± 7.01	2.76 ± 0.62	2.42 ± 1.51	1.44 ± 0.26

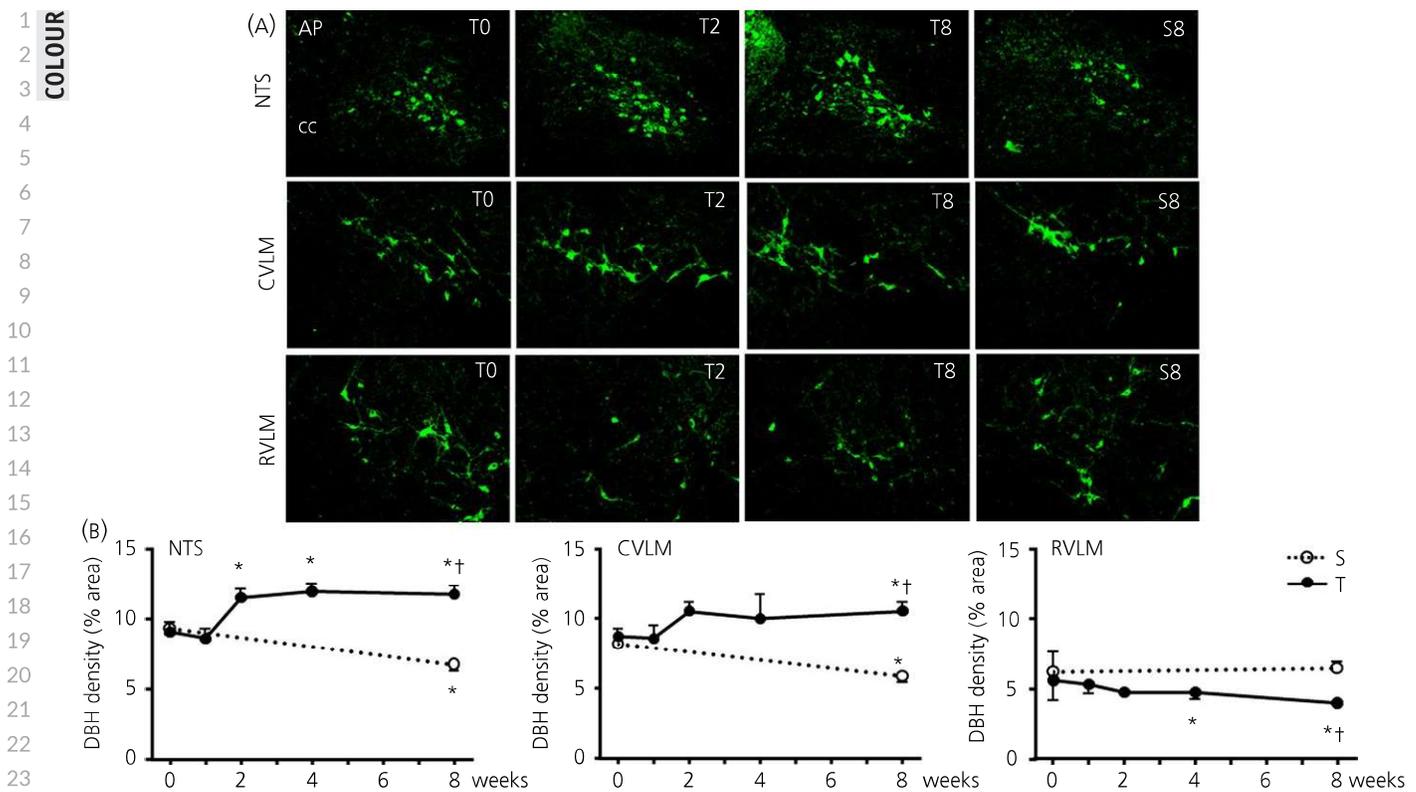
Values are the mean ± SEM. LF, low-frequency component; HF, high-frequency component. αHF represents the spontaneous baroreflex sensitivity calculated with the HF component of PI and corresponding SAP component. Training effect (one-way ANOVA) for HF-PI:  $F_{4,28} = 2.683$ ,  $P = .050$ ; for αHF:  $F_{4,30} = 6.321$ ,  $P < .001$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for HF-PI: condition  $F_{1,16} = 4.769$ ,  $P = .044$ , weeks  $F_{1,16} = 3.482$ ,  $P = .080$ , interaction  $F_{1,16} = 5.810$ ,  $P = .028$ ; for αHF: condition  $F_{1,16} = 4.291$ ,  $P = .054$ , weeks  $F_{1,16} = 4.288$ ,  $P = .055$ ; interaction  $F_{1,16} = 6.467$ ,  $P = .022$ . The other parameters showed no significant differences for groups comparison and training effect. \* $P = .034$ : T<sub>8</sub> vs T<sub>0</sub>. \*\* $P = .023$ : T<sub>8</sub> vs S<sub>8</sub>.

PVNpost, comprising 2 important preautonomic nuclei. Quantitative data showed that the density of DBH+ projections did not change in both nuclei during the 8-week S protocol, although, from T<sub>2</sub>, T rats exhibited a robust increase that was higher in PVNvm: 3.3- to 5.0-fold augmentation vs 1.4- to 2.2-fold in the PVNpost (Figure 2B,D, respectively). We also measured the density of OT+ neurones in the same AOIs (PVNvm = 38.3 ± 3.1%, PVNpost = 11.0 ± 0.7%) (Figure 2C,E). During the 8-week protocol, S rats exhibited a large decrease in OT+ neurones in both PVNvm (-54%) and PVNpost (-38%). By contrast, training not only blocked age-dependent reduction, but also significantly increased the density of OT+ neurones within the PVNvm (from 39% at T<sub>2</sub> up to 62% at T<sub>8</sub>) (Figure 2A,C) and PVNpost (from 40% at T<sub>2</sub> up to 73% at T<sub>8</sub>) (Figure 2E).

Although DBH and OT densities were measured in the same PVN AOIs, this does not imply that DBH terminals are contacting OTergic neurones. To confirm that DBH terminals do overlap the preautonomic OT+ neurones, we counted the number of synaptic boutons contacting the somata and proximal dendrites of neurones. Identified OTergic neurones within the PVNvm and PVNpost were scanned in the Z-plane for neuronal reconstruction and counting of DBH boutons overlapping the OT+ neurones. Figure 3A compares the differential effect S and T in 2 reconstructed OTergic neurones taken from the PVNpost at the 8th experimental week. As observed, the number of overlapping boutons in the T<sub>8</sub> neurone is larger than the respective S<sub>8</sub> control. Bouton counting was conducted for the whole neuronal

surface area of selected OT+ neurones from PVNpost and PVNvm and the results are shown in Figure 3B,C. The average number of DBH boutons/OT neurone is similar in both PVN subnuclei (PVNpost = 15.3 ± 1.5, PVNvm = 15.0 ± 2.7), although they are differentially affected during the 8-week S protocol (Figure 3B,C): unchanged in the PVNvm and largely reduced in the PVNpost (-71%). Training promptly (T<sub>2</sub>) augmented the number of synaptic boutons in OT+ neurones within the PVNpost (a marked increase of +137% at T<sub>2</sub>, +31% at T<sub>8</sub> vs T<sub>0</sub>) (Figure 3B). In these neurones, the age-induced reduction of DBH+ boutons was also observed but, after the 8th experimental week, T rats still exhibited a 4.6-fold increase in DBH+ boutons/OT+ neurone compared to age-matched S controls (Figure 3B). A mild training effect was observed within the PVNvm (DBH+ boutons/OT+ neurone was 47% and 27% larger in T<sub>2</sub> and T<sub>8</sub> vs T<sub>0</sub>) (Figure 3C), although values were not statistically significant. Note that the afferent NORergic input to OTergic neurones within the PVNvm did not change in rats kept sedentary for 8 weeks

To confirm whether age-dependent and training-induced plastic changes in PVN OTergic cell bodies are accompanied by parallel changes in their projection sites, we next evaluated the density of OT+ terminals within the DMV, NTS, RVLM and CVLM (Figure 4). Measurements of OT density in specific AOIs at the beginning of protocols indicated that OT terminals occupied an area of approximately 1% (DMV = 1.2 ± 0.1%; NTS = 1.3 ± 0.1%; RVLM = 0.8 ± 0.1%; CVLM = 1.1 ± 0.1%). All brainstem areas



**FIGURE 1** (A) Photomicrographs showing temporal changes of dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)+ neurones within the nucleus of solitary tract (NTS), caudal ventrolateral medulla (CVLM) and rostromedullary medulla (RVLM) induced by 8 weeks of training (T) or sedentary (S) protocol. AP, area postrema; cc, central canal. (B) Quantification of DBH density in the NTS, CVLM and RVLM of S and T rats during the 8 experimental weeks. Values are the means of 6–9 slices/rat (NTS) and 2–4 slices/rat (CVLM and RVLM), 4 rats in each subgroup. Training effect (one-way ANOVA) for NTS:  $F_{4,15} = 5.651$ ,  $P = .006$ ; for CVLM:  $F_{4,15} = 1.169$ ,  $P = .364$ ; for RVLM:  $F_{4,15} = 2.306$ ,  $P = .106$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for NTS: condition  $F_{1,8} = 16.193$ ,  $P = .004$ , weeks  $F_{1,8} = 0.009$ ,  $P = .926$ , interaction  $F_{1,8} = 19.636$ ,  $P = .002$ ; for CVLM: condition  $F_{1,8} = 20.652$ ,  $P < .002$ , weeks  $F_{1,8} = 0.157$ ,  $P = .702$ ; interaction  $F_{1,8} = 12.765$ ,  $P = .007$ ; for RVLM: condition  $F_{1,8} = 6.739$ ,  $P = .032$ , weeks  $F_{1,8} = 1.931$ ,  $P = .202$ ; interaction  $F_{1,8} = 0.731$ ,  $P = .418$ . \* $P < .05$  vs  $S_0$ , † $P < .05$  vs age-matched S rats

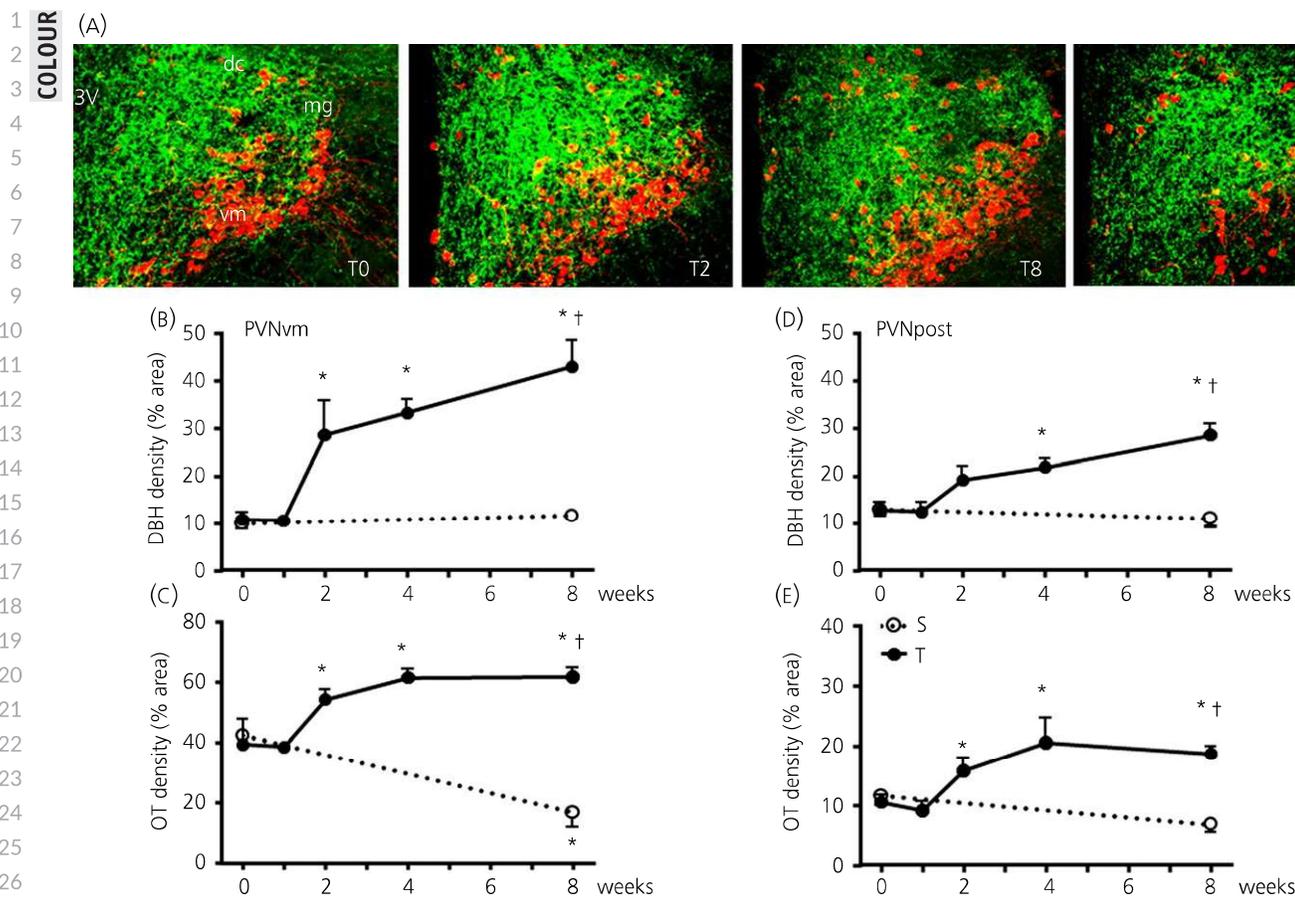
exhibited significant and similar decreases in OT+ terminal density (–36%, –27%, –24%, and –28% in the DMV, NTS, RVLM and CVLM, respectively) (Figure 4) in rats kept sedentary for 8 weeks. Again, training not only blocked these reductions, but also markedly increased the density of OT+ terminals from  $T_2$  up to  $T_8$  (average increases of 42%–45% in the NTS, RVLM and CVLM and of 69% in the DMV at  $T_8$ ) (Figure 4A–D). At the end of the protocols, T rats, compared to age-matched S controls, exhibited 2.0-fold increase in the NTS, RVLM and CVLM and a 2.7-fold increase in the density of OT+ projections to the DMV.

### 3.3 | Training-induced plastic changes in supramedullary circuitry correlate with training-induced parasympathetic modulation and resting bradycardia

Because immunofluorescence assays and functional measurements were made in the same rats, we were able to correlate these parameters. Plastic changes in ascending DBH+ neurones and their hypothalamic projections and in OT+ neurones within the PVN and their brainstem projections did correlate with both the parasympathetic

activity to the heart and resting HR (Table 4) but not with SAP variability and MAP values (data not shown).

Table 4 shows that increased HF-PI was positively correlated with training-induced augmentation in the density of supramedullary modulatory circuitry as the augmented number of DBH+9 neurones within the NTS and CVLM targeting the hypothalamic preautonomic nuclei and the density of OT+ neurones from the PVNpost and PVNvm projecting back to brainstem areas. Therefore, training-induced HR reduction was negatively correlated with all of the plasticity-dependent changes determined by repetitive exercise in the supramedullary circuitry integrated at the PVNpost (Figure 5 and Table 4) and PVNvm (Table 4). Stronger and highly significant correlations were observed between OT terminals projecting back to the NTS and to the DMV and the functional parameters (Figure 5 and Table 4). More specifically, changes in both parasympathetic activity to the heart and basal HR levels induced by S and T protocols are proportional to age-dependent reduction and training-induced augmentation of OT+ projections to both NTS (the first synaptic relay of peripheral receptors within the brain) and DMV (which contains the cell bodies of preganglionic parasympathetic neurones projecting to peripheral tissues).



28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

**FIGURE 2** (A) Photomicrographs showing temporal changes of oxytocin (OT)+ neurones (red) and dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)+ projections (green) within different nuclei of the medial paraventricular nucleus (PVN) in sedentary (S) and trained (T) rats during the 8 experimental weeks. dc, dorsal cap; mg, lateral magnocellular; post, posterior; vm, ventromedial, 3V, third ventricle. Graphs depict the quantification of the density of DBH+ projections (B, D) and OT+ neurones (C, E) within the ventromedial (B, C) and posterior (D, E) PVN nuclei in S and T rats during the 8 experimental weeks. Values are the means of 2-4 slices/rat, 4 rats in each subgroup. Training effect (one-way ANOVA) for DBH+ projections within PVNvm:  $F_{4,15} = 11.181, P < .001$ ; for DBH+ projections within PVNpost:  $F_{4,15} = 10.391, P < .001$ ; for OT+ neurones within PVNvm:  $F_{4,15} = 14.565, P < .001$ ; for OT+ neurones within PVNpost:  $F_{4,15} = 4.664, P = .012$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for DBH+ projections within PVNvm: condition  $F_{1,8} = 14.430, P = .005$ , weeks  $F_{1,8} = 16.120, P = .004$ , interaction  $F_{1,8} = 13.191, P = .007$ ; for DBH+ projections within PVNpost: condition  $F_{1,8} = 16.312, P = .004$ , weeks  $F_{1,8} = 10.594, P = .012$ , interaction  $F_{1,8} = 17.348, P = .003$ ; for OT+ neurones within PVNvm: condition  $F_{1,8} = 17.068, P = .003$ , weeks  $F_{1,8} = 0.105, P = .755$ ; interaction  $F_{1,8} = 22.484, P = .002$ ; for OT+ neurones within PVNpost: condition  $F_{1,8} = 11.876, P = .009$ , weeks  $F_{1,8} = 1.206, P = .304$ ; interaction  $F_{1,8} = 16.724, P = .004$ . \* $P < .05$  vs  $S_0$  or  $T_0$ . † $P < .05$  vs age-matched S rats

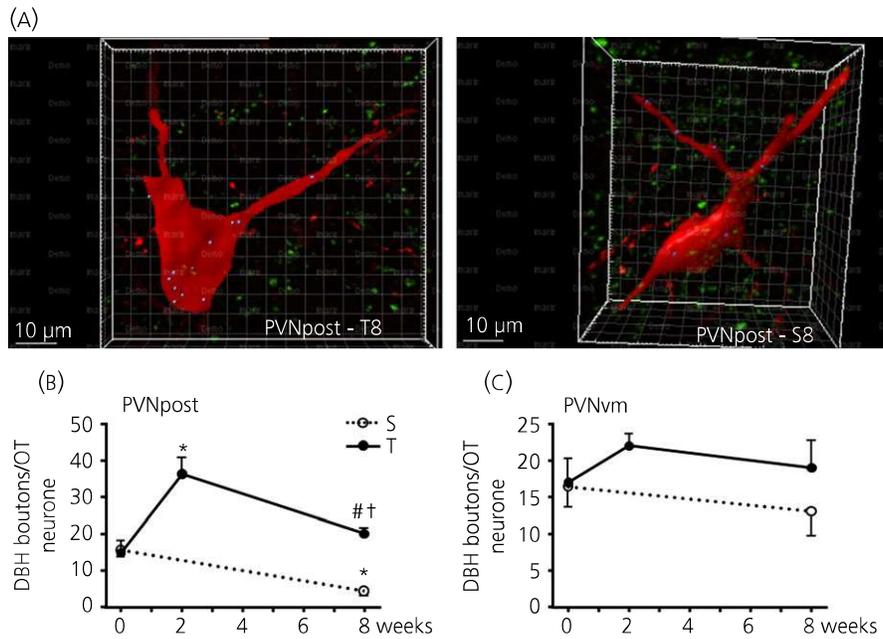
## 38 4 | DISCUSSION

39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

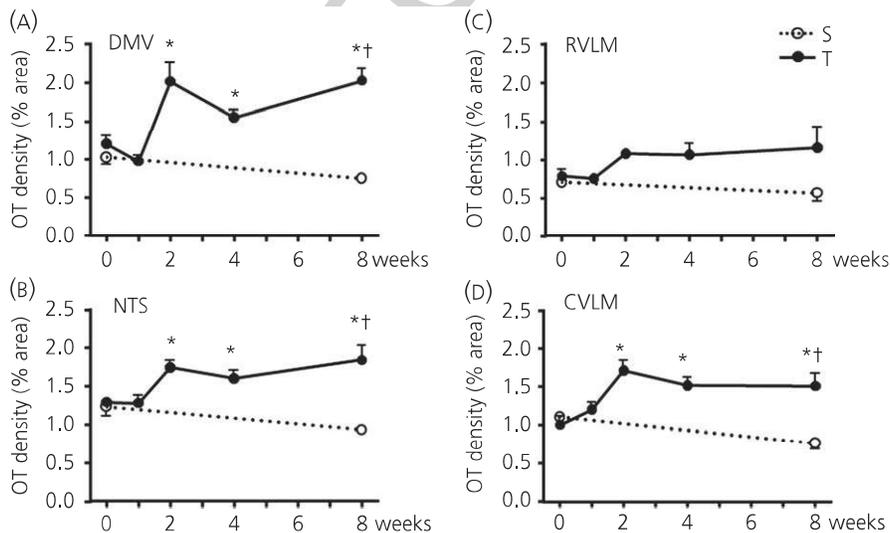
The present set of data analysing the combined effect of ageing and exercise training on autonomic control confirmed previous observations of training-induced improvement and age-dependent worsening of autonomic control, showing that deleterious remodelling of supramedullary modulatory circuitry could be detected within a short-term period, even before the appearance of autonomic dysfunction. In addition, our results indicated that both age-induced and training-induced changes in autonomic control are determined by opposed plastic changes in the reciprocal network connecting the hypothalamus to the brainstem. The novel findings of the present study are that: (i) adult rats kept sedentary for 8 weeks exhibit a reduced density of NORergic neurones ascending from the NTS and CVLM to the preautonomic OT+ neurones

in the PVN and, consequently, a diminished density of cell bodies and projections to brainstem autonomic areas; (ii) exercise training blocks these deleterious effects by increasing ascending NOR+ neurones in the NTS and CVLM, by augmenting their afferent DBH input to preautonomic PVN neurones and by inducing neuroplastic adaptive changes in both cell bodies and projections of PVN OTergergic neurones innervating preganglionic parasympathetic neurones projecting the heart; (iii) OT+ neurones located within the posterior PVN nucleus contribute to the parasympathetic control of the heart; (iv) the marked increase in OTergergic projections targeting the first synaptic relay of baroreceptors and chemoreceptors in the central nervous system suggests the ability of training to modulate the afferent signalling arising from the peripheral receptors; and (v) training-induced plastic changes in NORergic and OTergergic supramedullary pathways, by improving parasympathetic

COLOUR



**FIGURE 3** A, Three-dimensional rendered images comparing the density of overlapping boutons (blue) and those that are close, but not overlapping (green) with two oxytocin (OT)+ neurones (red) taking from the posterior paraventricular nucleus (PVN) of trained (T) and sedentary (S) rats at the 8th experimental week. post, posterior; vm, ventromedial. Graphs depict the quantification of dopamine β-hydroxylase (DBH)+ boutons overlapping OT+ neurones in the posterior (B) and ventromedial (C) PVN in S and T rats during the 8 experimental weeks. Values are the means of 6-12 neurones for areas of interest (AOIs), 3-4 AOIs/rat, 3 rats in each subgroup. Training effect (one-way ANOVA) for DBH+ boutons overlapping OT+ neurones within PVNpost:  $F_{2,29} = 16.066$ ,  $P < .001$ ; for DBH+ boutons overlapping OT+ neurones within PVNvm:  $F_{2,29} = 1.373$ ,  $P = .269$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for DBH+ boutons overlapping OT+ neurones within PVNpost: condition  $F_{1,24} = 26.626$ ,  $P < .001$ , weeks  $F_{1,24} = 4.154$ ,  $P = .052$ ; interaction  $F_{1,24} = 28.247$ ,  $P < .001$ ; for DBH+ boutons overlapping OT+ neurones within PVNvm: condition  $F_{1,34} = 1.305$ ,  $P = .261$ , weeks  $F_{1,34} = 0.130$ ,  $P = .720$ ; interaction  $F_{1,34} = 1.011$ ,  $P = .321$ . \* $P < .05$  vs  $S_0$  or  $T_0$ . # $P < .05$  vs week 2. † $P < .05$  vs age-matched S rats



**FIGURE 4** Graphs show the quantification of the density of oxytocin (OT)+ projections to the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) (A), nucleus of solitary tract (NTS) (B), rostroventrolateral medulla (RVLM) (C) and caudal ventrolateral medulla (CVLM) (D) in sedentary (S) and trained (T) rats during the 8 experimental weeks. Values are the means of 6-9 slices/rat (DMV and NTS) and 2-4 slices/rat (CVLM and RVLM), 4 rats in each subgroup. Training effect (one-way ANOVA) for DMV:  $F_{4,15} = 8.801$ ,  $P < .001$ ; for NTS:  $F_{4,15} = 5.083$ ,  $P = .009$ ; for RVLM:  $F_{4,15} = 1.789$ ,  $P = .184$ ; for CVLM:  $F_{4,15} = 5.274$ ,  $P = .007$ . Group comparison (factorial two-way ANOVA) for DMV: condition  $F_{1,8} = 33.700$ ,  $P < .001$ , weeks  $F_{1,8} = 4.727$ ,  $P = .061$ , interaction  $F_{1,8} = 18.981$ ,  $P = .002$ ; for NTS: condition  $F_{1,8} = 9.473$ ,  $P = .015$ , weeks  $F_{1,8} = 0.596$ ,  $P = .462$ , interaction  $F_{1,8} = 7.393$ ,  $P = .026$ ; for RVLM: condition  $F_{1,8} = 2.217$ ,  $P = .175$ , weeks  $F_{1,8} = 0.258$ ,  $P = .625$ ; interaction  $F_{1,8} = 1.244$ ,  $P = .297$ ; for CVLM: condition  $F_{1,8} = 4.875$ ,  $P = .058$ , weeks  $F_{1,8} = 0.332$ ,  $P = .580$ ; interaction  $F_{1,8} = 8.365$ ,  $P = .020$ . \* $P < .05$  vs  $S_0$  or  $T_0$ . † $P < .05$  vs age-matched S rats

**TABLE 4** Correlation coefficients (*r*) and *P* values of regression equations correlating training- and age-dependent changes on parasympathetic activity (HF-PI) and resting heart rate (HR) with plastic changes within the supramedullary modulatory circuitry

Brain areas	Regression equations	R value	P value
<b>Brainstem</b>			
NTS DBH+ neurones × HF-PI	$Y = 0.47x - 1.10$	.596	.002
CVLM DBH+ neurones × HF-PI	$Y = 0.36x + 0.59$	.480	.015
<b>Hypothalamus</b>			
<b>Posterior PVN</b>			
DBH+ boutons/ OT+ neurone × HF-PI	$Y = 0.13x + 2.44$	.546	.035
OT+ neurone × HF-PI	$Y = 0.15x + 2.07$	.497	.007
<b>Ventromedial PVN</b>			
DBH+ boutons/ OT+ neurone × HF-PI	$Y = 0.20x + 0.99$	.545	.020
OT+ neurone × HF-PI	$Y = 0.06x + 1.73$	.466	.011
<b>Brainstem</b>			
NTS OT terminals × HF-PI	$Y = 3.73x - 1.51$	.703	<.001
DMV OT terminals × HF-PI	$Y = 2.57x + 0.30$	.720	<.001
RVLM OT terminals × HF-PI	$Y = 2.91x + 1.30$	.509	.011
CVLM OT terminals × HF-PI	$Y = 2.90x + 0.14$	.532	.007
<b>Brainstem</b>			
NTS DBH+ neurones × resting HR	$Y = -3.42x + 432$	-.463	.023
CVLM DBH+ neurones × resting HR	$Y = -3.53x + 426$	-.492	.015
<b>Hypothalamus</b>			
<b>Posterior PVN</b>			
DBH+ boutons/OT+ neurone × resting HR	$Y = -1.33x + 415$	-.580	.030
OT+ neurone × resting HR	$Y = -1.48x + 418$	-.483	.011
<b>Ventromedial PVN</b>			
DBH+ boutons/OT+ neurone × resting HR	$Y = -1.70x + 421$	-.534	.027
OT+ neurone × resting HR	$Y = -0.62x + 424$	-.530	.003
<b>Brainstem</b>			
NTS OT terminals × resting HR	$Y = -32.0x + 441$	-.653	<.001
DMV OT terminals × resting HR	$Y = -21.0x + 424$	-.646	<.001
RVLM OT terminals × resting HR	$Y = -22.8x + 417$	-.447	.029
CVLM OT terminals × resting HR	$Y = -22.1x + 424$	-.434	.034

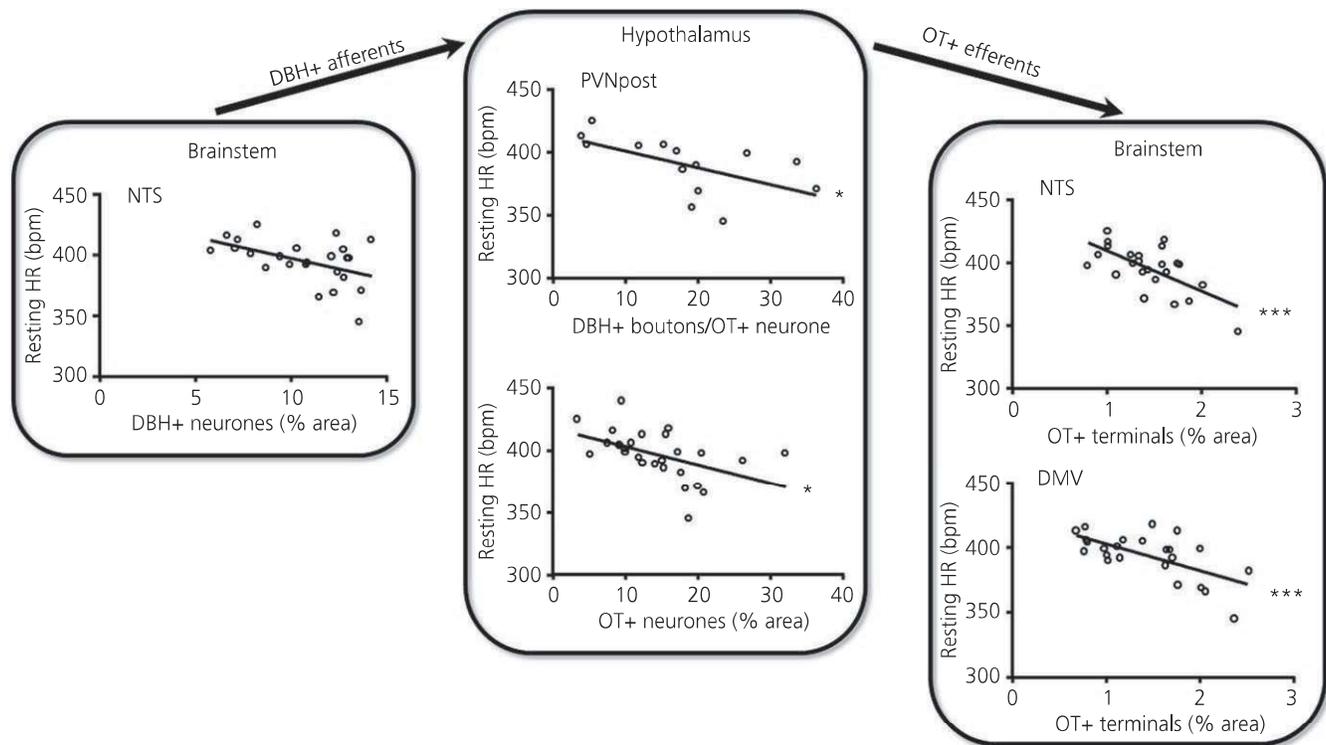
CVLM, caudal ventrolateral medulla; NTS, nucleus of the solitary tract; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; RVLM, rostroventrolateral medulla. These analyses involved all time points analysed during the 8-week protocols. Correlations with DBH and OT expression data were made with 24-29 observations per area, 3-4 rats per group; correlations with DBH boutons/OT+ neurone were averaged per rat and correspond to 14-17 observations per area, 3 rats per group.

modulation of the heart, antagonise age-dependent autonomic dysfunction and reduce the resting HR in healthy control rats.

Deleterious changes in autonomic control are not only characteristic of several pathologies, but also are present in the normal ageing process.<sup>15-17,22,35</sup> In the present study, we showed, in control rats, that even a short-term period (from 2 to 4 months old) was accompanied by a trend to augment sympathetic activity and to decrease parasympathetic modulation of the heart. Importantly, we demonstrated that these slight changes on autonomic control occurred simultaneously with a significant decrease in NORergic afferent

signalling ascending to the PVN and with deleterious remodelling of OTergeric pathways from the PVN to brainstem areas involved in cardiovascular control. These results suggest that age-induced remodelling of the modulatory circuitry precedes and triggers the establishment of autonomic deficits.

Importantly, our results in age-matched rats submitted to low-to-moderate aerobic training confirmed that repetitive exercise blocked and reversed the age-dependent remodelling of the PVN supramedullary integrative circuitry. Although the present set of data provided only correlational and not direct proof of the involvement

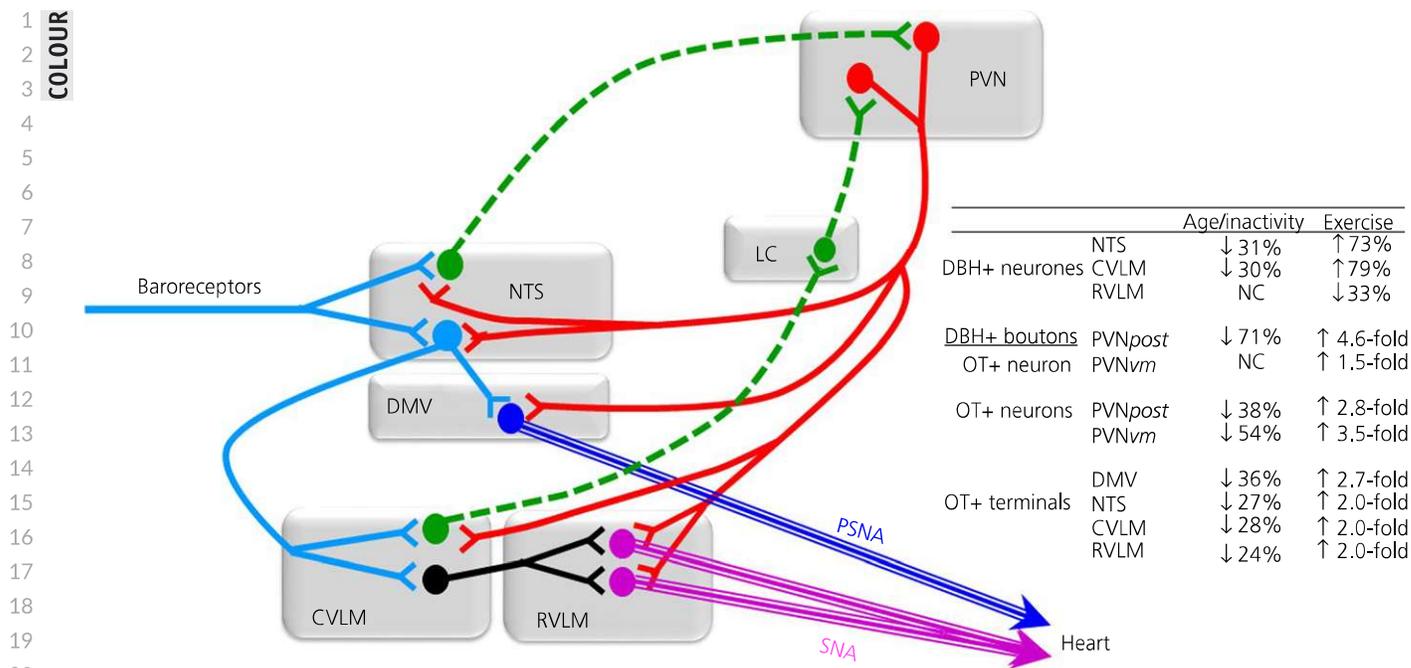


**FIGURE 5** Correlations between resting heart rate (HR) and plastic changes in different components of supramedullary circuitry modulating HR control. Resting HR values are negatively correlated with the density of nucleus of solitary tract (NTS) dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)+ neurones and their terminals overlapping oxytocin (OT)+ neurones within the posterior paraventricular nucleus (PVN) and with the preautonomic OT+ neurones and their projections to the nucleus of solitary tract (NTS) and dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) in the brainstem. Regression equations, correlation coefficients and *P* values are presented in Table 4. \**P* < .05 and \*\*\**P* < .001 denote a significant correlation

of this integrative circuitry in the parasympathetic control of the heart, our previous studies have shown that activation of PVN OT+ neurones projecting to the NTS/DMV area augments reflex bradycardia during transient pressure increases<sup>11</sup> and reduces the tachycardic response during an acute bout of exercise.<sup>10,36</sup> Exercise training also augments OT expression within both PVN and dorsal brainstem areas, increases the excitability of PVN preautonomic neurones projecting to the NTS/DMV area and facilitates the appearance of resting bradycardia in hypertensive and normotensive control rats.<sup>20,34,37</sup> We showed that these effects are mediated by vagal outflow to the heart because the bradycardic response to OT administered into the NTS was blocked by atropine (not atenolol) given i.v.<sup>11,14</sup> Supporting the above proposition, the data obtained in the present study indicated that the majority of OT projections to the brainstem were directed to the DMV (where the cell bodies of vagal pre-ganglionic fibres are located) and that this nucleus exhibited the major difference in OT+ terminals between trained and sedentary rats at the end of protocols.

Our data also indicated that plastic and functional training-induced changes in the PVN-brainstem OT pathway are driven by afferent NORergic signalling arising from the NTS and CVLM. A landmark neuronal tract tracing study by Sawchenko and Swanson<sup>2</sup> has already shown that ascending projections from the brainstem to PVN were predominantly NORergic and originated in the NTS/

DMV complex (monosynaptic connection between A2 neurones and parvocellular PVN nuclei) and CVLM (polysynaptic connections between A1 neurones and magnocellular & parvocellular PVN nuclei), which are the same areas in which training increased the density of DBH+ neurones. We also observed that those DBH+ neurones projecting to PVNpost (an important preautonomic nuclei for cardiovascular control) exhibited a reduced density of DBH+ boutons overlapping OT+ neurones in rats kept sedentary but a large increment in trained rats. We could not determine whether those projections arise from NTS and/or CVLM, although, based on the observations of Sawchenko and Swanson,<sup>2</sup> it is possible that the majority of these projections originated in the NTS. This proposition is reinforced by previous observation that sinoaortic denervation, knocking down the afferent signalling carried by arterial baroreceptors and chemoreceptors, not only reduced the basal OT density within PVN preautonomic nuclei, but also abrogated training-induced plastic changes of OTergetic pathways.<sup>20,21</sup> Indeed, the NTS, which receives all afferent signalling originating in the peripheral receptors, is the main source of information ascending from brainstem to the PVN. Consistent with the observations of Sawchenko and Swanson,<sup>2</sup> the density of DBH+ neurones in the RVLM (the origin of premotor neurones projecting to the spinal cord) was not changed in S rats and was reduced (not augmented) by exercise training.



**FIGURE 6** Schematic drawing of brainstem and hypothalamic pathways involved in bulbar and supramedullary integration of autonomic control of the heart driven by baroreceptor afferent signalling. CVLM, caudal ventrolateral medulla; DMV, dorsal motor nucleus of the vagus; LC, locus ceruleus; NTS, nucleus of the solitary tract; PSNA, parasympathetic nerve activity; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; RVLM, rostral ventrolateral medulla; SNA, sympathetic nerve activity. Light blue represents the glutamatergic excitatory projections in the brainstem arising from baroreceptors; green indicates ascending DBH+ projections from brainstem to PVN; red represents oxytocin (OT)+ descending projections from PVN to brainstem nuclei; dark blue indicates preganglionic vagal neurones projecting to the heart and pink indicated premotor sympathetic neurones. The table on the right summarises plastic changes within the supramedullary modulatory circuitry observed in adult sedentary rats during 8 months of inactivity and the difference exhibited by trained rats at the end of protocols compared to age-matched sedentary controls. NC, no change

In previous studies, we also provided functional evidence suggesting that exercise training, besides increasing the density of OT neurones in the PVN, specifically augmented the excitability of preautonomic (not magnocellular) OT neurones projecting to the NTS/DMV.<sup>20,21,37</sup> These effects were accompanied by an improvement of baroreflex control, reduced exercise tachycardia and resting bradycardia, without changing the pressure levels.<sup>20,23,36</sup> The present set of data, indicating that training increased the spontaneous baroreflex sensitivity and reduced baseline HR with no change in MAP, ratified the above observations. In addition, the data highlight the crucial role played by the posterior PVN subnucleus in the modulation of HR control and confirm that these effects are a result of an improved OT modulation of parasympathetic activity. Indeed, both the HF component of PI variability and resting HR are positively and negatively correlated, respectively, with all plastic changes observed: remodelling of DBH afferents to hypothalamus, the increased density of preautonomic PVN OT neurone cell bodies and their efferent projections to brainstem areas. Although we did not measure the parasympathetic tonus to the heart and, instead, only measured an index of parasympathetic variability, we showed previously that the slowdown of the heart during activation of NTS/DMV OT receptors was mediated by increased vagal outflow.<sup>11,14,34</sup> Importantly, training-induced plastic remodelling of afferent and

efferent arms of supramedullary circuitry was highly effective with respect to improving vagal activity, therefore opposing the age-induced autonomic dysfunction.

Interestingly, training augmented OT projections not only to the DMV and RVLM, comprising the origin of vagal and sympathetic projections to the heart, but also to the NTS and CVLM, whose NORergic neurones ascend to the PVN. These reciprocal projections represent a short-loop modulatory circuitry that is able to control the peripheral information ascending to the hypothalamus. In this regard, Peters et al.<sup>38</sup> provided evidence indicating that, within the NTS, OT acts on a subset of second-order neurones to enhance visceral afferent synaptic transmission. There are no studies in the CVLM, although a modulatory mechanism such as this could also be operating at that level. Similar to our RVLM findings, Biancardi et al.<sup>9</sup> reported that OT was the predominant neuropeptide in PVN neurones innervating the RVLM and that PVN OT neurones densely project to this area. Biancardi et al.<sup>9</sup> also reported that those neurones received both GABAergic and glutamatergic inputs and that the inhibitory/excitatory balance on neuronal activity could be altered by pathological conditions such as hypertension. There is no information available regarding the functional effects of OT activation in the RVLM and it is not known whether exercise was able to alter excitatory/inhibitory inputs to those neurones. The precise underlying mechanisms and/or the functional effects induced by the

1 activation of OT projections to the RVLM (and CVLM) remain to be  
2 determined.

3 One caveat of the present study is that we did not use retro-  
4 grade tracing to confirm that PVN OT+ neurones are preautonomic  
5 neurones. However, considering that (i) the main source for oxyto-  
6 cinergic innervation within the dorsovagal complex is the parvocel-  
7 lular PVN;<sup>3,4</sup> (ii) the measurements of both OT immunofluorescence  
8 and DBH+ boutons contacting OT+ neurones were made within the  
9 posterior and ventromedial PVN, which are 2 important parvocel-  
10 lular subnuclei for cardiovascular control;<sup>4,30</sup> and (iii) our previous  
11 functional studies show that exercise training augments the ex-  
12 pression of PVN-NTS/DMV OTergic pathways and increases the  
13 excitability of preautonomic PVN neurones projecting to these  
14 brainstem areas,<sup>20,21,34,37</sup> as well as augments reflex bradycardia<sup>11</sup>  
15 and reduces exercise tachycardia<sup>10,36</sup> by increasing vagal outflow to  
16 the heart,<sup>11,14</sup> it is highly possible that PVN OTergic neurones are  
17 preautonomic ones.

18 Figure 6 illustrates both bulbar and supramedullary circuitries  
19 involved in HR control and summarises the main findings of the  
20 present study. In conclusion, our data indicate that age and repet-  
21 itive aerobic exercise induce opposite plastic changes in ascending  
22 NORergic and descending OTergic hypothalamic pathways mod-  
23 ulating the autonomic control of the heart. Although deleterious  
24 remodelling becomes evident in short periods of a sedentary life  
25 style, exercise training promptly increases beneficial neuroplastic  
26 adaptive changes within the brainstem-PVN reciprocal network and  
27 augments parasympathetic modulation of the heart, therefore abro-  
28 gating age-dependent autonomic dysfunction.

### 30 ACKNOWLEDGEMENTS

31 This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do  
32 Estado de São Paulo (FAPESP, grants number 11/15676-4 [fel-  
33 lowship to CRS], 11/51410-9 and 15/24935-4 [research grants  
34 to LCM]), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
35 Superior CAPES (fellowship to CRS) and Conselho Nacional  
36 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grants  
37 304060/2011-9 and 305940/2015-5, research fellow to LCM).

### 40 CONFLICT OF INTERESTS

41 The authors declare that there are no potential conflicts of interest  
42 with respect to the research, authorship and/or publication of this  
43 article.

### 46 AUTHOR CONTRIBUTIONS

47 CRS participated in the research design, performed the research,  
48 acquired and interpreted data, and wrote the manuscript. AR and  
49 AC performed the research, and acquired and interpreted data. LCM  
50 conceived, designed and coordinated the research, and also wrote  
51 and revised the manuscript.

### ORCID

L. C. Michelini  <http://orcid.org/0000-0003-2978-5406>

### REFERENCES

1. Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, van Leeuwen FW. Intra- and extra-hypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* 1978;186:423-433.
2. Sawchenko PE, Swanson LW. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science.* 1981;214:685-687.
3. Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem Suppl.* 1981;24:79-95.
4. Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1982;205:260-272.
5. Kalia M, Fuxe K, Goldstein M. Rat medulla oblongata. II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol.* 1985;233:308-332.
6. Kalia M, Woodward DJ, Smith WK, Fuxe K. Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. *J Comp Neurol.* 1985;233:350-364.
7. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev.* 2009;89:535-606.
8. Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology.* 1980;31:410-417.
9. Biancardi VC, Campos RR, Stern JE. Altered balance of gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic afferent inputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of renovascular hypertensive rats. *J Comp Neurol.* 2010;518:567-585.
10. Braga DC, Mori E, Higa KT, Morris M, Michelini LC. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1474-R1482.
11. Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R537-R545.
12. Michelini LC, Bonagamba LG. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension.* 1988;11:175-179.
13. Duffloth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol.* 1997;273:R1271-R1282.
14. Michelini LC. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic preautonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Physiol Pharmacol.* 2007;34:369-376.
15. De Meersman RE, Stein PK. Vagal modulation and aging. *Biol Psychol.* 2007;74:165-173.
16. Kaye DM, Esler MD. Autonomic control of the aging heart. *Neuromolecular Med.* 2008;10:179-186.
17. Corbett EK, Mary DA, McWilliam PN, Batten TF. Age-related loss of cardiac vagal preganglionic neurones in spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2007;92:1005-1013.

- 1 18. Minami N, Head GA. Relationship between cardiovascular hyper-  
2 trophy and cardiac baroreflex function in spontaneously hyperten-  
3 sive and stroke-prone rats. *J Hypertens*. 1993;11:523-533.
- 4 19. Minami N, Head GA. Cardiac vagal responsiveness during de-  
5 velopment in spontaneously hypertensive rats. *Auton Neurosci*.  
6 2000;82:115-122.
- 7 20. Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordão MT, Ceroni A, Michelini LC.  
8 Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and  
9 mediates training-induced plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp*  
10 *Physiol*. 2011;301:R958-R966.
- 11 21. Cruz JC, Cavalleri MT, Ceroni A, Michelini LC. Peripheral che-  
12 moreceptors mediate training-induced plasticity in paraventric-  
13 ular nucleus pre-autonomic oxytocinergic neurons. *Exp Physiol*.  
14 2013;98:386-396.
- 15 22. Masson GS, Costa TS, Yshii L, et al. Time-dependent effects of  
16 training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive  
17 rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex  
18 sensitivity. *PLoS ONE*. 2014;9:e94927.
- 19 23. Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of  
20 baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular ad-  
21 justments in normotensive and spontaneously hypertensive rats.  
22 *Exp Physiol*. 2009;94:630-640.
- 23 24. Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL,  
24 Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments in-  
25 duced by exercise training in female spontaneously hypertensive  
26 rats? *Hypertension*. 2008;52:514-521.
- 27 25. Silva SD Jr, Zampieri TT, Ruggeri A, et al. Downregulation of the  
28 vascular renin-angiotensin system by aerobic training – focus on  
29 the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes. *Circ J*.  
30 2015;79:1372-1380.
- 31 26. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological in-  
32 terpretation, and clinical use. Task Force of the European Society  
33 of Cardiology and the North American Society of Pacing and  
34 Electrophysiology. *Eur Heart J*. 1996;17:354-381.
- 35 27. Laude D, Elghozi JL, Girard A, et al. Comparison of various tech-  
36 niques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity  
37 (the EuroBaVar study). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.  
38 2004;286:R226-R231.
- 39 28. Martelli D, Silvani A, McAllen RM, May CN, Ramchandra R. The low  
40 frequency power of heart rate variability is neither a measure of  
41 cardiac sympathetic tone nor of baroreflex sensitivity. *Am J Physiol*  
42 *Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1005-H1012.
- 43 29. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6 ed.  
44 New York, NY: Academic Press; 2009.
- 45 30. Higa-Taniguchi KT, Silva FC, Silva HM, Michelini LC, Stern JE.  
46 Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus  
47 (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats.  
48 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R1717-R1727.
- 49 31. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulat-  
50 ing the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74:323-364.
- 51 32. Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the  
52 baroreceptor reflex pathway. *News Physiol Sci*. 1994;9:243-246.
- 53 33. Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in cen-  
tral autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*.  
2009;94:947-960.
34. Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S, Michelini LC. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension*. 2005;46:1.
35. Chaar LJ, Alves TP, Batista Junior AM, Michelini LC. Early training-induced reduction of angiotensinogen in autonomic areas—the main effect of exercise on brain renin-angiotensin system in hypertensive rats. *PLoS ONE*. 2015;10:e0137395.
36. Higa-Taniguchi KT, Felix JVC, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Exp Physiol*. 2009;94:1103-1113.
37. Jackson K, Silva HM, Zhang W, Michelini LC, Stern JE. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol*. 2005;94:3211-3220.
38. Peters JH, McDougall SJ, Kellett DO, Jordan D, Llewellyn-Smith IJ, Andresen MC. Oxytocin enhances cranial visceral afferent synaptic transmission to the solitary tract nucleus. *J Neurosci*. 2008;28:11731-11740.

**How to cite this article:** Santos CR, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC. Exercise training abrogates age-dependent loss of hypothalamic oxytocinergic circuitry and maintains high parasympathetic activity. *J Neuroendocrinol*. 2018;e12601. <https://doi.org/10.1111/jne.12601>