ADRIANA RUGGERI

EVOLUÇÃO TEMPORAL DOS EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE O CONTEÚDO DE ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO E GLUTAMATO EM ÁREAS DE CONTROLE AUTONÔMICO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2011

ADRIANA RUGGERI

EVOLUÇÃO TEMPORAL DOS EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE O CONTEÚDO DE ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO E GLUTAMATO EM ÁREAS DE CONTROLE AUTONÔMICO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana
Orientadora: Profª Drª Lisete Compagno Michelini
Versão Original

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Ruggeri, Adriana.

Evolução temporal dos efeitos do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de ácido γ-aminobutírico e glutamato em áreas de controle autonômico de ratos normotensos e hipertensos / Adriana Ruggeri. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Lisete Compagno Michelini.

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

Versão do título para o inglês: Temporal evolution of the effects of aerobic training on the content of γ-aminobutyric acid and glutamate in areas of autonomic control of normotensive and hypertensive rats.

Descritores: 1. Treinamento físico 2. Hipertensão 3. Fisiologia cardiovascular 4. Expressão gênica 5. Imunofluorescência em animal I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0206/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adriana Ruggeri.

Título da Dissertação: Evolução temporal dos efeitos do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de ácido γ-aminobutírico e glutamato em áreas de controle autonômico de ratos normotensos e hipertensos.

Orientador(a): Lisete Compagno Michelini.

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome completo: .....
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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **142** nas fls. **78** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Lisete Compagno Michelini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos seqüenciais do treinamento físico e do treinamento físico associado à hipertensão sobre a expressão/funcionalidade de neurônios gabaérgicos e glutamatérgicos em áreas de controle autonômico** do qual participou(aram) o(s) alunos **Adriana Ruggeri, Thais Tessari Zampieri, Sebastião Donato Silva Júnior, Laiali Jurdi El Chaar,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **20.10.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de outubro de 2009.

Prof.Dr. Ari...
Dpto. de Para...
ICB - USP
asilber@usp.br

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

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico aos meus pais, irmãos e a toda minha família,
os quais estiveram sempre presentes em todos os momentos
e me apoiaram e incentivaram incansavelmente,
para que eu fizesse as melhores escolhas...

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini** por todo carinho, orientação, incentivo e ensinamentos que ultrapassaram o âmbito acadêmico.

Aos meus colegas do **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB/USP)** por todo apoio, em especial à Thais, ao Junoca e Carlinha, por toda convivência e por todos os ensinamentos. Formamos uma bela equipe!

À **CNPq e FAPESP** por financiar e auxiliar na realização deste trabalho.

Ao meus pais **Vera** e **Cláudio** por todo amor, carinho, incentivo, compreensão e pelos esforços ilimitados.

Aos meus irmãos, **Leonardo**, **Flávia** e **Hermano**, que sempre me deram força e foram muito pacientes em diversos momentos.

À minha "irmã", **Valéria,** por todo carinho e por todo apoio dado no meu dia à dia.

Ao **Marcelo**, meu companheiro, por amar, compreender, incentivar e estar ao meu lado à todo o momento.

Aos meus **amigos**, por fazerem parte desta conquista, cada um com seu jeitinho.

“Não importa o quanto sabemos, nunca é o suficiente.
Mas tudo bem, porque a cada dia, a cada nova experiência,
ganhamos novas oportunidades de descoberta e crescimento.
Essa escola está sempre em aula, e a vida nos desafia
a que nos destaquemos por sermos ao mesmo tempo
alunos entusiasmados e professores inspirados”
H. Jackson Brown, Jr.

RESUMO

RUGGERI, Adriana. **Evolução temporal dos efeitos do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de ácido γ-aminobutírico e glutamato em áreas de controle autonômico de ratos normotensos e hipertensos.** 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A hipertensão arterial cursa com hiperativação de neurônios glutamatérgicos (GLUérgicos, excitatórios) e depressão de neurônios gabaérgicos (GABAérgicos, inibitórios) em áreas centrais de controle autonômico. Por outro lado, o treinamento aeróbio de baixa à moderada intensidade (T) tem sido indicado como uma potente ferramenta para reduzir a hipertonia simpática do hipertenso. No presente trabalho, avaliamos em hipertensos espontâneos (SHR) e seus controles normotensos (WKY) os efeitos temporais do T sobre a expressão/funcionalidade das vias GABAérgicas e GLUérgicas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo do trato solitário (NTS) e bulbo ventrolateral rostral (RVLM), correlacionando-as a dados hemodinâmicos. SHR e WKY (2 meses de idade) foram submetidos ao T (50-60% da capacidade máxima de exercício, 1 hora/dia, 5 dias/semana) ou mantidos sedentários (S) por 3 meses. Os ratos foram nas semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 12 canulados para o registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) basais, e em seguida anestesiados e perfundidos (salina) para a remoção do encéfalo. "Punches" foram obtidos do PVN, região dorsal e ventral do tronco encefálico (abrangendo NTS e RVLM, respectivamente) e processados para expressão gênica de GAD65, GAD67 e VGlut2 (RT-PCR em tempo real, HPRT como gene de referência). Outros ratos dos mesmos grupos foram perfundidos com paraformaldeído 4% e as regiões hipotalâmicas e bulbar processadas para expressão protéica (imunofluorescência para GAD65, GAD67 e VGlut2). SHRs *vs* WKYs apresentavam elevada PAM e FC (177±2 mmHg e 379±3 b/min) e níveis elevados de RNAm de GAD67 no NTS (+ 72%). Observamos bradicardia de repouso (-8% a -10%, a partir de T_2 nos SHR e de T_8 nos WKY) e redução da PAM apenas nos SHR (-5% a partir de T_8). T determinou nos WKY aumentos na expressão de RNAm de GAD65 no PVN (T_2 a T_8) e RVLM (T_8) e de GAD67 no NTS (T_{12}) e RVLM (T_8). Nos SHR T foi acompanhado de aumento precoce de RNAm de GAD65 no PVN (T_2) e elevação mais tardia no RVLM (T_8), por aumento da expressão de GAD67 no RVLM (T_2) e por redução da elevada expressão de GAD67 no NTS (T_1 a T_{12}). Houve também aumento transitório não mantido do GAD67 no PVN (T_1). Em ambos os grupos aumento na expressão de GAD induzida pelo T correlacionava-se com a redução da FC basal dos indivíduos treinados ($p<0,05$). Com exceção da queda de RNAm no NTS e da elevação no RVLM de SHR, o T não determinou alterações significativas na expressão de VGlut2. T também determinou aumento da razão inibição GABAérgica/excitação GLUérgica nos WKY e evitou a redução desta razão nos SHR. Alterações nas expressões gênicas foram confirmadas por alterações similares na expressão protéica de GAD65, GAD67 e VGlut2 nas diferentes áreas autonômicas. Nossos dados indicam, portanto, que o aumento da inibição GABAérgica essencialmente no PVN de WKY e SHR treinados é um fator determinante para a instalação da bradicardia de repouso. Indicam ainda que o T potencializa a inibição GABAérgica nos normotensos e evita sua redução nos hipertensos.

Palavras-chave: Treinamento físico. Hipertensão. GAD65. GAD67. VGlut2. NTS. PVN. RVLM.

ABSTRACT

RUGGERI, Adriana. **Temporal evolution of the effects of aerobic training on the content of γ-aminobutyric acid and glutamate in areas of autonomic control in normotensive and hypertensive rats**. 2011. 101 f. Master`s thesis (Human Physiology). Biomedical Sciences Institute University of São Paulo, São Paulo, 2011.

Hypertension is accompanied by hyperactivity of glutamatergic (GLUergic, excitatory) and depression of gabaergic (GABAergic, inhibitory) neurons in autonomic areas driving the cardiovascular control. On the other hand low- to moderate-intensity aerobic training (T) is an important tool for reducing sympathetic hyperactivity. In this study we investigate the time-course changes on cardiovascular parameters and on the expression/activity of GABAergic and GLUergic pathways in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), the nucleus of solitary tract (NTS) and the rostroventrolateral medulla (RVLM) is sedentary (S) and trained (T) spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive control rats (WKY). Male SHR and WKY aged 2 month were submitted to T (50-60% of maximal exercise capacity, 1h/day, 5 days/week) or kept S for 3 month. On weeks 0, 1, 2, 4, 8 and 12 rats were cannulated for blood pressure (BP) and heart rate (HR) recordings and then perfused (saline) for brain removal. Hypothalamic and dorsal and ventral brain stem punches (directed to PVN, NTS and RVLM) were obtained and processed for GAD65, GAD67 and VGlut2 mRNA expression (Real Time PCR, HPRT as the reporter gene). Other rats were perfused with 4% paraformaldehyde and hypothalamic and brains stem areas processed for immunofluorescence (GAD65, GAD67 and VGlut2 protein expression). SHRs *vs* WKYs exhibited elevated BP and HR (177±2 mmHg, 379±3 b/min) and high GAD67 mRNA levels within the NTS (+ 72%). T caused resting bradycardia (- 8% to -10%) significant at T_2 (SHR) and T_8 (WKY) and BP fall only in SHR (- 5% at T_8). In the WKY, T also increased both GAD65 mRNA expression (PVN at T_2-T_8; RVLM at T_8) and GAD67 mRNA expression (RVLM at T_8, NTS at T_{12}). In the SHR, T was accompanied by either precocious increase of GAD65 mRNA in the PVN (T_2), late increase in the RVLM (T_8), by increased expression of GAD67 in the RVLM (T_2) and by reduction of the elevated expression of GAD67 within the NTS (T_1 to T_{12}). There was also a transient (T_1), not maintained increase of GAD67 in PVN. In both groups, T-induced increase of GAD expression was correlated with baseline HR reduction in trained rats ($p<0,05$). With exception of NTS (fall) and RVLM (increase), there was no T-induced changes in VGlut2 mRNA expression in the SHR. T also caused augmentation of GABAergic inhibition/GLUergic excitation ratio in the WKY, and blocked the reduction of this ratio in the SHR. Gene expression changes were confirmed by similar changes in GAD65, GAD67 and VGlut2 protein expression in all autonomic areas. Our data indicated that increased GABAergic inhibition within the PVN of trained WKY and SHR is a main factor determining the appearance of resting bradycardia. Data also showed that T potentiates GABAergic inhibition in normotensive rats and blocks its reduction in hypertensive rats.

Key words: Physical training. Hypertension. GAD65. GAD67. VGlut2. NTS. PVN. RVLM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxa de mortalidade por doença cardiovascular e suas diferentes causas no Brasil, em 2007.....17

Figura 2. Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares.....21

Figura 3. Formação dos neurotransmissores GABA e glutamato.....27

Figura 4. Posicionamento do corte coronal ao nível do óbex, para localização do DBS e do VBS.....36

Figura 5. Posicionamento do corte coronal na região do hipotálamo, para localização do PVN.....36

Figura 6. Evolução temporal no desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço) durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....43

Figura 7. Efeito do treinamento (T) ou sedentarismo (S) sobre o ganho de capacidade física dos animais.....44

Figura 8. Evolução temporal da FC basal durante o treinamento em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....46

Figura 9. Evolução temporal PA basal durante o protocolo de treinamento em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....47

Figura 10. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de GAD65 no PVN, DBS e VBS em WKY e SHR.....50

Figura 11. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de GAD67 no PVN, DBS e VBS em WKY e SHR.....50

Figura 12. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS em WKY e SHR.....51

Figura 13. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.....53

Figura 14. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....53

Figura 15. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....54

Figura 16. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD65 no PVN medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}) 55

Figura 17. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD65 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}).....56

Figura 18. Imunofluorescência para GAD65 no PVN e RVLM em neurônios GABAérgicos.....57

Figura 19. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD67 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.....59

Figura 20. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD67 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....60

Figura 21. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD67 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....61

Figura 22. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD67 no NTS caudal de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}). 62

Figura 23. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD67 no NTS medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}).....63

Figura 24. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD67 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0 , T_8 e T_{12}).....64

Figura 25. Imunofluorescência para GAD67 no NTS e RVLM em neurônios GABAérgicos.....65

Figura 26. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.....67

Figura 27. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....68

Figura 28. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.....69

Figura 29. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para VGlut2 no PVN de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}).....70

Figura 30. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para VGlut2 no NTS caudal de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}).....71

Figura 31. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para VGlut2 no NTS medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}) 72

Figura 32. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para VGlut2 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio (S_0, T_8 e T_{12}) 73

Figura 33. Imunufluorescência para VGlut2 no RVLM em neurônios GLUérgicos.....74

Figura 34. Comparação das razões entre expressão de GAD65/ VGlut2 e de GAD67/VGlut2 no PVN, no DBS e no VBS, durante o protocolo de treinamento, em WKY e SHR.....78

Figura 35. Correlações entre a expressão relativa de GAD65 e GAD67 em diferentes áreas autonômicas e os respectivos valores de FC basal durante o protocolo de treinamento em WKY e SHR.....80

Quadro 1. Grupos experimentais divididos por linhagem (WKY e SHR), tratamento (S ou T) e tempo (0, 1, 2, 4, 8 e 12 semanas).....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers para HPRT, GAD65, GAD67 e VGlut2 com suas respectivas temperaturas de anelamento (TM), tamanho do fragmento (Amplicom, em pares de bases).....38

Tabela 2. Anticorpos primários, suas especificações e diluições utilizadas.....39

Tabela 3. Anticorpos secundários, suas especificações e diluições utilizadas.....40

Tabela 4. Valores obtidos nos testes de esforços máximos em esteira, durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....42

Tabela 5. Valores basais de PA e FC basais durante o protocolo de treinamento ou sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....45

Tabela 6. Eficiência e coeficiente de correlação (R^2) obtidos nos testes dos primers do GAD65, GAD67, HPRT e VGlut2 no PVN, DBS e VBS.....48

Tabela 7. Valores basais da expressão de RNAm de GAD65, GAD67 e VGlut2 em PVN, DBS e VBS, de WKY e SHR.....49

Tabela 8. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de GAD65, no PVN, DBS e VBS induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.....52

Tabela 9. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de GAD67, no PVN, DBS e VBS induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.....58

Tabela 10. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de VGlut2, no PVN, DBS e VBS induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.....66

Tabela 11. Alterações temporais induzidas pelo treinamento na razão entre expressão de RNAm de GAD65/expressão de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR.....75

Tabela 12. Alterações temporais induzidas pelo treinamento na razão entre expressão de RNAm de GAD67/expressão de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR.....77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAérgico – catecolaminérgico

cDNA – DNA complementar

CVLM – bulbo ventrolateral caudal

DBS – parte dorsal do tronco encefálico

DMV – núcleo dorso motor do vago

DNA – ácido desoxirribonucléico

FC – frequência cardíaca

GABA – ácido gamma-aminobutírico

GABAérgico- gabaérgico

GLUérgico- glutamatérgico

HPRT – "hipoxantina-guanina fosforibosil transferase"

IML- coluna intermédio lateral da medula espinhal

NA - núcleo ambíguo

NORérgico – noradrenérgico

NTS - núcleo do trato solitário

OT - ocitocina

OTérgico – ocitocinérgico

OT_R – receptor de ocitocina

PA – pressão arterial

PAM- pressão arterial média

PB – "phosphate buffer"

PBS – "phosphate buffered-saline"

PCR – "polimerase chain reaction"

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

RVLM – bulbo ventrolateral rostral

S – sedentário

SNA- Sistema Nervoso Autônomo

SHR – "Spontaneously Hypertensive Rat"

SNC – sistema nervoso central

SON – núcleo supraótico

T – treinado

VBS – parte ventral do tronco encefálico

VP – vasopressina

VPérgico – vasopressinérgico

WKY –" Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 17

1.1 Hipertensão X treinamento aeróbio 17

1.2 O SNA no controle da PA 19

1.3 Modulação do controle autonômico durante exercício 20

1.4 Exercício X modulação autonômica na hipertensão 23

1.5 Neurônios GABAérgicos e GLUérgicos 25

1.6 Vias GABAérgicas e GLUérgicas na hipertensão e treinamento aeróbio 28

2 OBJETIVOS 31

3 MATERIAIS E MÉTODOS 32

3.1 Animais Experimentais 32

3.2 Protocolos de Treinamento Físico e Sedentarismo 32

3.3 Grupos experimentais 34

3.4 Canulação Arterial e Registro Direto da PA e FC 34

3.5 Técnica de PCR em Tempo Real 35

3.5.1 Obtenção do tecido encefálico 35

3.5.2 Extração do RNAtotal, síntese do cDNA e real time 36

3.6 Gene de referência escolhido 37

3.7 Primers utilizados e seus testes de linearidade e eficiência 37

3.8 Técnica de Imunofluorescência 38

3.9 Análise Estatística 41

4 RESULTADOS 42

4.1 Avaliação do desempenho em esteira 42

4.2 Alterações Temporais de PA e FC basais induzidas pelo treinamento 45

4.3 Testes de linearidade e eficiências dos primers **48**

4.4 Expressões basais de GAD65, GAD67 e VGlut2 em áreas de controle autonômico em normotensos e hipertensos **49**

4.5 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de GAD65, GAD67 e VGlut2 em áreas autonômicas **51**

4.5.1 Expressão gênica e protéica do GAD65 ..... *51*

4.5.2 Expressão gênica e protéica do GAD67 ..... *58*

4.5.3 Expressão gênica e protéica de VGlut2 ..... *66*

4.6 Relação entre inibição GABAérgica e excitação GLUérgica em áreas autonômicas **75**

4.6.1 Razão entre GAD65/VGlut2 ..... *75*

4.6.2 Razão entre GAD67/VGlut2 ..... *76*

4.7 Correlação entre a expressão relativa de GAD e FC basal **79**

5 DISCUSSÃO **81**

6 CONCLUSÕES **89**

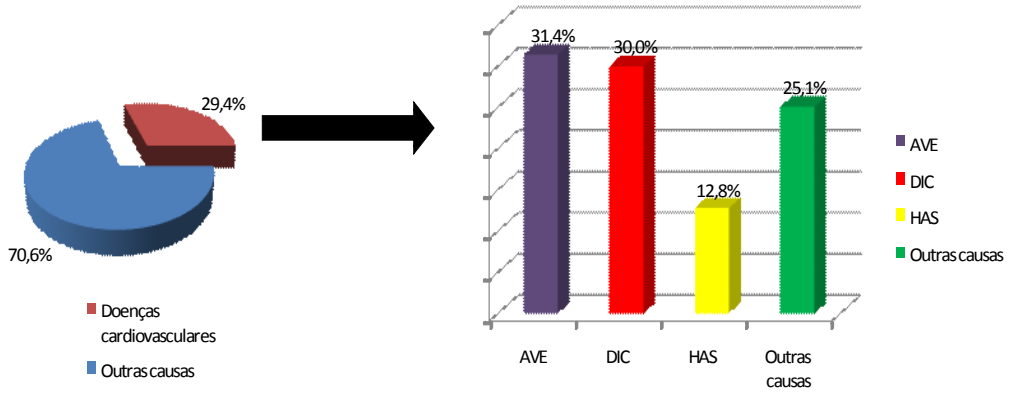
REFERÊNCIAS **90**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Hipertensão X treinamento aeróbio

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial, caracterizada por níveis elevados e mantidos da pressão arterial (PA), associada à alta morbidade e mortalidade, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças vasculares e cardíacas, como a aterosclerose, o acidente vascular cerebral, o infarto do miocárdio, e, doenças isquêmicas renais, razão pela qual ela tem sido muito estudada nas últimas décadas. Apresenta alta incidência, atingindo 15-20% da população adulta e mais de 50% da população idosa (CHOBANIAN et al., 2003; LOUTZENHISER; BIDANI; CHILTON, 2002; MANCIA; GRASSI, 1998; MUNTNER; ROCCELLA; WHELTON, 2002). Nos últimos 20 anos a prevalência da hipertensão arterial chegou a 30% em cidades brasileiras, sendo que em 32,5% destes a PA era ≥ 140/90mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Em 2003, no Brasil, 27.4% dos óbitos foram causados por doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). Já em, 2007 as doenças cardiovasculares representaram 29,4% dos óbitos totais, sendo que deste montante 31,4% foi devido ao acidente vascular encefálico, 30% à doença isquêmica do coração, 12.8% à hipertensão arterial sistêmica e 25.1% à outras causas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; Figura 1).

Figura 1. Taxa de mortalidade por doença cardiovascular e suas diferentes causas no Brasil, em 2007.



AVE, acidente vascular encefálico; DIC, doença isquêmica do coração; HAS, hipertensão arterial sistêmica e outras causas.
FONTE: Adaptado de Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010)

Por outro lado, prática regular de exercícios físicos (treinamento aeróbio) traz muitos efeitos benéficos para a saúde, reduzindo o risco de diversas doenças cardiovasculares como a hipertensão, a obesidade, o diabetes e as doenças coronarianas, cerebrais e renais, o que tem sido extensivamente confirmado pela literatura científica (CHOBANIAN et al., 2003; MCARDLE; KATCK; KATCH, 2002; PESCATELLO et al., 2004). Têm-se demonstrado que quanto maior o nível de condicionamento físico, menor o risco cardiovascular e vice-versa (CHOBANIAN et al., 2003; MCARDLE; KATCK; KATCH, 2002; PESCATELLO et al., 2004).

Entre os muitos fatores condicionantes da hipertensão (vide revisões de AMARAL; MICHELINI, 2011; CHOBANIAN et al., 2003; MICHELINI, 2004, 2008), citam-se o desequilíbrio do controle autonômico da circulação, com predomínio do simpático e aumento das catecolaminas circulantes (adrenalina e noradrenalina cuja liberação é intensificada pela própria hipertonia simpática), a hiperativação do sistema renina-angiotensina plasmático e tecidual, o aumento dos níveis plasmáticos de vasopressina, o desequilíbrio entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio com predomínio destes últimos, o aumento da resistência à insulina, alterações estruturais em vasos de resistência (com aumento da espessura e da razão parede/luz de artérias/arteríolas) e capilares (rarefação) nos diferentes territórios, maior sensibilidade ao sal, aumento da volemia, entre outros fatores. Dentre estes fatores, o sistema nervoso autônomo é de fundamental importância porque inerva todos os efetores do sistema cardiovascular - o coração, inervado pelo simpático e parassimpático, e, os vasos de resistência e de capacitância inervados pelo simpático - sendo fundamental para o controle momento-a-momento da PA (MICHELINI, 2008).

Os mecanismos pelos quais o treinamento aeróbio desencadeia a redução da PA são controversos (AMARAL; MICHELINI, 2011). Quedas da PA após o treinamento têm sido associadas a vários fatores como a redução da atividade vasomotora simpática (CERONI et al., 2009; MUELLER, 2010), redução da resistência à insulina (CHEN et al., 2010), redução do volume plasmático e menor débito cardíaco (VERAS-SILVA et al., 1997), menor reatividade vascular (PASQUALINI et al., 2010), redução da resistência muscular esquelética e da resistência periférica total (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003), redução da atividade do sistema renina-algiotensina-aldosterona e redução do estresse oxidativo (FÉLIX; MICHELINI, 2007; PIALOUX et al., 2009), alteração do balanço entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, com predomínio dos primeiros (LAUGHLIN et al., 2001), bem como, indução de genes anti-apoptóticos (WATSON et al., 2007).

Deve-se notar que o treinamento aeróbio, entre os vários ajustes periféricos e centrais que desencadeia, é fundamental para alterar a atividade do parassimpático e do simpático ao coração e vasos (MICHELINI, 2007a), o que faz do sistema nervoso autônomo (SNA) um alvo importante para o estudo dos mecanismos condicionantes dos efeitos deletérios da hipertensão, bem como os efeitos benéficos do treinamento aeróbio.

1.2 O SNA no controle da PA

Ajustes instantâneos da PA são controlados reflexamente pelo sistema nervoso autônomo (MICHELINI, 2008). Aferências periféricas (barorreceptores e quimiorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares, receptores de distensão muscular, aferências renais e viscerais, etc) detectam e sinalizam ao sistema nervoso central informações sobre o funcionamento da circulação (variações da PA, P_{O_2}, P_{CO_2} e pH sanguíneos, retorno venoso, distensão das câmaras cardíacas, nível de atividade da musculatura esquelética, pressão de perfusão nos diferentes tecidos, etc). Estas informações são direcionadas ao núcleo do trato solitário (NTS), a 1ª estação sináptica dos aferentes periféricos (DAMPNEY, 1994; MICHELINI, 2008; MIURA; REIS, 1969; VAN GIESBERGEN; POLKOVITS; DE JONG, 1992;). Por sua vez, neurônios do NTS glutamatérgicos (GLUérgicos) projetam-se e excitam os núcleos dorsal motor do vago (DMV) e ambíguo (NA), de onde emergem os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração (pós-ganglionares colinérgicos são intracardíacos); projetam-se também ao bulbo ventrolateral caudal (CVLM), que contém neurônios gabaérgicos (GABAérgicos), os quais se projetam e inibem o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). O RVLM contém neurônios pré-motores simpáticos (GLUérgicos) que se projetam aos neurônios pré-ganglionares situados na coluna intermédio-lateral da medula espinhal (IML, colinérgicos) e destes aos pós-ganglionares (noradrenérgicos) que inervam coração e vasos (MICHELINI, 2008). Respostas autonômicas, desencadeadas pela atividade dos aferentes periféricos, determinam alterações apropriadas dos efetores, promovendo ajustes instantâneos da capacitância venosa, débito cardíaco e resistência periférica, de forma a corrigir eficientemente os desvios para mais ou para menos da PA. Este é o chamado *arco-reflexo bulba* ou *alça primária do controle cardiovascular* (Figura 2).

Além da alça primária de integração cardiovascular, outros circuitos suprabulbares integram e modulam o controle reflexo da circulação (DAMPNEY, 1994; MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI; STERN, 2009). As informações aferentes que chegam ao NTS (e CVLM) também são direcionadas vias neurônios catecolaminérgicos (CAérgicos) a

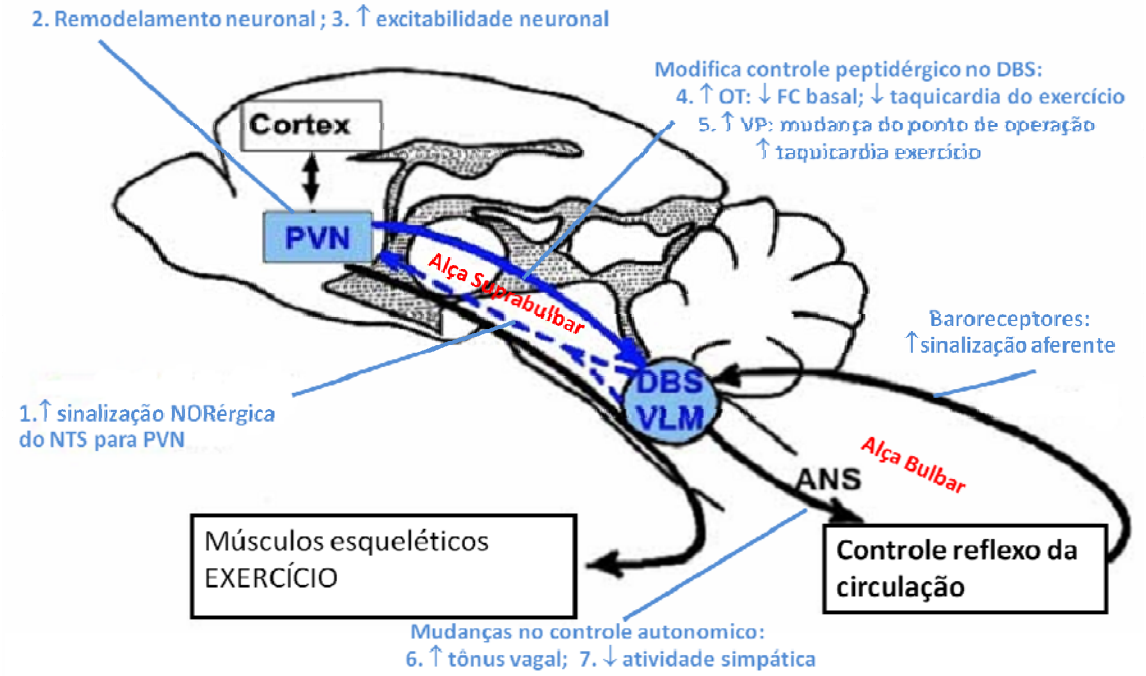
diferentes áreas suprabulbares, em especial ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), uma região de controle autonômico, conhecida por integrar respostas vegetativas, neuroendócrinas e comportamentais (DAMPNEY, 1994; KALIA et al., 1985a, b, c; PALKOVITS, 1980; SAWCHENKO; SAWNSON, 1981). As projeções CAérgicas ascendentes ao hipotálamo projetam-se tanto a neurônios magnocelulares do PVN e que sintetizam vasopressina (VP) e ocitocina (OT) e as liberam para a circulação via neurohipófise (DAMPNEY, 1994), como a neurônios parvocelulares do PVN (os chamados neurônios pré-autonômicos, também VPérgicos e OTérgicos), que se projetam ao NTS, DMV, NA e RVLM, além da IML (BUJIS et al., 1978; NILAVER et al., 1980; SAWCHENKO; SAWNSON, 1982; SOFRONIEW; SCHRELL, 1981), fechando um importante circuito modulatório do controle autonômico da circulação. Este 'arco-reflexo' "NTS/CVLM → PVN → NTS/DMV/NA/RVLM" constitui as chamadas *alças secundárias* ou *suprabulbares de modulação do controle cardiovascular* (Figura 2), cuja função é realizar ajustes finos da regulação bulbar, ajustando o controle autonômico e a resposta circulatória a diferentes situações funcionais e patológicas, como, por exemplo, o exercício físico e a hipertensão arterial (MICHELINI, 2007a, 2007b; MITCHELL, 1990; ROWELL, 1992; ROWELL; O' LEARY, 1990).

1.3 Modulação do controle autonômico durante exercício

Uma das principais linhas de pesquisa do laboratório da Profa. Dra. Lisete C. Michelini, ao qual me agreguei nestes últimos anos, refere-se à investigação da modulação exercida pelas projeções suprabulbares sobre o tônus autonômico durante ajustes da resposta cardiovascular ao exercício agudo e do treinamento aeróbio. Durante o exercício leve a moderado realizado em esteira ergométrica, há elevação mantida da PA (faixa de 15 a 20 mmHg, essencial para redistribuir o fluxo sanguíneo aos diferentes territórios) que não é acompanhado de bradicardia reflexa, mas sim de elevada freqüência cardíaca (FC). A taquicardia do exercício não pode ser explicada apenas pela integração bulbar, uma vez que pelos mecanismos bulbares, elevações da PA sempre resultam em bradicardia reflexa. Muitos estudos de nosso e outros laboratórios, como discutido a seguir, têm contribuído para o entendimento de como a alça de modulação suprabulbar medeia a instalação dos ajustes funcionais e adaptativos do controle cardiovascular ao exercício.

Em trabalho pioneiro, Brum et al. (2000) descreveram que o treinamento aeróbio de baixa intensidade facilitava a sinalização aferente pelos barorreceptores (aumento do ganho do nervo depressor aórtico em WKY e SHR, com redução de ED50 em SHR), demonstrando uma maior eficiência de sinalização pelas aferências barorreceptoras que integram a alça primária de modulação (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares.



Áreas mencionadas facilitam o controle autonômico da circulação durante o exercício
FONTE: Adaptado de Michelini; Stern, 2009.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório já haviam demonstrado que as projeções VPérgicas do PVN ao NTS tinham efeito tônico sobre o funcionamento do reflexo barorreceptor cardíaco, ou seja, a VP deslocava o ponto de operação do reflexo para níveis mais elevados de PA e FC, sem alterar a sensibilidade baroreflexa (MICHELINI; BONAGAMBA, 1988; MICHELINI, 1994, 1998), o que poderia explicar a adaptação parcial do reflexo durante exercício dinâmico. Observou-se que também que as ativações das projeções OTérgicas do PVN ao NTS aumentava a sensibilidade da bradicardia reflexa sem alterar a da taquicardia reflexa (HIGA-TANIGUCHI et al., 2002). Posteriormente, observou-se que a VP modulava o simpático cardíaco reduzindo a resposta bradicárdica por diminuir a inibição simpática durante elevações transitórias da PA (MICHELINI; BONAGAMBA, 1988;

MICHELINI, 1994; 1998), enquanto que a OT potencializava a bradicardia reflexa por facilitar o tônus vagal ao coração (HIGA-TANIGUCHI et al., 2002; MICHELINI, 2007a). Trabalhos de nosso laboratório também mostraram que as projeções VPérgicas do PVN ao bulbo dorsal eram ativadas durante o exercício dinâmico. Observou-se imediatamente após o exercício dinâmico aumento específico do conteúdo endógeno de VP na região dorsal do bulbo (DBS, abrangendo o NTS e o DMV) nos normotensos sedentários e treinados, que foi de maior magnitude nos treinados, sugerindo que o exercício ativava as projeções VPérgicas a esta área, com efeito mais intenso após treinamento (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI, 2007a); observou-se também não haver após treinamento alteração da densidade de receptores V_1 no NTS, mas aumento da sensibilidade destes receptores a seu agonista endógeno (SOUZA; MICHELINI; FIOR-CHADI, 2001). Coerentemente o pré-tratamento do NTS com antagonista V_1 determinou redução da taquicardia do exercício, sem alterar a resposta pressora, em ratos treinados e sedentários, com resposta de maior magnitude nos indivíduos treinados, confirmando a potencialização da taquicardia pelas projeções VPérgicas (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI; MORRIS, 1999; MICHELINI, 2007a).

Com relação às projeções OTérgicas do PVN ao DBS, observou-se serem ativadas durante exercício dinâmico, mas apenas nos animais treinados. Nestes houve, imediatamente após exercício dinâmico, aumento do conteúdo endógeno de OT no DBS, sem nenhuma alteração significativa nos ratos sedentários (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001). Observou-se também haver após o treinamento, aumento da imunorreatividade para a OT no NTS/DMV (MARTINS et al., 2005). Coerentemente, o pré-tratamento do NTS com antagonista de receptores de OT (OT_R) não alterou a resposta pressora, mas potencializou a taquicardia do exercício apenas nos ratos treinados, sugerindo ativação específica dos mecanismos OTérgicos supra-bulbares de controle da FC pelo treinamento, a qual propiciaria a menor taquicardia do exercício, característica de indivíduos treinados (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001).

Estudando os efeitos do treinamento aeróbio sobre a plasticidade das projeções CAérgicas ascendentes, demonstrou-se ainda haver em ratos normotensos treinados aumento significativo do número e da densidade de botões sinápticos em neurônios OTérgicos do PVN que se projetam ao NTS e que estes botões sinápticos eram imunorreativos para a dopamina β-hidroxilase, indicando após treinamento aumento da inervação noradrenérgica (NORégica) e da sinalização aferente ao PVN (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007). Em hipertensos

treinados as alterações foram no mesmo sentido, mas não atingiram níveis de significância (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007). Trabalhos do nosso laboratório descreveram ainda em normotensos que o treinamento aumentava especificamente a excitabilidade intrínsica de neurônios pré-autonômicos do PVN (OTérgicos e VPérgicos) que se projetam ao NTS, sem alterar a excitabilidade dos neurônios magnocelulares que sintetizam e liberam OT e VP plasmáticos (JACKSON et al., 2005; MICHELINI, 2007a). Estas observações mostraram que o treinamento aeróbio de baixa intensidade determinava alterações da plasticidade de vias NORérgicas ascendentes ao hipotálamo associadas a alterações funcionais apenas nos neurônios parvocelulares (OTérgicos e VPérgicos) que se projetam ao NTS, ou seja, na via da modulação autonômica e não na via neuroendócrina de controle hidroeletrolítico.

Em conjunto estes dados indicavam que o treinamento aeróbio de baixa intensidade, além dos já conhecidos efeitos periféricos (remodelagem cardíaca com aumento do volume sistólico e do débito cardíaco; angiogênese capilar e neoformação de vênulas, com aumento da condutância vascular em tecidos exercitados e remodelamento arteriolar com redução da razão parede/luz e da resistência periférica; AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; AMARAL et al., 2001; CLAUSEN, 1977; MELO; MARTINHO JR; MICHELINI, 2003; SCHEUER; TIPTON, 1977), também alterava em indivíduos normotensos a plasticidade e a funcionalidade de vias peptidérgicas e CAérgicas que interligam bulbo e hipotálamo (MICHELINI, 2007a; 2007b, MICHELINI; STERN, 2009). O fato de estas alterações terem sido acompanhadas de alterações no balanço autonômico ao coração, com redução do simpático em hipertensos (CERONI et al., 2009; MICHELINI, 2007a; 2007b) e aumento do tônus vagal em normotensos e hipertensos (HIGA-TANIGUCHI et al., 2002; HIGA-TANIGUCHI et al., 2009; MARTINS et al., 2005), com importantes repercussões funcionais, indicava claramente a potencialidade do treinamento aeróbio de baixa intensidade em modular a expressão e o funcionamento da alça suprabulbar do controle autonômico do sistema cardiovascular.

1.4 Exercício X modulação autonômica na hipertensão

Mais recentemente procurou-se também investigar os efeitos do treinamento aeróbio sobre alterações plásticas e funcionais em vias autonômicas centrais de hipertensos. Sabe-se que a hipertensão arterial (assim como insuficiência cardíaca, obesidade, síndrome metabólica, diabetes) é acompanhada de alterações mantidas do balanço autonômico, com predomínio do simpático (GRASSI; MANCIA , 2004). Este predomínio, provavelmente se dá por desbalanço

entre a atividade vagal e simpática e nos hipertensos, com hipertonia simpática (facilitada pela depressão do funcionamento do reflexo barorreceptor; KRIEGER; BRUM; NEGRÃO, 1999), a qual determina o aumento da pré-carga e da contratilidade, a elevação da FC e débito cardíaco e intensa vasoconstrição periférica. Estas respostas levam ao remodelamento arterial eutrófico ou hipertrófico e, conseqüentemente, à hipertrofia concêntrica do coração, condicionando a gênese/manutenção da hipertensão, bem como a progressão de lesões em órgãos-alvo (GRASSI; MANCIA, 2004; KORNER, 1989).

Sabe-se que o tônus simpático é gerado centralmente através da atividade integrada de diferentes áreas do sistema nervoso central como o núcleo caudal da Rafe, o RVLM, no bulbo, o agrupamento A5 na ponte e o PVN, no hipotálamo, a atividade das quais se encontra exacerbada na hipertensão (GUYENET, 2006; SPYER, 1994; SUN, 1995). Sabe-se também que os neurônios GLUérgicos constituem a principal fonte de excitação no sistema nervoso central (HANG et al., 2004). Neurônios contendo ácido γ-Aminobutírico (GABA) também fazem parte da circuitaria neuronal que controla o sistema nervoso autônomo, exercendo função predominante inibitória. Foi ainda demonstrado que a hipertensão cursa com hipertonia do sistema renina-angiotensina, cuja hiperatividade é de longa data associada à hipertonia simpática (BEZERRA et al., 2001; FELIX; MICHELINI, 2007; MCKINLEY et al., 2003; NISHIMURA et al., 1992; SANGALETI; CRESCENZI; MICHELINI, 2004), com a marcante depressão dos sistemas OTérgico (MARTINS et al., 2005; MICHELINI 2007a) e GABAérgico centrais (CZYEWSKA-SZAFRAN et al., 1989; HORN et al., 1998; LI; PAN, 2006, 2007). A depressão de sistemas inibitórios, como é o caso do GABAérgico, pode também contribuir de maneira significativa para a gênese da hipertonia simpática (HORN et al., 1998; KRAMER, et al., 2000, 2001, 2002; LITTLE et al., 2001).

A importância da depressão dos sistemas OTérgico e GABAérgico no controle autonômico de hipertensos é ressaltada pelo fato de que tanto as projeções OTérgicas quanto as GABAérgicas fazem parte do circuito neuronal básico de regulação cardiovascular: as OTérgicas interligando o PVN ao bulbo dorsal, onde determinam aumento do tônus vagal (BRAGA et al., 2000; HIGA-TANIGUCHI et al., 2002; MARTINS et al., 2005; MICHELINI 2007b), as GABAérgicas funcionando como interneurônios locais de inibição em sítios específicos das alças suprabulbar (no PVN , CHEN et al., 2006; LEE et al, 2008; LI; PAN, 2006, 2007) e bulbar (no RVLM e no NTS, BLESSING; REIS, 1983; DEGTYARENKO; HASSER, 2006; KAUFMAN, 2005; MUELLER; POTTS, 2006). Realmente trabalhos da última década têm sistematicamente mostrado em hipertensos que a modulação GABAérgica

encontra-se deprimida em áreas hipotalâmicas de integração do controle cardiovascular como o PVN e o hipotálamo caudal (CZYEWSKA-SZAFRAN et al., 1989; HORN et al., 1998; LI; PAN, 2006, 2007; SHONIS; WALDROP, 1993a, SHONIS et al., 1993b), contribuindo significativamente para o aumento do 'drive' simpático à circulação. Estas observações ganham importância se considerarmos que neurônios GABAérgicos no PVN tem sido considerados como um dos mais importantes moduladores negativos da simpatoexcitação (LEE et al., 2008).

Assim, sabendo-se que os neurônios GLUérgicos e GABAérgicos são os principais responsáveis, respectivamente, pela atividade neural excitatória e inibitória em áreas centrais de controle autonômico, é nossa hipótese de trabalho que a hiperatividade simpática que acompanha a hipertensão bem como sua redução, condicionada pelo treinamento físico, possam estar relacionadas com alterações na atividade destes neurônios.Torna-se, portanto, importante investigar os efeitos do treinamento e do treinamento associado à hipertensão sobre as vias GABAérgicas e GLUérgicas centrais.

1.5 Neurônios GABAérgicos e GLUérgicos

Neurônios GABAérgicos são abundandes em várias regiões do encéfalo como a substância negra, o hipotálamo, o globo pálido, os colículos superior e inferior, núcleos da ponte e do bulbo, as quais apresentam concentrações bastante elevadas do neurotransmissor inibitório ácido γ-Aminobutírico (GABA), da ordem de 2 a 10 μmol/g tecido (HANG et al., 2004). O GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, é sintetizado a partir do α-cetoglutarato (do Ciclo de Krebs) pela transaminase conhecida como GABA-T que o converte em ácido L-glutâmico; este por sua vez é decarboxilado pela decarboxilase do ácido glutâmico (GAD, expressa somente em células que usam o GABA como neurotransmissor) para formar o GABA (OLSEN; BETZ, 2006; Figura 3). Frente à despolarização do neurônio, o GABA é liberado na fenda sináptica, podendo agir em receptores específicos: $GABA_A$ e $GABA_C$ (ionotrópicos, que operam canais de Cl^- os quais medeiam a inibição sináptica) e $GABA_B$ (metabotrópicos, acoplados à proteína G, os quais medeiam a ativação de canais de K^+ ou a redução da condutância ao Ca^{++} e produzem correntes inibitórias lentas; BLOOM, 2001; CHEBIB; JOHNSTON, 1999; OLSEN; BETZ, 2006). O GABA presente na fenda sináptica pode também ser recaptado pelo terminal nervoso ou pela glia (HANG et al., 2004; OLSEN; BETZ, 2006).

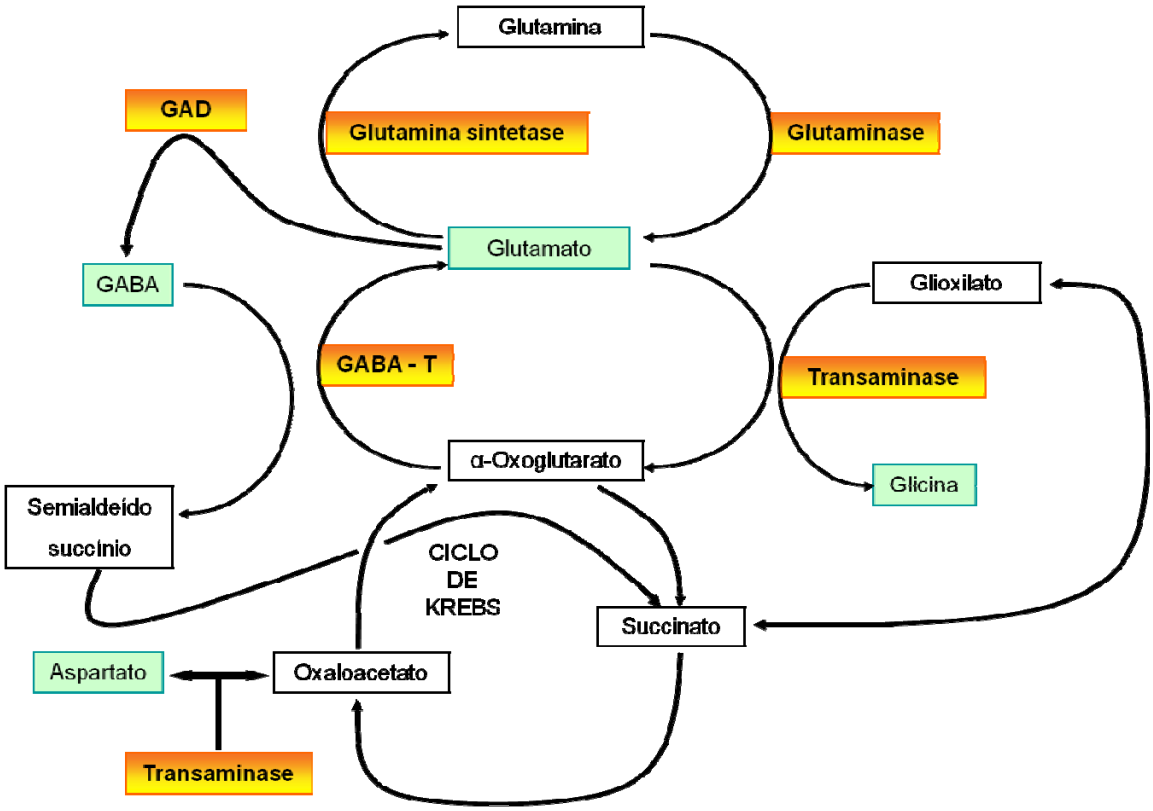
A enzima de conversão do glutamato em GABA, a GAD, possui duas isoformas conhecidas como GAD65 e GAD67 (sendo que 65 e 67 designam seus pesos moleculares em kDa). Ambas medeiam a síntese de GABA, sendo expressas em diferentes áreas como o córtex, hipocampo, hipotálamo, bulbo e medula espinhal (BELICHENKO et al., 2009; DEUCHARS et al., 2005; FONG et al., 2005; HORN et al., 1998; SEARLES et al., 2000; STORNETTA; GUYENET, 1999). Enquanto GAD65 foi preferencialmente observada em corpos celulares de neurônios do córtex, hipocampo e núcleos hipotalâmicos (BELICHENKO et al., 2009; SEARLES et al., 2000). O GAD67 pareceu distribuído preferencialmente nos terminais nervosos do hipotálamo (BIANCARDI; CAMPOS; STERN, 2010). Já no NTS e outras áreas bulbares ambas GAD65 e GAD67 são expressas no corpo celular e terminações nervosas com elevada densidade da isoforma 67 no NTS (FONG et al., 2005; STORNETTA; GUYENET, 1999).

É também sabido que o glutamato é o principal neurotransmissor de ação excitatória encontrado no sistema nervoso central. Este pode ser formado por diferentes vias: a partir da glutamina, pela ação da glutaminase e a partir do α- oxoglutarato pela ação da enzima GABA-T. Sua formação possui interconexão com a síntese do GABA (Figura 3), o que dificulta seu estudo, uma vez que não há uma única enzima específica para formá-lo. Além disso, o glutamato além de ser um neurotransmissor, tem função metabólica, pois sua formação está ligada aos reservatórios metabólicos (Ciclo de Krebs). O Glutamato é estocado em vesículas, que ao serem estimuladas por transientes de Cálcio, liberam o neurotransmissor por exocitose para a fenda sináptica (HANG et al, 2004).

Existem três isoformas das vesículas transportadoras de glutamato: VGlut1, VGlut2 e VGlut3, as quais são expressas no sistema nervoso central de mamíferos. A VGlut1 é expressa em neurônios dos córtex cerebelar e cerebral, no hipocampo e na parte posterior e ventromedial do núcleo talâmico do hipotálamo (FREMEAU et al., 2004; MOECHARS et al., 2006). A VGlut2 encontra-se expressa no mesencéfalo, tronco encefálico, tálamo e hipotálamo (PVN e NTS, partes anterodorsal e reticular do núcleo talâmico) sendo mais expressa no desenvolvimento inicial do indivíduo (FREMEAU et al., 2004; MOECHARS et al., 2006). Varoqui et al. (2002), afirmam que VGlut2 é expressa em vias sensoriais e autonômicas, sendo um marcador da neurotransmissão. Os VGluts 1 e 2 são preferencialmente localizados no terminal pré-sináptico dos neurônios (HARKANY et al., 2004); por sua vez, a VGlut3 está mais restrita a um pequeno número de neurônios do estriado, hipocampo, córtex cerebral e núcleo da rafe (GRAS, et al., 2002) e/ou em neurônios

do putamen caudal, tubérculo olfatório, núcleo accumbens, hipocampo e núcleos interpeduncular e dorsal, núcleo da ráfe (parte medial) e córtex cerebral (HERZOG et al., 2004).

Figura 3. Formação dos neurotransmissores GABA e Glutamato



FONTE: Adaptado de Hang et al. (2004)

O glutamato, após ser liberado na fenda sináptica, age em receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, densamente distribuídos no córtex, nos gânglios da base, nas vias sensórias, etc e o cainato, que possui distribuição mais restrita) ou em receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G e a outros segundos mensageiros intracelulares). Os receptores NMDA são amplamente distribuídos pré e pós-sinapticamente, sendo encontrados na glia e em terminações neurônais e encontram-se ligados à transmissão nervosa, à excitotoxidade e à plasticidade sináptica. Já os receptores AMPA são também amplamente distribuídos nas regiões pós-sinápticas dos neurônios, agindo basicamente na transmissão de potenciais de ação rápidos. Os receptors cainato estão localizados em regiões pré e pós-sinápticas (funções ligadas a potenciais rápidos). A outra classe de receptores, os metabotrópicos, estão localizados pré e pós-sinápticamente e têm funções relacionadas à modulação sináptica e à excitotoxidade (HANG et al., 2004).

1.6 Vias GABAérgicas e GLUérgicas na hipertensão e treinamento aeróbio

Duas observações interessantes de nosso laboratório foram as de que a hipertensão espontânea (spontaneously hypertensive rat, SHR; o melhor modelo experimental da hipertensão primária ou essencial no homem) era acompanhada de redução da expressão do sistema OTérgico (menor expressão de RNAm de OT no PVN e do receptor de OT (OT_R) no DBS (abrangendo o NTS e o DMV, MARTINS et al., 2005), e que o treinamento aeróbio era eficaz em corrigir o déficit da expressão de OT no PVN, sem afetar a expressão de seu receptor no DBS (CAVALLERI et al., 2011; MARTINS et al., 2005). Para ambos os grupos normotensos e hipertensos, o aumento da expressão gênica e protéica de OT no PVN correlacionava-se positivamente com a bradicardia de repouso (CAVALLERI et al., 2011) e o bloqueio de seus efeitos a nível do NTS/DMV determinava aumento da taquicardia do exercício, com efeitos de menor magnitude nos SHR (HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009). Estas observações indicam que a liberação de OT encontra-se associada à redução da FC e confirmam a potencialidade do treinamento aeróbio em alterar a plasticidade neuronal corrigindo alterações deletérias induzidas pela hipertensão em vias peptidérgicas centrais.

Dados da literatura quantificando os níveis de expressão de RNAm de GAD mostraram redução desta proteína formadora de GABA em ratos SHR. HORN et al. (1998), utilizando imunocitoquímica e *northern blotting* para GAD67 em WKY e SHR, observaram no hipotálamo caudal que a quantidade de neurônios imunorreativos para GAD67 era 42% menor em SHR quando comparado aos WKY e notaram redução de 33% na expressão de RNAm de GAD67 de SHR (*vs* WKY). Estas diferenças não foram observadas entre WKY e SHR no córtex, mesencéfalo, cerebelo e tronco encefálico. Anteriormente, Czyzewska-szafran et al. (1989), ao estudarem diferentes áreas encefálicas de SHR e WKY, já haviam revelado que o conteúdo de GABA , a atividade de GAD e a expressão do receptor $GABA_A$ eram significativamente menores na substância negra, hipotálamo e hipocampo de SHR (*vs* WKY). Estes estudos, de forma conjunta, sugerem que a hipertensão é acompanhada de redução da atividade de neurônios GABAérgicos no hipotálamo.

Não se sabe se o treinamento físico é ou não eficaz em corrigir as alterações deletérias sobre a expressão de neurônios GABAérgicos centrais de hipertensos e se há ou não alterações na expressão/atividade de neurônios GLUérgicos. Observações anteriores relativas aos efeitos do exercício sobre a expressão de GAD e receptores $GABA_A$ no hipotálamo têm mostrado efeitos conflitantes: Little et al. (2001) notaram aumentos de GAD65 e GAD67 no

hipotálamo caudal de SHR treinados; por outro lado Molteni, Yin e Pinilla (2002), usando a técnica de *microarray* descreveram que o treinamento físico reduzia a expressão do GAD e do receptor $GABA_A$ no hipocampo de ratos Sprague-Dawley. Em trabalho mais recente, utilizando hibridização *in situ,* Hill et al. (2010) demonstraram que as alterações no sistema GABAérgico central eram região-específica, uma vez que o treinamento reduzia a expressão do RNAm de algumas subunidades do receptor $GABA_A$, mas não alterava a expressão de GAD no córtex pré-límbico e infra-límbico, no putamen, e no septo lateral, enquanto que no núcleo acumbens a redução de RNAm para o $GABA_A$ era acompanhada de aumento da expressão de GAD após exercício. Também no PVN o exercício foi acompanhado de redução da expressão de $GABA_A$, com aumento da expressão de GAD na região peri-PVN (HILL et al., 2010). Kramer et al. (2001, 2002), observaram redução de GABA na hipertensão e que o treinamento aumentou a inibição GABAérgica no hipotálamo caudal.

Não há, portanto, um conceito claro sobre os efeitos do treinamento físico na expressão/atividade de neurônios GABAérgicos. Também não se sabe se o exercício e/ou o exercício associado à hipertensão possam alterar diferencialmente a atividade das isoformas GAD65 e GAD67. A expressão destas enzimas, bem como alterações de seu conteúdo em diferentes áreas centrais de controle autonômico frente à hipertensão e ao treinamento podem, assim, se constituir em ferramentas úteis para se avaliar a contribuição de neurônios GABAérgicos nestas situações.

Embora o envolvimento dos neurônios GLUérgicos com a hipertensão seja relativamente bem esclarecida (BIANCARDI; CAMPOS; STERN, 2010; LI; PAN, 2007) quase nada se sabe sobre os efeitos do treinamento sobre a expressão/atividade de neurônios GLUérgicos. Frente à escassez de dados sobre a funcionalidade de neurônios GLUérgicos no treinamento físico e conhecendo-se a diversidade das vias de formação do glutamato, optamos em analisar os efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de neurônios GLUérgicos em áreas de controle autonômico, utilizando como marcador, a Transportador Vesícular de Glutamato tipo 2, a VGlut2, cuja expressão foi demonstrada no PVN de ratos hipertensos (BIANCARDI; CAMPOS; STERN, 2010). Esta escolha se deu por ser um transportador vesícular do glutamato, encontrado na maioria dos núcleos encefálicos (hipotálamo, hipocampo, cerebelo e córtex cerebral), e por estar relacionado à neurotransmissão. Sua quantificação pode, portanto, ser outra ferramenta útil para se avaliar a contribuição dos neurônios GLUérgicos na hipertensão e no exercício.

É possível que alterações cardiovasculares induzidas pelo treinamento sejam dependentes da intensidade/volume do exercício e da duração do mesmo, mas não há nenhuma informação

relativa a isto. Também não sabemos se há ou não coincidência temporal entre alterações plásticas de neurônios GABAérgicos e GLUérgicos e a manifestação temporal dos ajustes funcionais ao treinamento (bradicardia de repouso nos normotensos e hipertensos, queda da pressão arterial em hipertensos): seriam elas coincidentes? antecederiam os ajustes funcionais?

É, portanto, nossa hipótese de trabalho que a hipertensão possa induzir em áreas centrais de controle autonômico um desbalanço entre vias GABAérgicas e GLUérgicas, e que este balanço possa ser alterado e/ou corrigido pelo treinamento aeróbio de intensidade baixa a moderada. Pretendemos, portanto, no presente projeto avaliar em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) as alterações temporais na expressão de neurônios GABAérgicos e GLUérgicos no PVN, DBS e VBS, bem como as alterações temporais das respostas funcionais induzidas pelo treinamento aeróbio de intensidade baixa a moderada. A importância do conhecimento a ser gerado pode ser confirmada pela crescente utilização de tratamentos não farmacológicos, em especial do treinamento aeróbio, na redução da hipertonia simpática, dos níveis pressóricos e da morbi-mortalidade de hipertensos (CHOBANIAN et al., 2003; KAPLAN, 1998; PESCATELLO et al., 2004; TIPTON, 1999). O treinamento aeróbio de intensidade baixa a moderada tem sido extensivamente indicado como a conduta terapêutica de escolha no tratamento de hipertensão leve a moderada e como um adjuvante ao tratamento medicamentoso em estágios mais avançados da hipertensão (CHOBANIAN et al., 2003; KAPLAN, 1995, 1998; PESCATELLO et al., 2004) e tem contribuído significativamente para melhorar a qualidade de vida de hipertensos assim como a de indivíduos normotensos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visa avaliar os efeitos temporais do treinamento aeróbio de intensidade baixa a moderada, em WKY e SHR, nas alterações de expressão gênica e protéica das vias GABAérgicas e GLUérgicas em áreas centrais do controle autonômico, correlacionando-as aos dados funcionais e hemodinâmicos. Adicionalmente, são avaliados em WKY e SHR os efeitos do sedentarismo nestas mesmas vias. São, portanto, objetivos específicos deste trabalho:

1. Identificar, através do RT-PCR em tempo real, os efeitos temporais das alterações das expressões do RNAm de GAD65, GAD67 e do VGlut2 no hipotálamo (PVN), bulbo dorsal (DBS, abrangendo o NTS) e bulbo ventral (VBS, abrangendo o RVLM), de WKY e SHR submetidos aos protocolos de treinamento e sedentarismo;
2. Confirmar através da técnica de imunofluorescência nos mesmos grupos, nas mesmas áreas e nos mesmos tempos experimentais se as alterações observadas na expressão gênica refletem-se em alterações da expressão protéica do GAD65, GAD67 e VGlut2, ou seja, confirmar se há a tradução protéica e identificar as áreas em que esta ocorre;
3. Correlacionar as alterações observadas em neurônios GABAérgicos e GLUérgicos às alterações hemodinâmicas e funcionais induzidas pela hipertensão e pelo treinamento aeróbio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Utilizamos ratos (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade e peso entre 200-250 g. Metade destes pertencia à linhagem Wistar- Kyoto (WKY), que são normotensos, e a outra metade à linhagem Spontaneously Hypertensive Rat (*SHR*), que são os espontaneamente hipertensos. Todos eram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e foram alojados no Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica, durante todo o estudo. Nestes locais eram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 ° e 25 °C, em ciclo claro-escuro (12/12 horas) e com dieta *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos e protocolos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e no Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica ; estavam de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Bioética do ICB, em 20 de outubro de 2009 (protocolo registrado sob n˚142 na folha 78 do livro 2 para uso de animais em experimentação).

3.2 Protocolos de Treinamento Físico e Sedentarismo

O treinamento foi realizado em esteira ergométrica (Millenium, Inbramed, Porto Alegre-Brasil) adaptada para ratos, com 10 raias individuais (raias de alumínio com tampas acrílicas transparentes cuja parte frontal, pintada de preto, criava um ambiente de penumbra para o qual os ratos eram atraídos durante a corrida; além disso, estas raias possuiam muitos orifícios para a circulação de ar).

No início dos experimentos , SHR e WKY passaram por um período de adaptação. 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). No final desta segunda semana, os animais inaptos para corrida foram excluídos do estudo. Aqueles considerados aptos foram então submetidos ao teste máximo de esforço em esteira.

O teste de esforço máximo foi mensurado de forma indireta e individual, considerando-se o desempenho físico de cada rato. O teste, sem inclinação da esteira, iniciava-se com

velocidades de 0,3 Km/h, com acréscimos de 0,3 Km/h a cada 3 minutos, até a exaustão quando o animal não mais conseguia realizar o exercício. Registramos a velocidade e tempo máximos que cada rato conseguia atingir, imediatamente antes da exaustão. O teste de esforço máximo foi realizado em 4 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 (sedentário e treinado) e determinou a velocidade do treinamento físico. Nos segundo e terceiro momentos, após a 4ª e 8ª semanas do treinamento respectivamente, os testes foram realizados novamente para ajustar a intensidade do treinamento às novas capacidades máximas. No final do experimento (12ª semana), o teste foi realizado para possibilitar a comparação do desempenho entre os grupos e para avaliar a eficácia do treinamento nos grupos normotensos e hipertensos.

O protocolo de treinamento adotado foi o aeróbio de intensidade baixa a moderada (50–60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço) realizado durante 1 hora/dia, 5 dias/semana, durante 12 semanas. A intensidade do exercício foi aumentada gradativamente pela combinação da velocidade e duração, sem inclinação, até atingir velocidade estabelecida. Este protocolo foi padronizado em nosso laboratório (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; BRAGA et al., 2000; DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997) e tem sido extensivamente utilizado (CERONI et al., 2009; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009; JACKSON et al., 2005; MARTINS et al., 2005). Ferreira et al. (2007) já haviam comprovado que o treinamento a 60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço em esteira melhora a capacidade aeróbia do animal mantendo o predomínio do metabolismo aeróbio, ou seja, a glicólise tecidual não ultrapassa a utilização do piruvato mitocondrial, sendo o lactato produzido completamente removido (manutenção do lactato sanguíneo a 3nmol / L). Portanto, a intensidade do treinamento em nosso estudo (50-60% da capacidade máxima) utiliza primordialmente vias aeróbias para promoção de energia durante a realização do exercício físico.

De forma complementar, **c**om 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.

3.3 Grupos experimentais

Os animais WKY e SHR foram subdivididos em treinados (T) e sedentários (S), e alocados aos subgrupos, descritos no Quadro 1 e apresentavam no início dos protocolos o mesmo desempenho físico.

Quadro 1. Grupos experimentais divididos por linhagem (WKY e SHR), tratamento (S ou T) e tempo (0,1, 2, 4, 8 e 12 semanas)

WKY	**SHR**
Controle ou S_0	Controle ou S_0
T_1	T_1
T_2	T_2
T_4	T_4
T_8	T_8
T_{12}	T_{12}
S_{12}	S_{12}

FONTE: Ruggeri (2011).

Assim, para avaliar as alterações temporais da expressão gênica e protéica de GAD65, GAD67 e do VGlut2 , vários subgrupos de S e T foram formados: S_0, T_1, T_2, T_4, T_8, T_{12} e S_{12}, sendo que S ou T designa o tratamento (protocolo utilizado) e os números identificam após qual semana de treinamento o animal foi sacrificado (Quadro 1). Cada subgrupo foi composto por 12-16 ratos.

3.4 Canulação Arterial e Registro Direto da PA e FC

As canulações foram feitas para permitir o registro direto dos parâmetros hemodinâmicos (PA e FC) nos diferentes tempos experimentais. A implantação arterial da cânula era feita 24 horas antes dos registros funcionais, na sala de cirurgia do Laboratório Cardiovascular. Os animais treinados foram canulados 1 a 2 horas após a última sessão de exercício de forma que os parâmetros hemodinâmicos, a expressão gênica e o protéica fossem estudadas sempre ao mesmo tempo, ou seja, 25-26 horas após a última sessão de treinamento.

Os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 10%, 100 mg/Kg e cloridrato de xylasina 2%, 20 mg/Kg) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37 ºC). Sob assepsia e lupa cirúrgica (Surgical microscope DFV M90) foi realizada tricotomia da parte interna do

membro posterior esquerdo, seguida de incisão na altura da articulação coxo-femoral para isolamento da artéria femoral. A cânula de Tygon mais fina (5 cm com 0,25 mm de diâmetro interno) soldada a outra mais grossa (17 cm e 0,50 mm de diâmetro interno), preenchida com solução fisiológica heparinizada (20 Ul/ml) foi introduzida e fixada na artéria, na direção cranial. A extremidade distal mais expessa foi, através do espaço subcutâneo, exteriorizada e fixada na região cervical. No dia subsequente PA e FC basais foram registradas por 30-40 minutos com o animal acordado e com livre movimentação, na própria gaiola, após estabilização dos parâmetros cardiovasculares.

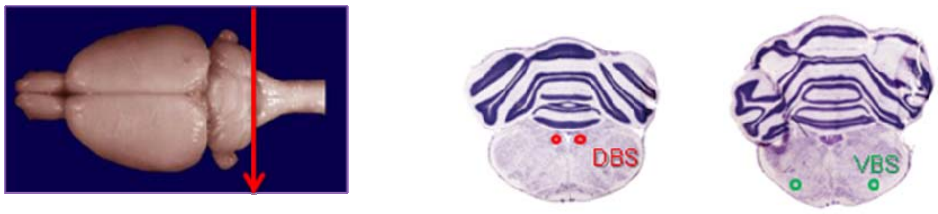
A cânula arterial foi conectada ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador GOULD e Biotach Gould) e os sinais de PA e FC gravados em polígrafo (Gould 3400) e/ou computador + placa de conversão A-D; amostragem em 2000 Hz, registrada no *software* da DataQ Instruments (DataQ Instruments , Inc., "WINDAQ™ Waveform Browser", versão 2.19, Akron, Ohio, USA).

3.5 Técnica de PCR em Tempo Real

3.5.1 Obtenção do tecido encefálico

Após os registros funcionais os animais (~8 ratos/grupo experimental) foram anestesiados profundamente e, imediatamente após a parada respiratória, perfundidos via ventrículo esquerdo com solução salina esteril e tamponada, durante 5 min. A perfusão (Bomba Peristáltica, ~20 ml/min) foi realizada sobre pressão em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes. Os animais foram decapitados para a retirada do encéfalo, o qual foi imediatamente acondicionado em gelo. Foram feitas fatias coronais (800-1000 μm de espessura) nas regiões do óbex e do hipotálamo. Após a identificação dos núcleos de interesse, foram feitos *"punches"* com agulha romba (gauge 20), direcionados à região dorsal (DBS, abrangendo o NTS, DMV e regiões vizinhas) e ventral (VBS, abrangendo o RVLM e regiões vizinhas) do tronco encefálico e ao PVN do hipotálamo (também abrangendo as regiões vizinhas), como demonstrado nas Figuras 4 e 5. O volume de cada *"punch"* foi padronizado em ~2,5 μg. Cada núcleo de interesse foi armazenado em eppendorf autoclavado, identificado e contendo 500 μl de TRIzol® da Invitrogen (Life Technologies Corporation, Grand Island, N. Y., USA); estes foram imediatamente acondicionados em gelo seco e após armazenados em freezer a -80 ºC.

Figura 4. Posicionamento do corte coronal a nível do óbex para localização do DBS e do VBS.



Corte coronal a nível do óbex (esquerda), para localização do DBS (centro) e do VBS (direita), onde foram feitos os "punches" bilaterais.
FONTE: Zampieri, 2011.

Figura 5. Posicionamento do corte coronal na região do hipotálamo para localização do PVN.

Corte coronal na região do hipotálamo (esquerda), para localização do PVN (direita), onde foram feitos os "punches" bilaterais.
FONTE: Zampieri, 2011.

3.5.2 Extração do RNAtotal, síntese do cDNA e real time

De todas as amostras coletadas extraiu-se o RNA total segundo o protocolo do fabricante (TRIzol® Reagent, Invitrogen Brasil, Cat. No. 15596-026), o qual incluía as fases de homogeneização, separação, precipitação, lavagem e diluição. A integridade do RNA obtido foi quantificado em espectofotômetro ("Ultrospec 3100 pro", UV/Visible Spectophotometer) nos comprimentos de onda de 260 e 280 mm, e armazenado a -80 ºC.

Para a síntese de cDNA, amostras de 2µg de cada RNA total passaram por tratamento como DNase I, Aplification Grade (Invitrogem ™, Cat. No. 18068-015,) seguindo o protocolo padrão do fabricante e foram submetidas à reação de transcrição reversa (Invitrogem ™, Improm-II ™ Reverse Transcriptase, Cat. No. #A3803), utilizando-se Ramdom Primers (Invitrogem ™, Cat. No. 48190-011,), dNTPmix (Invitrogem ™, Cat No. 10297-018,) e RNAse out (Invitrogem ™, Cat. No. 10777-019,), também de acordo com os protocolos dos fabricantes.

As expressões de RNAm do GAD65, GAD67 e VGlut2 foram estimadas mediante o PCR em tempo real (utilizamos equipamento da Corbett Research e *software* Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7). Para tal, aplicamos a técnica de coloração "SYBR Green" (princípio

FRET -Fluorescente Resonance Energy Transfer) que fluoresce quando ligada ao DNA dupla fita, utilizando o kit Plantinum® SYBR® green qPCR Sper Mix-UDG (Invitrogem ™, Cat. No. 11733-038,). Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante: 12,5µl Plantinum Mix, 10,5µL água DEPC, 0,5µL de primer sense e 0,5µL de primer anti-sense e por fim 1µL da amostra. Todas as reações passaram por desnaturações iniciais a 52 ºC por 2 min, 95 ºC por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 ºC, 15s), anelamento (60 ºC, 60s) e extensão (72 ºC, 20s), seguido da curva de dissociação (65-99 ºC). A especificidade da reação com SYBR® Green foram confirmadas pelo "melting point". A quatificação do RNAm foi expressa em valores de "cycle threshould" (Ct) usando o método ΔΔCt (LIVAK; SCHMITTEN, 2001; PFAFFL, 2001). Para a comparação dos resultados entre grupos, genes e áreas, os valores de RNAm foram normalizados pelo valor controle do GAD65 do PVN do grupo WKY (calibrador interno).

3.6 Gene de referência escolhido

O gene de referência (endógeno/constitutivo) escolhido foi a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT), a qual é continuamente expressa em todas as células e que, em experimentos-piloto, não mostrou alterações significativas com o treinamento, com a hipertensão e com a idade dos animais (ZAMPIERI, 2011).

3.7 Primers utilizados e seus testes de linearidade e eficiência

Os primer do GAD65, GAD67 e Vglut2, e seus respectivos tamanhos (pares de base) estão listados na Tabela 1. Estes foram desenhados de forma cuidadosa para obter especificidade e alta qualidade, evitando-se a formação de *hairpin*, *dimer*, *false priming* e *cross dimers*.

Os primers indicados na Tabela 1 foram testados para se determinar a linearidade e eficiência das respectivas reações de PCR em todas as regiões analisadas neste estudo (PVN, DBS e VBS). Para tanto, diluímos serialmente uma amostra de cDNA , nas proporções 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, para realização de PCR em tempo real. A linearidade foi calculada pelos Cts de amplificação das diluições, sendo considerada linear para R^2 próximo de 1. Neste teste também verificamos a eficiência da reação para cada gene, usando da fórmula abaixo (1):

$$Eff= [10^{(-1/inclinação)}-1] \qquad (1)$$

Tabela 1. Sequência dos primers para HPRT, GAD65, GAD67 e VGlut2 com suas respectivas temperaturas de anelamento (TM), tamanho do fragmento (Amplicom, em pares de bases).

Gene	Primers	TM (°C)	Amplicon
HPRT	F: 5'- 3'TTTGCTGACCTGCTGGATTAC	53	125
	R: 5'-3'ACTTTTATGTCCCCCGTTGA	51	
GAD65	F: 5'- 3'GGCAGACCAACCGCAAAATC	55	138
	R: 5'-3'CAATCTGCTGCTAATCCAACCAT	53	
GAD67	F: 5'- 3'GGTCAAATAAAGATGGTGATGGGA	53	136
	R: 5'-3'AGGACCAGTTTGGGCACAGC	57	
VGlut2	F: 5'- 3'GGTAAGGCTGGACACGAG	51	121
	R: 5'-3'AGCACCCTGTAGATCTGTCC	52	

FONTE: Ruggeri (2011)

3.8 Técnica de Imunofluorescência

Para obtenção dos tecidos encefálicos, após os registros funcionais (~3-4 animais/grupo experimental) os animais foram anestesiados e perfundidos como descrito anteriormente (início do item 3.5.1), com exceção do fluido de perfusão. Para a fixação foi utilizado primeiramente perfusão com tampão fosfato (PBS 0,01M, ~100 ml, pH 7,4, ~20 ml/min), seguido do fixador (paraformaldeído 4%, PBS a 0,01M, ~400mL, ~ 10 ml/min). Em seguida os animais foram decapitados para remoção do cérebro. O cérebro foi pós-fixado em paraformaldeído 4% em PBS 0,01M, pH 7,4, por 4 horas e depois crioprotegido em sacarose 30% em PBS a 4 ºC por 2-3 dias. A seguir os encéfalos foram blocados e armazenados a -80 ºC.

Blocos contendo o hipotálamo e tronco encefálico foram colocados no pedestal do criostato (Leica, CM3050, Germany), com auxílio de gel (Tissue Freezing Médium- TBS). Cortes sequenciais de 30 μm abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse foram obtidos e utilizando-se as localizações anatômicas descritas por Paxinos e Watson (2009) (PVN de 1,3 a 2,3 mm; DBS de 13,6 a 14,3 mm e VBS de 11,6 a 13,2 mm, todos em relação ao bregma). Os cortes coronais foram coletados sequencialmente em poços de placa de cultura (Falcon 3047) contendo PBS a 0,01M (pH 7,4). Posteriormente, foram lavados e

armazenados em solução antifrizze (150g de sacarose, 500ml de PBS 0,05M e pH7,4, 300 ml de etilenoglicerol), no congelador a -20 ºC.

Assim, após todos os cérebros terem sidos cortados demos o início ao protocolo de imunofluorescência que incluía as seguintes etapas: pré-tratamento, pré-incubação (usados para diminuir a possibilidade de ligações inespecíficas), incubação com anticorpos primários, incubação com anticorpos secundários, montagem das lâminas e aquisição das imagens.

No pré-tratamento, os cortes foram lavados durante 20 min com PBS 0,1M (pH 7,4) e depois foram colocados em 1% de borohidreto de sódio (Sodium Borohydrite, approx. 98%, Sigma, S-9125, Lot. 38H3440) em PBS 0,01M (pH 7,4), durante 10 min. Posteriormente, foram lavados novamente com PBS 0,1M (pH 7,4) durante 20 min, colocados em 1% de peróxido de hidrogênio com 10% de álcool metílico em PBS 0,01M (pH 7,4) durante 20 min e, a seguir, lavados com PBS 0,1M (pH 7,4) durante mais 20 min.

Já na pré-incubação, os tecidos foram colocados durante 30 min em solução com 2% de soro específico diluído em PBS 0,01M (pH 7,4). Para os cortes destinados para marcação de GAD65 e GAD67 usamos soro de cabra (Normal Goat Serum, 60 mg/ml, Cód. 005-000-121, Jackson Immuno Research), enquanto para VGlut2 usamos soro de burro (Normal Donkey Serum S30, Lot.NMM1609452).

Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários com 2% de soro específico (para GAD65 e GAD67 o soro de cabra e para VGlut2 soro de burro) e 3% de Triton 10% em PBS 0,01M (pH 7,4). Os anticorpos utilizados nesta etapa, suas especificações comerciais e diluições estão expostos na tabela a seguir (Tabela 2):

Tabela 2. Anticorpos primários, suas especificações comerciais e diluições utilizadas.

Anticorpo primário	Hospedeiro	Concentração utilizada	Catálogo	Lote	Empresa
GAD65	Policlonal em Coelhos	1:5000	AB5082	LV1751362	Millipore
GAD67	monoclonal em camundongo	1:10000	MAB5406	LV1746182	Millipore
VGlut2	Polyclonal em porco da índia	1:10000	AB2251	NG1752506	Millipore

FONTE: Ruggeri (2011)

Para esta incubação dos anticorpos primários, os frascos já com tecidos e soluções, permaneceram durante 3 horas na temperatura ambiente e depois foram colocados na geladeira (4 ºC) durante 48 horas, sendo que durante toda a incubação foram mantidos em frascos acoplados no "carrossel" (tecidos foram banhados com líquido em baixa agitação).

Após este período, para a incubação dos anticorpos secundários (anticorpos que promovem a fluorescência), os cortes foram retirados da geladeira e mantidos durante 30 min na temperatura ambiente e, em seguida, foram lavados com PBS 0,01M (pH 7,4) durante 20 min. Depois foram colocados em solução contento o anticorpo secundário (com diluições específicas para cada marcação), com 1% de soro específico (para GAD65 e GAD67 o soro de cabra e para VGlut2 soro de burro) diluído em PBS 0,01M (pH 7,4), onde permaneceram durante 1 hora (frascos sempre recobertos com papel alumínio, para evitar degradação da marcação). Os anticorpos secundários, suas especificações comerciais e diluições utilizadas estão expostas na tabela que se segue (Tabela 3):

Tabela 3. Anticorpos secundários, suas especificações comerciais e diluições utilizadas.

Anticorpo secundário	Hospedeiro	Anti	Concentração utilizada	Usada para marcação	Catálogo	Lote	Empresa
CY3	cabra	coelho	1:400	GAD65	111-165-003	92153	*
FITC	cabra	Camundongo	1:200	GAD67	115-095-166	84450	*
CY3	burro	Porco da índia	1:400	VGlut2	706-165-148	86928	*

* Jackson ImmnoResearch Laboratories, Inc.
FONTE: Ruggeri (2011)

Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS 0,01M (gelado e pH 7,4) durante 1h30 e somente depois foram colocados na lâmina (uso de pincel). Após ordenação dos cortes de acordo com sequência descrita no Paxinos e Watson (2009), as lâminas foram montadas secas ao ar livre (sem claridade) e depois receberam o vectashield (VECTASHIELD® Mounting Medium, Cat.No. H-10000, Vector Laboratories Inc.), para serem recobertas com lamínula (processo cauteloso, para evitar a formação de bolhas). As lâminas foram armazenadas na geladeira (4 ºC) em caixas escuras.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico de fluorescência (Leica DFC 300FX), objetivas de 20X e 40X, e teve como principais objetivos verificar a expressão protéica do GAD65, GAD67 e VGlut2 e confirmar sua localização nos grupos WKY e SHR

nos diferentes tempos experimentais : S_0 ou T_0, T_8 e T_{12}, escolhidos a partir da análise da expressão gênica.

3.9 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média ± EPM. O desempenho em esteira foi analisado pela ANOVA de 3 fatores (grupo e condição com medidas repetidas no fator tempo).

Para comparação das expressões basais de RNAm de GAD65, GAD67 e VGlut2 nas diferentes áreas estudadas na semana 0, utilizamos a ANOVA fatorial para fatores grupo (WKY e SHR) e área (PVN, VBS e NTS). De forma semelhante, os efeitos do treinamento e do sedentarismo sobre os valores de PA e FC, e sobre a expressão de GAD65, GAD67 e VGlut2 nas diferentes áreas cerebrais nos grupos WKY e SHR foram avaliadas pela ANOVA fatorial (fatores grupo e tempo). Em uma primeira análise comparamos WKY S_0, WKY S_{12}, SHR S_0 e SHR S_{12}; num segundo momento comparamos WKY T_0, WKY T_1, WKY T_2, WKY T_4, WKY T_8, WKY T_{12}, e, SHR T_0, SHR T_1, SHR T_2, SHR T_4, SHR T_8 e SHR T_{12}.

O teste *post hoc* foi o de Fisher LSD. Para estas análises foi utilizado *o software* STATISTIC 7.0 (Stat Soft Inc.). O nível de significância foi fixado em $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do desempenho em esteira

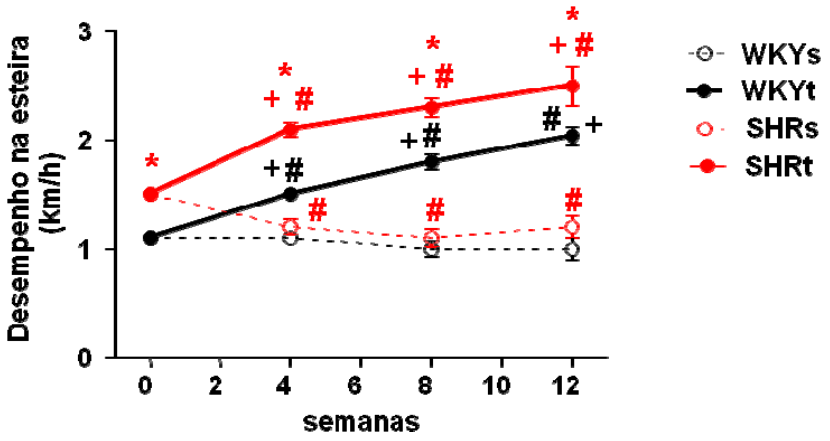
Os dados relativos ao desempenho na esteira (em km/h) e ao ganho de capacidade física (Δkm/h), nos grupos WKY e SHR, sedentários (S) e treinados (T), nas semanas 0, 4, 8 e 12, são apresentados na Tabela 4 e Figura 6.

Tabela 4- Valores obtidos nos testes de esforço máximo em esteira, durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

	WKY		**SHR**	
	S	**T**	**S**	**T**
	(n)	**(n)**	**(n)**	**(n)**
Semanas	**(km/h)**	**(km/h)**	**(km/h)**	**(km/h)**
0	1,10±0,04	1,10±0,03	1,50±0,05*	1,50±0,03*
	(45)	(109)	(38)	(84)
4	1,10±0,05	1,50±0,04# +	1,20±0,07#	2,10±0,07# +
	(25)	(52)	(24)	(46)
8	1,00±0,07	1,80±0,07# +	1,10±0,08#	2,30±0,09# +
	(25)	(40)	(25)	(26)
12	1,00±0,10	2,04±0,08# +	1,20±0,10#	2,50±0,18# +
	(15)	(23)	(17)	(11)
Ganho	(-)0,10±0,06	1,10±0,30	(-)0,30±0,10	1,00±0,20
	(15)	(23)	(17)	(11)

Valores são médios ± EPM. Ganho representa a diferença entre as semanas 12 e zero. Significâncias ($p<0,05$) # *vs* semana 0, + *vs* S, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 6. Evolução temporal no desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada nos testes de esforço) durante os protocolos de treinamento ou sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).



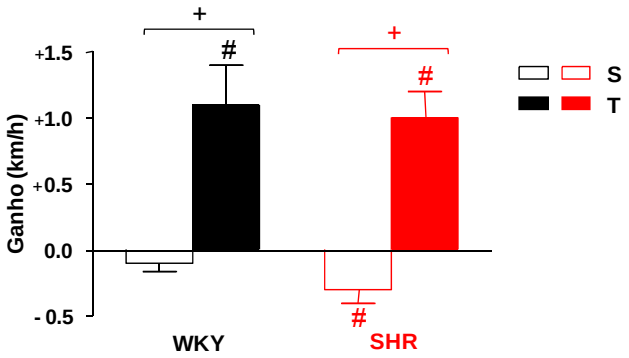
Significâncias ($p < 0,05$) # *vs* semana 0, + *vs* S, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

No início dos protocolos (semana 0) o grupo SHR já apresentava desempenho físico superior ao do grupo WKY, fato observável até o fim dos protocolos (Tabela 4, Figura 6). Além disso, observamos que os grupos SHR sedentário e treinado partem de um mesmo nível inicial de capacidade física (SHR_S: 1,50±0,05 km/h, SHR_T: 1,50±0,03 km/h), a mesma situação sendo observada para os grupos WKY (WKY_S: 1,10±0,04 km/h, WKY_T: 1,10±0,03 km/h) (Tabela 4, Figura 6). Ao longo do protocolo de treinamento tanto os SHR como os WKY apresentaram aumentos paralelos e significativos da velocidade máxima nas semanas 4, 8 e 12, sendo que no último teste atingiram as seguintes velocidades: SHR_T: 2,50±0,18 km/h; WKY_T: 2,04±0,08 km/h. Por outro lado no grupo WKY_S não houve alteração significativa da capacidade máxima durante o protocolo (WKY_S: 1,00±0,10 km/h na semana 12); em contrapartida observou-se nos SHR_S pequena redução do desempenho, já aparente na semana 4, que se manteve até a semana 12, quando os animais atingiram a velocidade de 1,20±0,10 km/h (Tabela 4, Figura 6).

A Figura 7 compara o ganho de capacidade física (diferença de desempenho entre as semanas 12 e 0), demonstrando a eficácia do treinamento em aumentar a capacidade física dos animais treinados em relação ao início do protocolo. Houve aumentos significativos e similares em ambos os grupos treinados (SHR_T: +1,00±0,20 km/h e WKY_T:+1,10±0,30). Os WKY_S não apresentaram alteração significativa (-0,10 ± 0,06km/h) quando comparada com a semana 0, enquanto que os SHR_S apresentaram pequena, mas significativa, perda de

desempenho (-0,30±0,10 km/h). Importante notar que o ganho de desempenho após o treinamento foi similar nos grupos SHR e WKY (Figura 7, Tabela 4).

Figura 7. Efeitos do treinamento (T) e sedentarismo (S) sobre ganho de capacidade física dos animais.



Ganho obtido pela diferença de desempenho entre as semanas 12 e 0.
Significância (P < 0,05) + *vs* S; # diferença significativa entre as semanas 0 e 12
FONTE: Ruggeri (2011)

4.2 Alterações Temporais de PA e FC basais induzidas pelo treinamento

Os dados de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) nos grupos WKY e SHR, submetidos ao treinamento ou sedentarismo são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Valores basais de PA e FC durante os protocolos de treinamento e sedentarismo em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

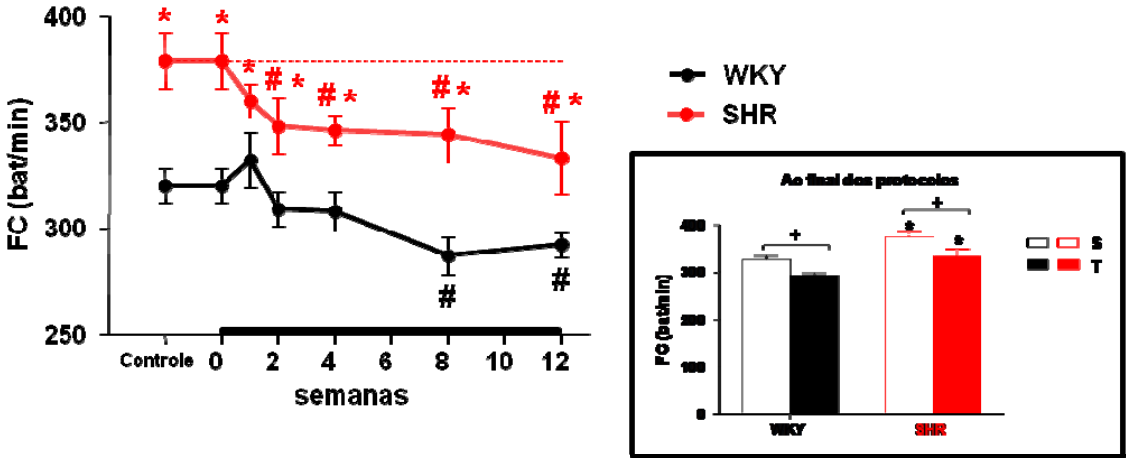
	WKY		SHR	
	PAM (mmHg) (n)	**FC (b/min) (n)**	**PAM (mmHg) (n)**	**FC (b/min) (n)**
Controle	123±1 (15)	320±8 (15)	177±2* (15)	379±13* (14)
T_1	122±1 (7)	332±13 (7)	179±3* (7)	360±8* (7)
T_2	121±2 (15)	309±8 (15)	175±3* (12)	348±13# * (12)
T_4	122±3 (14)	308±9 (14)	178±2* (12)	346±7# * (12)
T_8	122±2 (15)	287±9# (15)	169±3#* (10)	344±13# * (10)
T_{12}	128±1 (18)	292±6# + (12)	170±2# +* (10)	333±17# * + (10)
S_{12}	129±2 (14)	326±9 (13)	181±2* (16)	375±10* (17)

Valores são médios ± EPM. S_{12} indica os dados referentes aos sedentários na 12ª.semana.
Significâncias (p< 0,05) * *vs* WKY. # *vs* Controle, + *vs* S12
FONTE: Ruggeri (2011)

No inicio dos experimentos os SHR_S *vs* WKY_S apresentavam valores mais elevados de PA (177±2 *vs* 123±1mmHg) e de FC (379±13 *vs* 320±8b/min) (Tabela 5). O treinamento determinou queda gradativa da FC dos grupos WKY e SHR (Tabela 5, Figura 8). Nos WKY_T observou-se queda significativa de 10% na 8ª.semana (287±9 b/min), a qual foi mantida até a 12ª.semana (292±6 b/min). Por sua vez, os SHR_T apresentaram queda mais precoce da FC basal, significativa a partir da 2ª.semana (348±13 b/min, correspondendo a redução de 8%) a qual se manteve entre a 4ª. e 8ª.semana (346±7 b/min e 344±13 b/min, respectivamente), com ligeira redução adicional na 12ª.semana (333±17 b/min, correspondendo a uma redução de 12% na FC basal; Figura 8). Quando comparamos os grupos sedentários e treinados na

12ª.semana (Anexo à Figura 8), notamos a presença da bradicardia de repouso nos WKY_T (292±6 *vs* 326±9 b/min nos WKY_S, correspondendo a uma redução de 34±7 b/mim), assim como nos SHR_T (333±17 *vs* 375±10 b/min nos SHR_S, correspondendo a uma redução de 42±13 b/min), comprovando a eficácia do treinamento aeróbio. Observamos, no entanto, que durante e mesmo após o treinamento, os SHR sempre apresentaram níveis de FC mais elevados que os respectivos WKY (Figura 8).

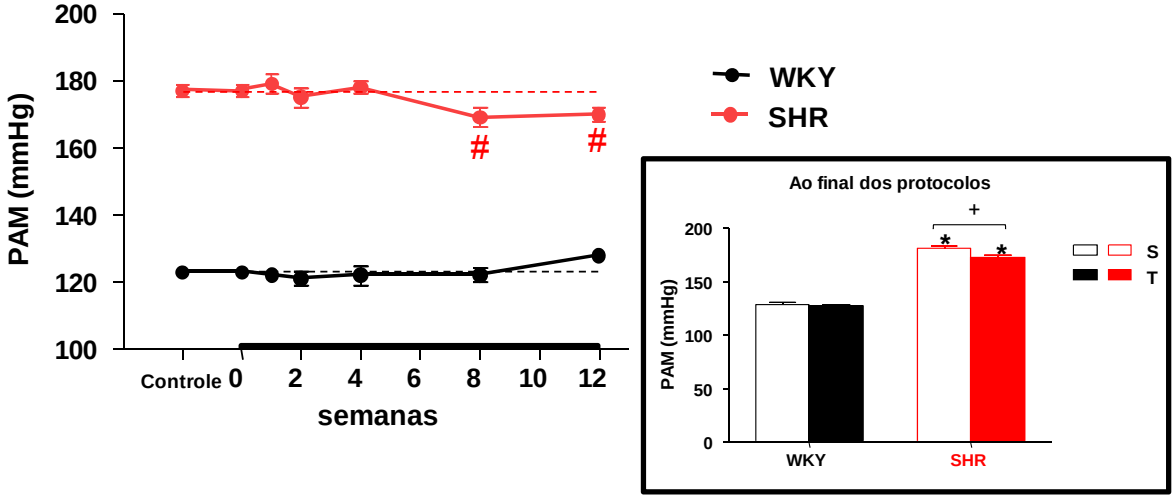
Figura 8. Evolução temporal FC basal durante o treinamento em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, valores da FC basal ao final dos protocolos de treinamento e sedentarismo, em WKY e SHR. Significâncias ($p<0,05$) * *vs* WKY # *vs* Controlo, + *vs* S_{12}.
FONTE: Ruggeri (2011)

Em relação à PA, deve-se notar que os experimentos foram iniciados quando os animais tinham 3 meses de idade e que, portanto, os SHR já se encontravam na fase estabelecida da hipertensão (PAM= 177±2 mmHg, Tabela 5), enquanto que os WKY pareados por idade apresentavam PAM de 123±1 mmHg. O treinamento aeróbio determinou queda de pequena magnitude, mas significativa na PAM nos SHR_T a partir da 8ª.semana (169±3 mmHg, correspondendo à redução de 5%) que se manteve até a 12ª.semana (170±2 mmHg, Figura 9, Tabela 5).

Figura 9. Evolução temporal PA basal durante o treinamento em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, valores da PA basal no final dos protocolos de treinamento e sedentarismo, em WKY e SHR. Significâncias ($p < 0,05$) # *vs* semana 0, + *vs* controles sedentário, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

A comparação entre SHR_S e SHR_T na 12ª.semana (Anexo à Figura 9), indica uma diferença da PAM de 6% entre os treinados e sedentários (SHR_T=170±2 *vs* SHR_S=181±2 mmHg). Nenhuma alteração significativa de PAM foi observada ao longo das doze semanas no grupo WKY_T (Tabela 5, Figura 9). Adicionalmente, notamos que durante todo o período experimental a PAM dos SHR foi sempre superior a dos WKY (Figura 9).

4.3 Testes de linearidade e eficiências dos primers

Realizamos testes com os primers GAD65, GAD67, VGlut2 e do HPRT (gene constitutivo) em amostras das três áreas encefálicas estudadas (PVN, DBS e VBS). Para o cálculo das eficiências dos primers, fixamos o *threshold* em 0,03 para obtenção dos valores de Ct, nas diluições seriadas das amostras (1:1, 1:5, 1:10 e 1:20). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 6 e comprovam a linearidade (**$R^2 \approx$ 1,0**) e de eficiência (próximo de 1,0) dos primers utilizados, demonstrando sua adequação ao presente estudo.

Tabela 6: Eficiência e coeficiente de correlação (R^2) obtidos nos testes dos primers do GAD65, GAD67, HPRT e VGlut2 no PVN, DBS e VBS.

Primer	Área cerebral	R^2	Eficiência
GAD65	PVN	0,99	1,0
	DBS	1,00	1,0
	VBS	1,00	1,0
GAD67	PVN	1,00	0,9
	DBS	0,99	1,0
	VBS	0,99	1,0
HPRT	PVN	0,99	1,1
	DBS	0,99	1,0
	VBS	0,99	1,0
VGlut2	PVN	0,99	1,0
	DBS	0,99	1,0
	VBS	0,98	0,8

FONTE: Ruggeri (2011)

4.4 Expressões basais de GAD65, GAD67 e VGlut2 em áreas de controle autonômico em normotensos e hipertensos

Inicialmente, analisamos e comparamos entre WKY e SHR sedentários as expressões basais (controle ou semana 0) de RNAm de GAD65, GAD67 e VGlut2, nas diferentes aéreas estudadas (PVN, DBS e VBS) (Tabela 7).

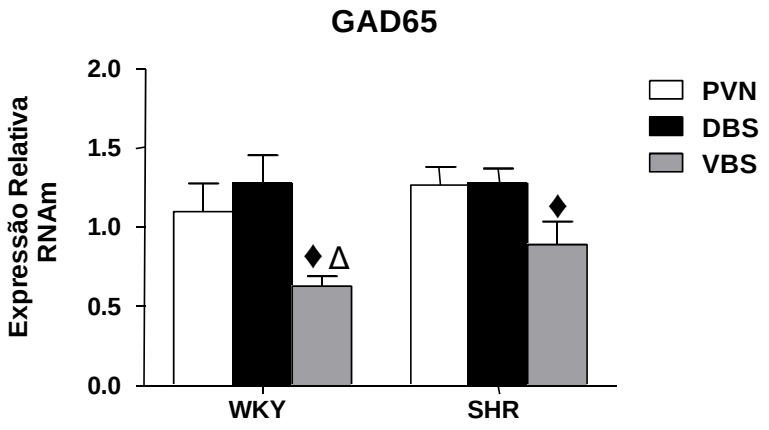
Tabela 7. Valores basais da expressão de RNAm de GAD65, GAD67 e VGlut2 no PVN, DBS e VBS, de WKY e SHR

Valores Basais (Semana 0)						
Área	**WKY**			**SHR**		
	GAD65	**GAD67**	**VGlut2**	**GAD65**	**GAD67**	**VGlut2**
	(n)	**(n)**	**(n)**	**(n)**	**(n)**	**(n)**
PVN	1,10±0,17 (7)	0,73±0,13 (8)	0,22±0,04 (8)	1,26±0,12 (7)	0,80±0,18 (7)	0,19±0,05 (6)
DBS	1,28±0,17 (8)	0,90±0,18 (8)	0,14±0,04 (8)	1,27±0,10 (8)	1,55±0,28$^{\Delta\dagger *}$ (8)	0,50±0,24 (7)
VBS	0,62±0,07$^{\Delta\blacklozenge}$ (7)	0,40±0,09 (7)	0,14±0,02 (7)	0,89±0,14$^{\blacklozenge}$ (8)	0,59±0,17 (8)	0,32±0,19 (7)

Valores são médios ± EPM. Significâncias (P < 0,05); * *vs* WKY, Δ *vs* PVN, ♦ *vs* DBS , † *vs* VBS.
FONTE: Ruggeri (2011)

Ao confrontarmos as expressões de GAD65 no início dos protocolos (Figura 10), notamos que elas eram equivalentes no PVN e DBS de WKY, mas a expressão de RNAm no VBS era 51% menor, quando comparada ao DBS e 43% menor quando comparada ao PVN. O mesmo padrão foi observado nos SHR, ou seja, menor expressão de RNAm de GAD65 foi observada em VBS, que estava 30% reduzida em relação ao DBS e PVN, com diferença significativa sendo observada entre VBS e DBS (Figura 10, Tabela 7).

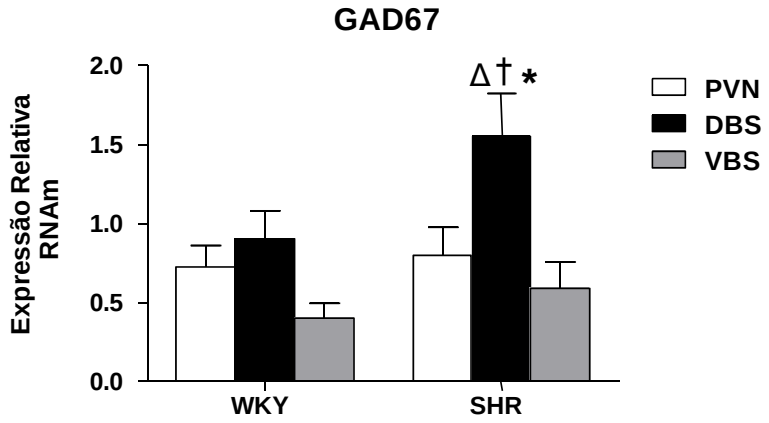
Figura 10. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de GAD65 no PVN, DBS e VBS em WKY e SHR.



Significâncias (P<0,05), Δ *vs* PVN, ♦ *vs* DBS.
FONTE: Ruggeri (2011).

Ao avaliarmos as expressões basais de RNAm de GAD67, também observamos tendência a redução no VBS, mas não houve diferenças significativas nos WKY entre as aéreas estudadas. Nos SHR, a expressão de GAD67 no DBS estava aumentada em 93% quando comparada ao PVN e em 162% quando comparada ao VBS. Além disso, a expressão de GAD67 no DBS de SHR foi significamente maior em relação aos WKY (1,55±0,28 e 0,90±0,18, respectivamente; Figura 11, Tabela 7).

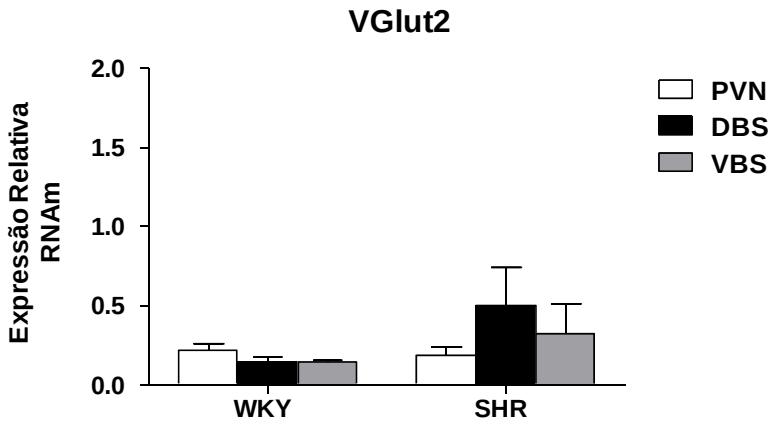
Figura 11. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de GAD67 no PVN, DBS e VBS em WKY e SHR.



Significâncias (P<0,05); * *vs* WKY, Δ *vs* PVN, † *vs* VBS
FONTE: Ruggeri (2011).

Por outro lado, ao compararmos as expressões basais de RNAm de VGlut2, observamos serem estas bastante reduzidas e não notamos diferenças significativas entre áreas (PVN, DBS e VBS) e nem entre as linhagens (WKY e SHR; Figura 12, Tabela 7).

Figura 12. Comparação da expressão basal (semana 0) de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR.



FONTE: Ruggeri (2011).

4.5 Efeitos da hipertensão e do treinamento aeróbio sobre a expressão de GAD65, GAD67 e VGlut2 em áreas autonômicas

4.5.1 Expressão gênica e protéica do GAD65

Na Tabela 8, são apresentados os valores basais da expressão relativa de RNAm de GAD65 no PVN, DBS e VBS, obtidos antes (controle, semana 0) e durante o protocolo de treinamento em WKY e SHR. Para efeito de comparação são também apresentados os valores do grupo sedentário ao final do protocolo (S_{12}).

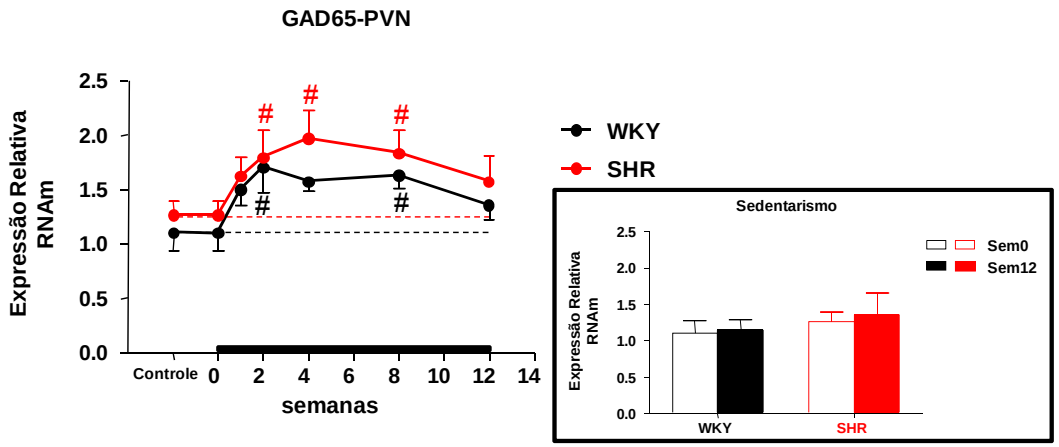
Tabela 8. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de GAD65 no PVN, DBS e VBS, induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.

Grupo	PVN		DBS		VBS	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
Controle	1,10±0,17 (7)	1,26±0,13 (7)	1,28±0,17 (8)	1,27±0,10 (8)	0,62±0,07 (7)	0,89±0,14 (8)
T_1	1,50±0,15 (8)	1,62±0,17 (6)	1,46±0,11 (8)	1,29±0,09 (8)	0,85±0,09 (8)	0,97±0,17 (8)
T_2	1,70±0,23# (7)	1,79±0,25# (7)	1,11±0,14 (8)	1,21±0,18 (8)	1,05±0,14 (8)	0,91±0,08 (8)
T_4	1,57±0,08 (7)	1,97±0,26# (7)	1,31±0,07 (7)	1,34±0,16 (8)	0,97±0,21 (5)	0,91±0,15 (8)
T_8	1,63±0,12# (7)	1,83±0,21# (6)	1,61±0,18 (8)	1,20±0,07 (8)	1,44±0,19# (8)	1,34±0,34 (8)
T_{12}	1,35±0,13 (7)	1,57±0,24 (7)	1,57±0,23 (8)	1,27±0,09 (8)	0,94±0,15 (6)	1,14±0,19 (8)
S_{12}	1,14±0,14 (7)	1,35±0,31 (5)	1,51±0,16 (8)	1,24±0,11 (8)	0,99±0,13 (7)	1,21±0,15 (8)

Valores são média ± EPM. S_{12} indica os valores do grupo sedentário na semana 12; Significância ($P < 0,05$) # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

Observamos que o treinamento aeróbio de intensidade baixa a moderada aumentou significamente a expressão relativa de RNAm de GAD65 no PVN de WKY (Figura 13), em relação ao seu controle basal: houve em T_2 aumentos de 55% (atingiu valor de 1,70±0,23) e de 48% em T_8 (1,63±0,12), que no entanto não se mantiveram até a 12ª.semana. Nos SHR observamos também aumentos significativos em T_2 (42%, atingindo o valor de 1,79±0,25), T_4 (+ 56%, atingindo 1,97±0,26) e T_8 (+ 45%, correspondendo ao valor de 1,83±0,21). Também nos SHR a elevação, induzida pelo treinamento, na expressão de GAD65 no PVN foi de menor magnitude na 12ª.semana, quando os valores não mais diferiam significamente daqueles apresentados no período controle (Figura 13, Tabela 8). Interessante observar que a resposta do GAD65 ao treinamento foi similar entre WKY e SHR. Quanto aos indivíduos sedentários (Anexo à Figura 13) não houve em ambos os grupos quaisquer diferenças entre as semanas 12 e 0.

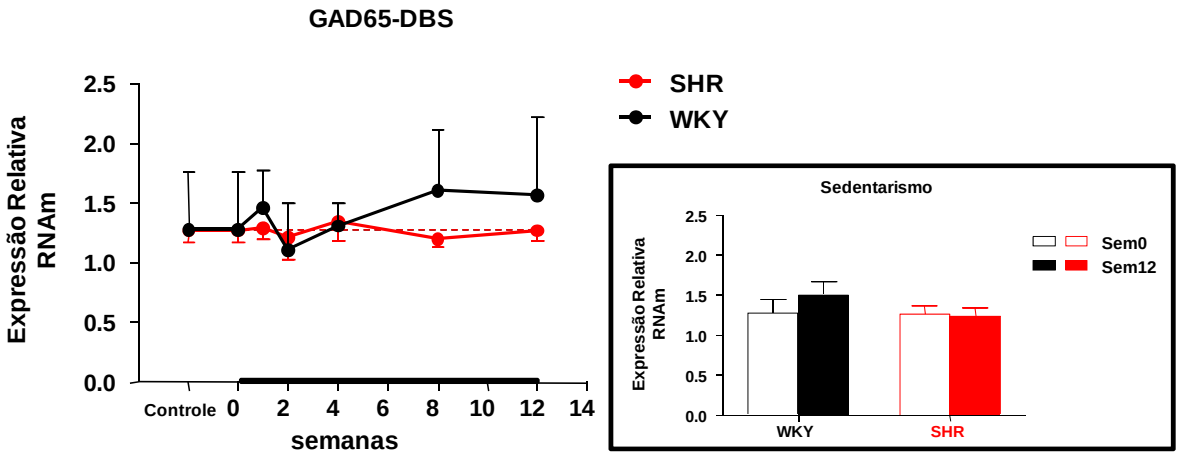
Figura 13. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significâncias (P < 0,05) # *vs* semana 0
FONTE: Ruggeri (2011).

Ao compararmos a expressão relativa de RNAm de GAD65 no DBS (Figura 14, Tabela 8), observamos que tanto em WKY, quanto em SHR não houve alterações expressivas ao longo do treinamento. Da mesma forma, ao compararmos nas semana 0 e 12 os indivíduos sedentários WKY e SHR, não observamos alterações significativas (Anexo da Figura 14).

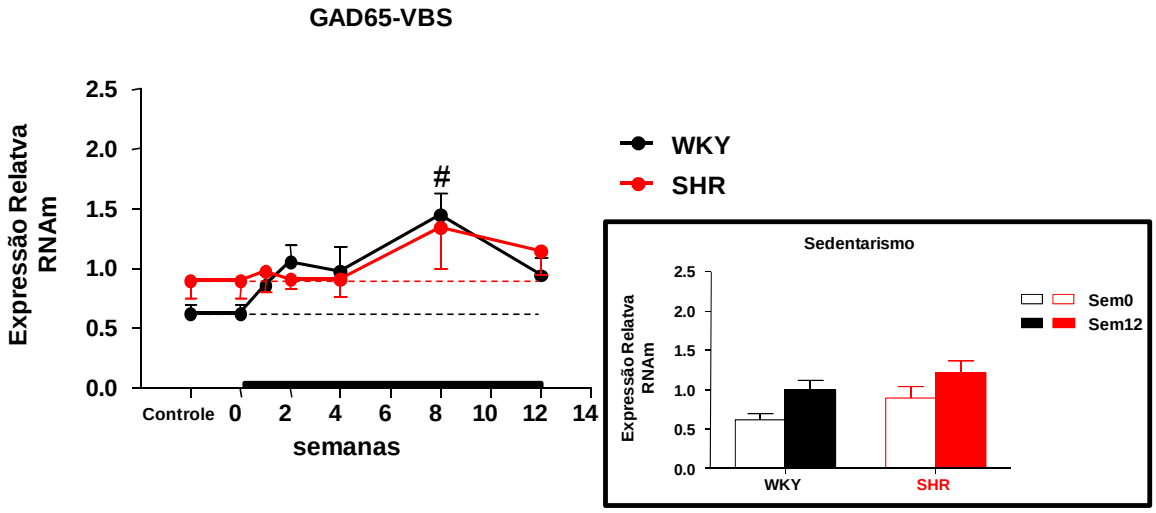
Figura 14. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12.
FONTE: Ruggeri (2011)

Ao confrontarmos a expressão basal de RNAm de GAD65 no VBS (Figura 15, Tabela 8), não observamos diferenças entre SHR e WKY. Também não observamos alterações significativas na expressão de GAD65 durante o treinamento nos SHR, enquanto os WKY apresentaram elevação em T_8, chegando a 1,44±0,19, correspondendo a aumento de 2,3 vezes *vs* a expressão de GAD65 na situação controle. Os ratos mantidos sedentários não apresentaram alterações significativas na 12ª. semana, como ilustrado no anexo da Figura 15.

Figura 15. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD65 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.



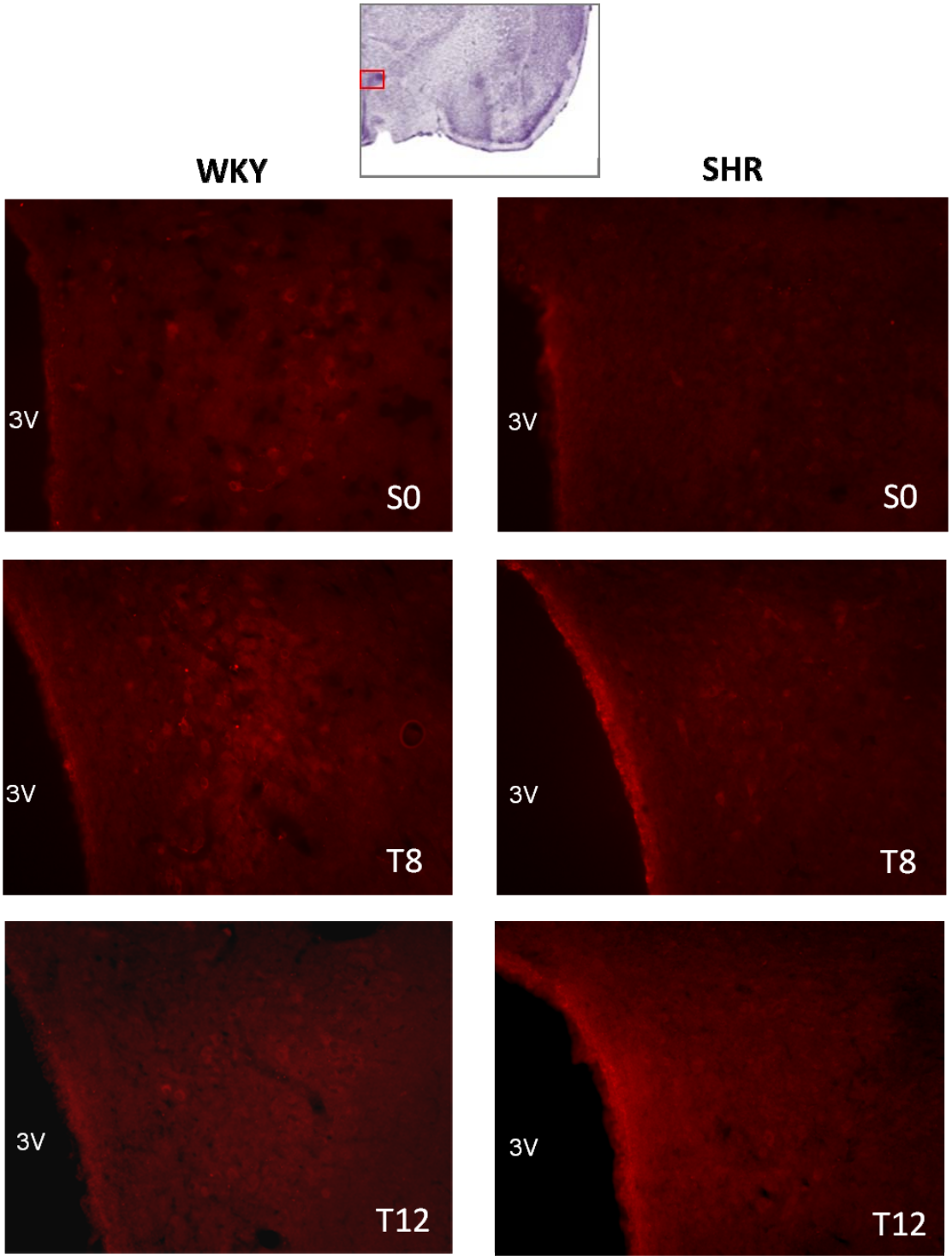
Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significância (P < 0,05) # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

Nas Figuras 16 e 17 ilustram para os grupos WKY e SHR as alterações na expressão protéica de GAD65 induzidas pelo treinamento aeróbio no PVN medial e RVLM, respectivamente. Observamos que para ambos WKY e SHR um intenso aumento da imunofluorescência para GAD65 na 8ª.semana de treinamento, com ligeira redução da imunofluorescência na 12ª.semana (Figura 16). Além disso, pudemos comprovar que estas alterações foram restritas ao PVN, não se alterando em áreas circunvizinhas.

Em relação a imunofluorescência para GAD65 no RVLM, pudemos comprovar aumento de sua expressão protéica na 8ª.semana de treinamento dos WKY (Figura 17), observação que se repetiu nos SHR. Houve nos WKY tendência à redução, mas manutenção da fluorescência na 12ª.semana de treinamento dos SHR (Figura 17).

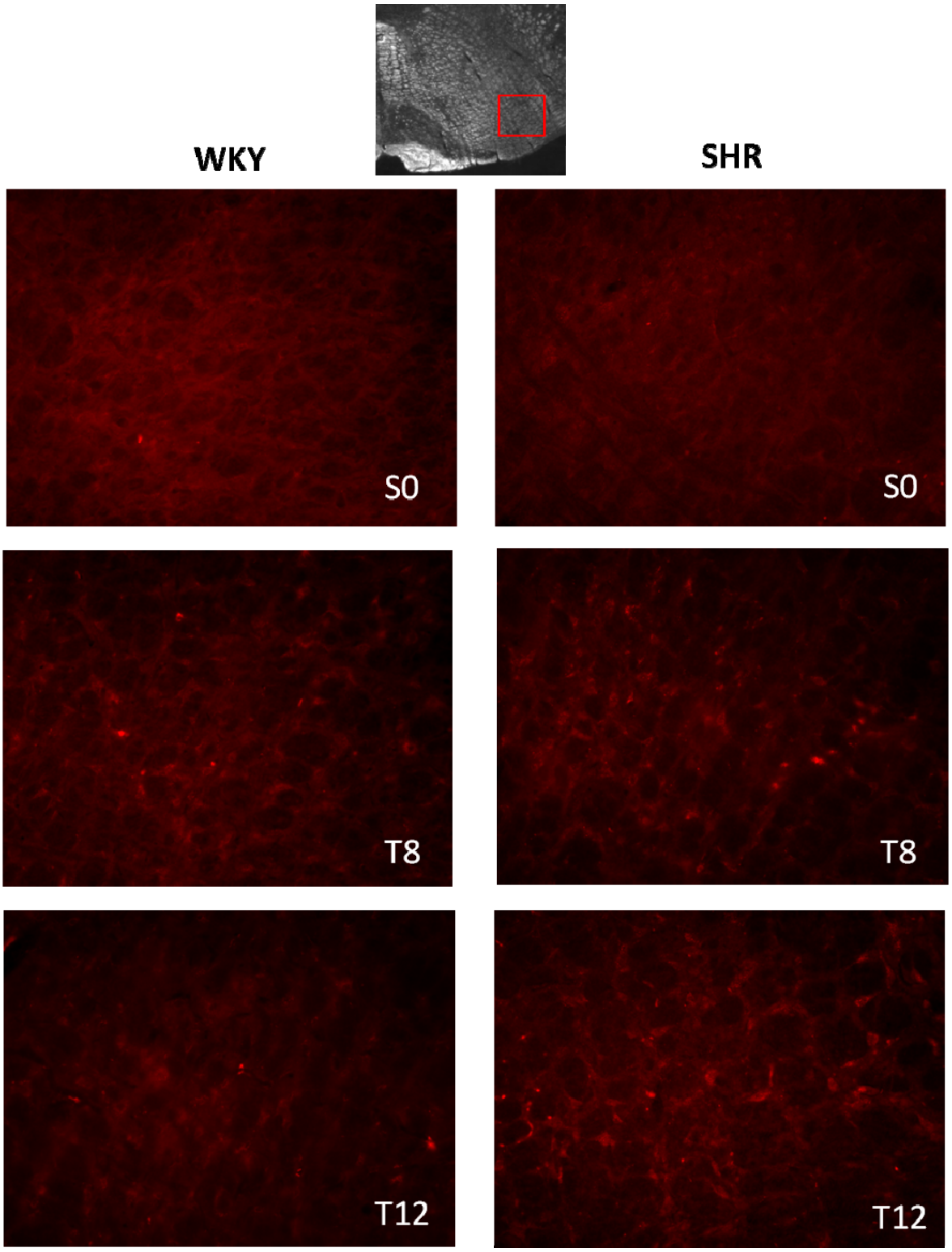
Como ilustrado na Figura 18, tanto no PVN quanto no RVLM o GAD65 encontrava-se essencialmente localizado no corpo celular dos neurônios GABAérgicos.

Figura 16. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD65 no PVN medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior); Acima, vista anterior do corte coronal na região do hipotálamo, com destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.
FONTE: Ruggeri (2011)

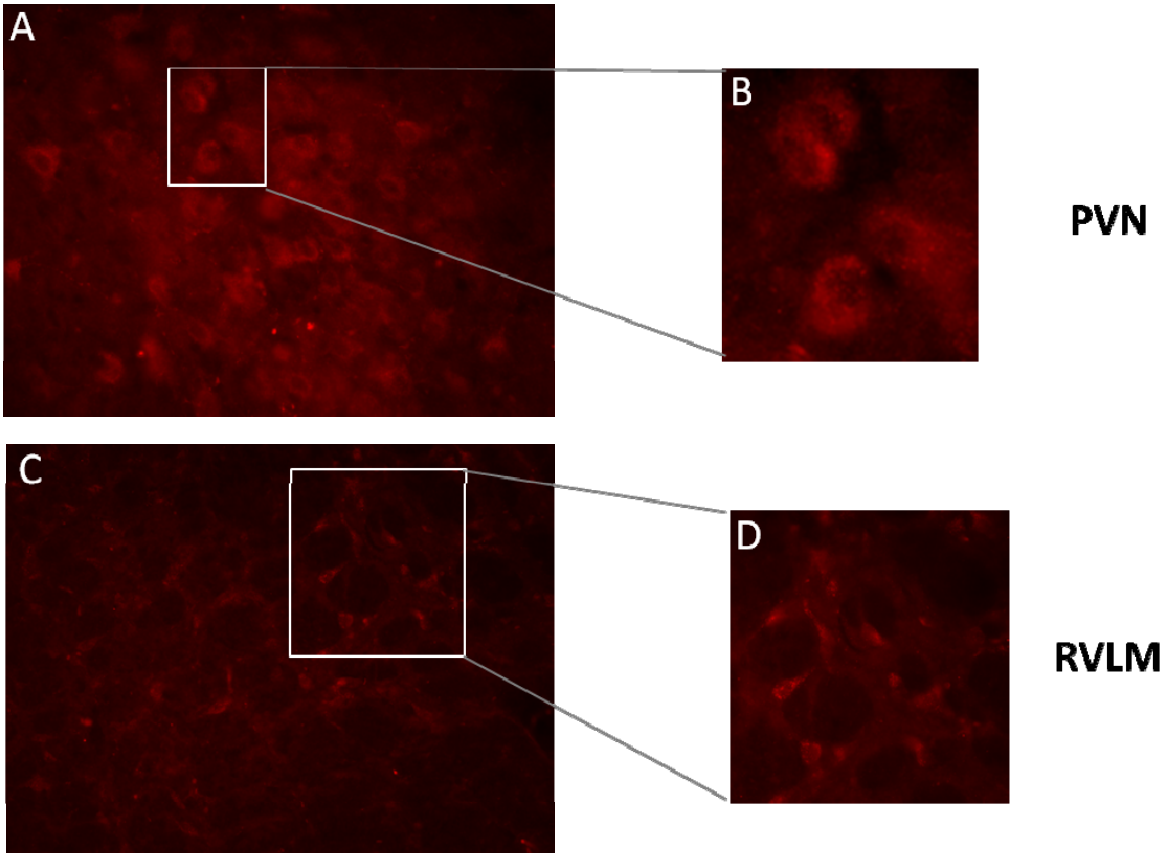
Figura 17. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD65 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.

FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 18. Imunofluorescência para GAD65 no PVN e RVLM em neurônios GABAérgicos.



PVN (A e B) e RVLM (C e D); B e D são ampliações das áreas especificadas em A e C ilustrando a marcação para GAD65 em neurônios GABAérgicos.
FONTE: Ruggeri (2011)

4.5.2 Expressão gênica e protéica do GAD67

Na Tabela 9, são apresentados os valores da expressão relativa de RNAm de GAD67 no PVN, DBS e VBS, em ratos WKY e SHR.

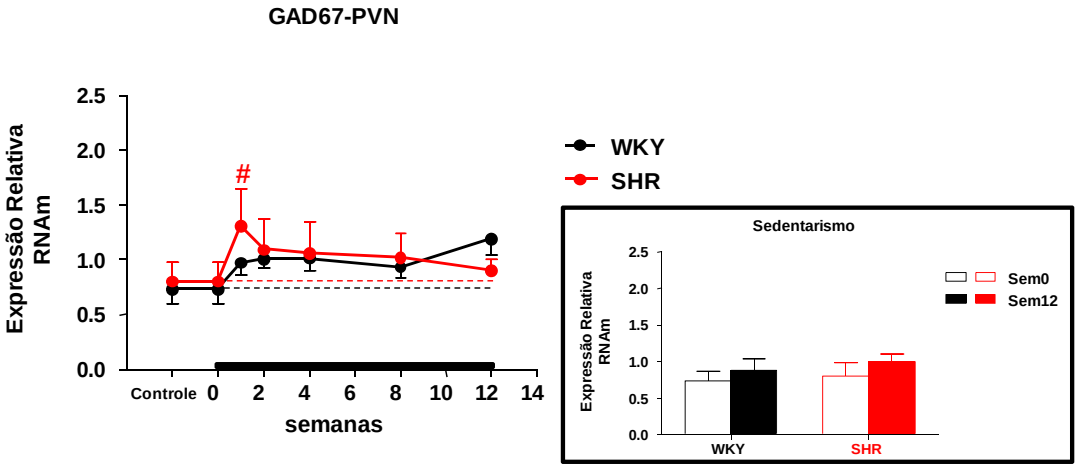
Tabela 9. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de GAD67 no PVN, DBS e VBS, induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.

Grupo	PVN		DBS		VBS	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
Controle	0,73±0,13 (8)	0,80±0,18 (7)	0,90±0,18 (8)	1,55±0,28* (8)	0,40±0,09 (7)	0,59±0,17 (8)
T_1	0,97±0,11 (8)	1,31±0,34# (7)	1,17±0,14 (8)	0,76±0,11# (8)	0,42±0,06 (8)	0,83±0,21 (8)
T_2	1,00±0,07 (8)	1,09±0,28 (8)	0,96±0,20 (8)	0,84±0,26# (6)	0,55±0,09 (8)	1,17±0,26#* (8)
T_4	1,01±0,11 (7)	1,06±0,29 (8)	1,21±0,17 (7)	-	0,34±0,06 (6)	0,58±0,14 (8)
T_8	0,93±0,10 (7)	1,02±0,22 (7)	1,24±0,30 (8)	1,08±0,23 (7)	1,21±0,39# (8)	0,50±0,06* (8)
T_{12}	1,19±0,15 (7)	0,90±0,10 (6)	1,70±0,27# (8)	0,90±0,17*# (8)	0,61±0,06 (7)	1,03±0,22# (8)
S_{12}	0,88±0,15 (7)	0,99±0,11 (8)	1,08±0,12 (7)	1,09±0,16 (8)	0,72±0,14 (7)	0,95±0,19 (8)

Valores são média ± EPM. S_{12} indica os valores do grupo sedentário na semana 12; Significância ($P < 0,05$) # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

Em relação à expressão de GAD67 no PVN (Figura 19), constatamos que o treinamento não provocou mudanças significativas ao longo do tempo em WKY. Contudo, os SHR apresentaram em T_1 elevação transitória, mas significativa, de 64% em relação ao controle basal, alcançando o valor de 1,31±0,34. Observamos que os indivíduos sedentários (Anexo na Figura 16) também não apresentaram quaisquer diferenças na expressão de GAD 67 entre as semanas 0 e 12, nesta área.

Figura 19. Evolução temporal de expressão de RNAm de GAD67 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.

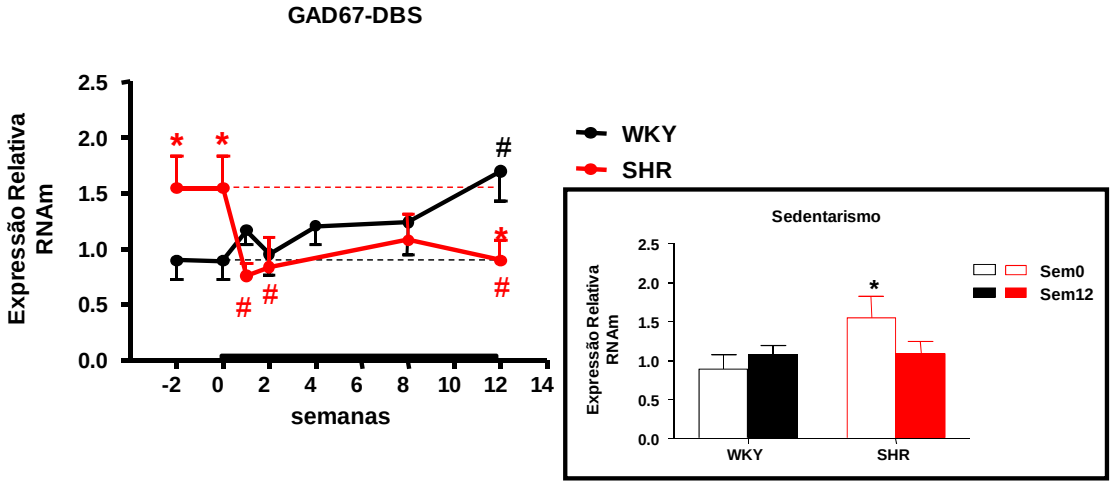


Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. (P < 0,05) # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

Ao avaliarmos a expressão relativa de GAD67 no DBS (Figura 20, Tabela 9), observamos nos WKY, o treinamento tendeu a aumentar a expressão do RNAm do GAD67, a qual atingiu níveis de significância em T_{12} quando comparada ao seu controle (1,70±0,27 *vs* 0,90±0,18, representando um aumento aproximado de 89%).

Por sua vez, os SHR sedentários que exibiam elevada expressão de GAD67 no DBS (*vs* WKY), apresentaram resposta inversa ao exercício. Houve grande redução na expressão relativa de RNAm de GAD67 em T_1 e T_2 com quedas significativas de 51% e 46%, respectivamente, que se mantivaram até T_{12}, - 42% (valores na Tabela 9, Figura 20). Em T_{12} observamos reversão da expressão de GAD67 no DBS, quando comparado aos controles sedentários: menor nos SHR (0,90±0,17) e maior nos WKY (1,70±0,27). O sedentarismo não causou quaisquer alterações no grupo WKY (anexo da Figura 20), mas determinou normalização da expressão de GAD67 no DBS de SHR.

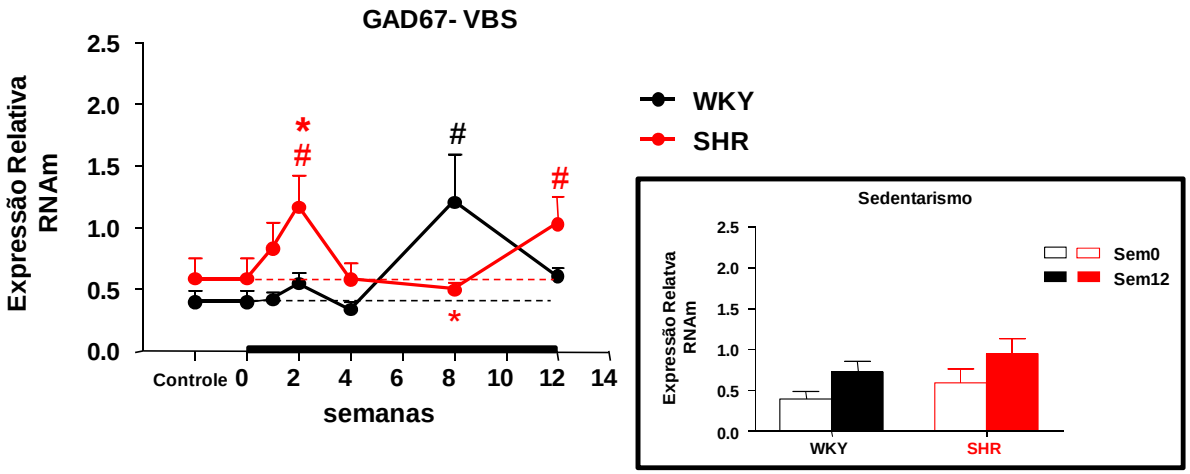
Figura 20. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD67 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significâncias (P < 0,05) # *vs* semana 0, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

Analisando a expressão relativa de RNAm de GAD67 no VBS (Figura 21, Tabela 9), notamos que durante o treinamento os WKY apresentaram um aumento significativo em T_8, quando atingiram 1,21±0,39 (elevação de 3 vezes quando comparados ao controle, Tabela 9). Esta elevação, no entanto não se manteve em T_{12}. Também, nos SHR o treinamento determinou expressão elevada de GAD67 nos tempos T_2 e T_{12} (elevações de 98% e 75%, respectivamente, quando comparados seu controle, Tabela 9). Adicionalmente, não houve alteração da expressão de GAD67 nos grupos sedentários (Anexo da Figura 21).

Figura 21. Evolução temporal da expressão de RNAm de GAD67 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.



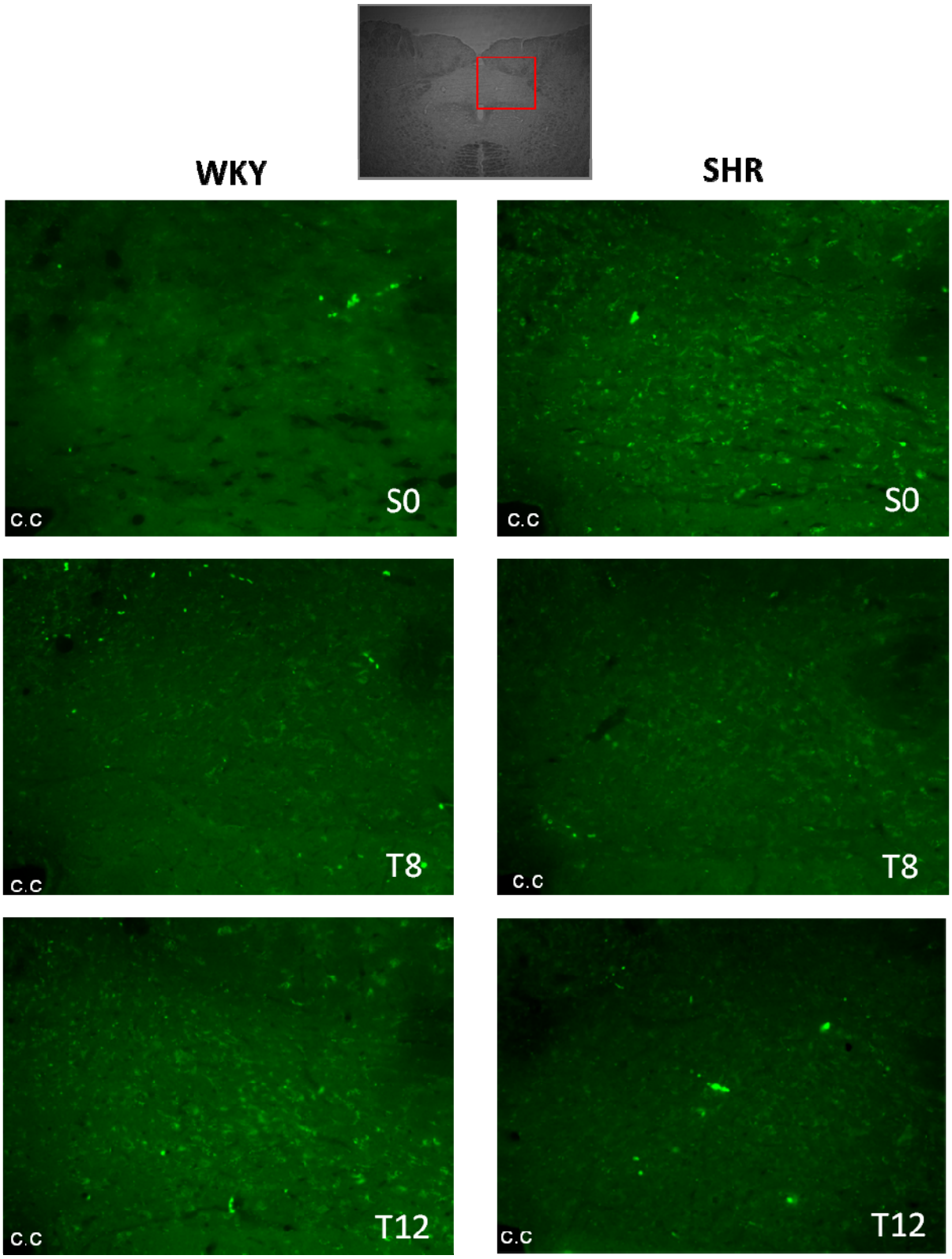
Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significâncias (P < 0,05) # *vs* semana 0, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

Nas Figuras 22, 23 e 24 comparamos em WKY e SHR as alterações na expressão protéica do GAD67 induzidas pelo treinamento aeróbio no NTS caudal e medial (Figuras 22 e 23, respectivamente) e no RVLM (Figura 24). Comprovamos em S_0 (controle) a maior expressão protéica de GAD67 no NTS de SHR (*vs* WKY) (Figuras 22 e 23). Observamos também o intenso aumento da imunofluorescência na 12ª.semana do treinamento nos WKY e a redução da imunofluorescência para GAD67 no NTS medial e caudal dos SHR treinados, detectável na 8ª. e 12ª. semanas.

Quanto à expressão protéica de GAD67 no RVLM, observamos que o treinamento aeróbio induziu aumento da imunofluorescência em T_8 do WKY e em T_{12} dos SHR (Figura 24).

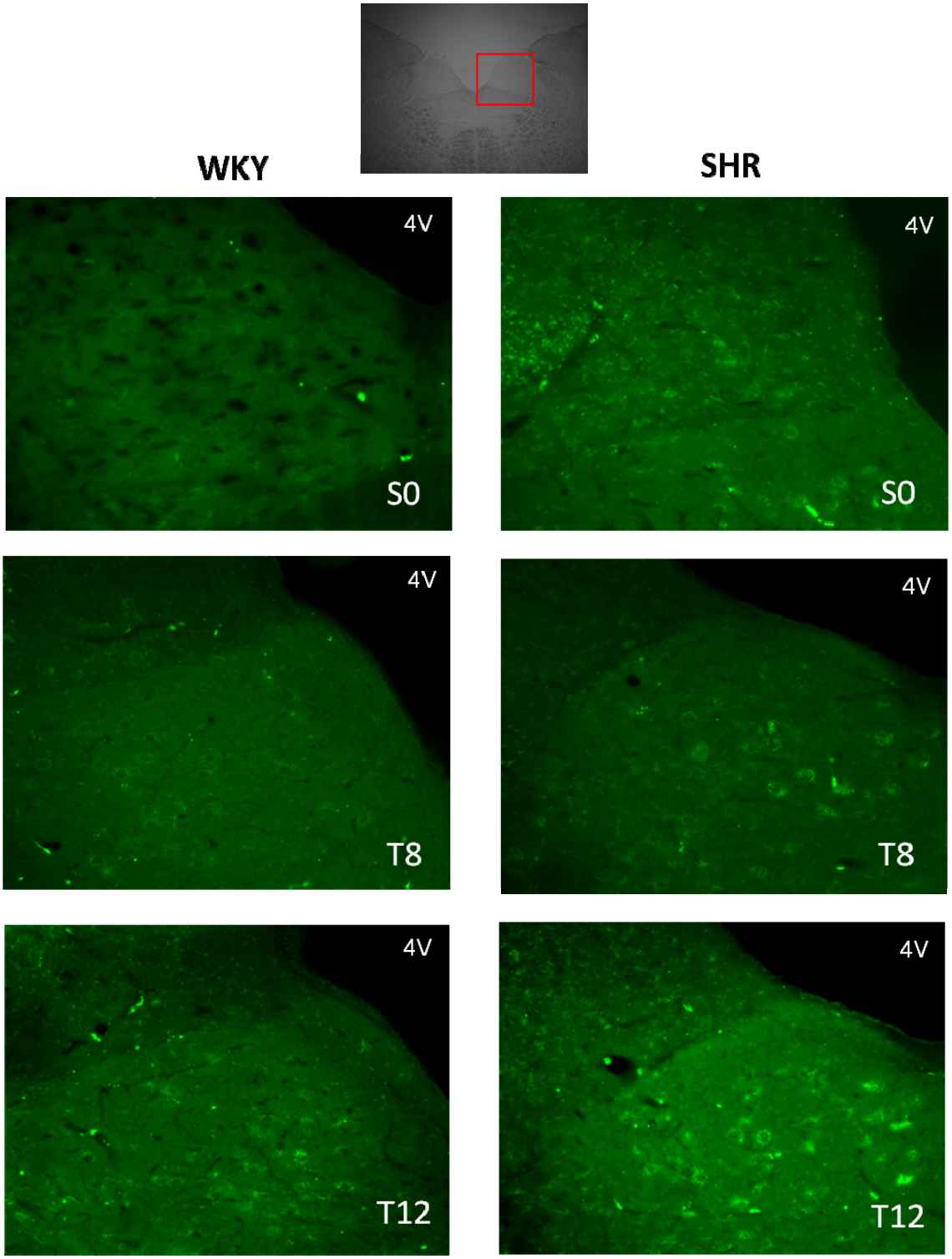
Também para áreas bulbares o GAD67 localizava-se preferencialmente no corpo celular de neurônios GABAérgicos, como ilustrado na Figura 25.

Figura 22. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD67 no NTS caudal de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



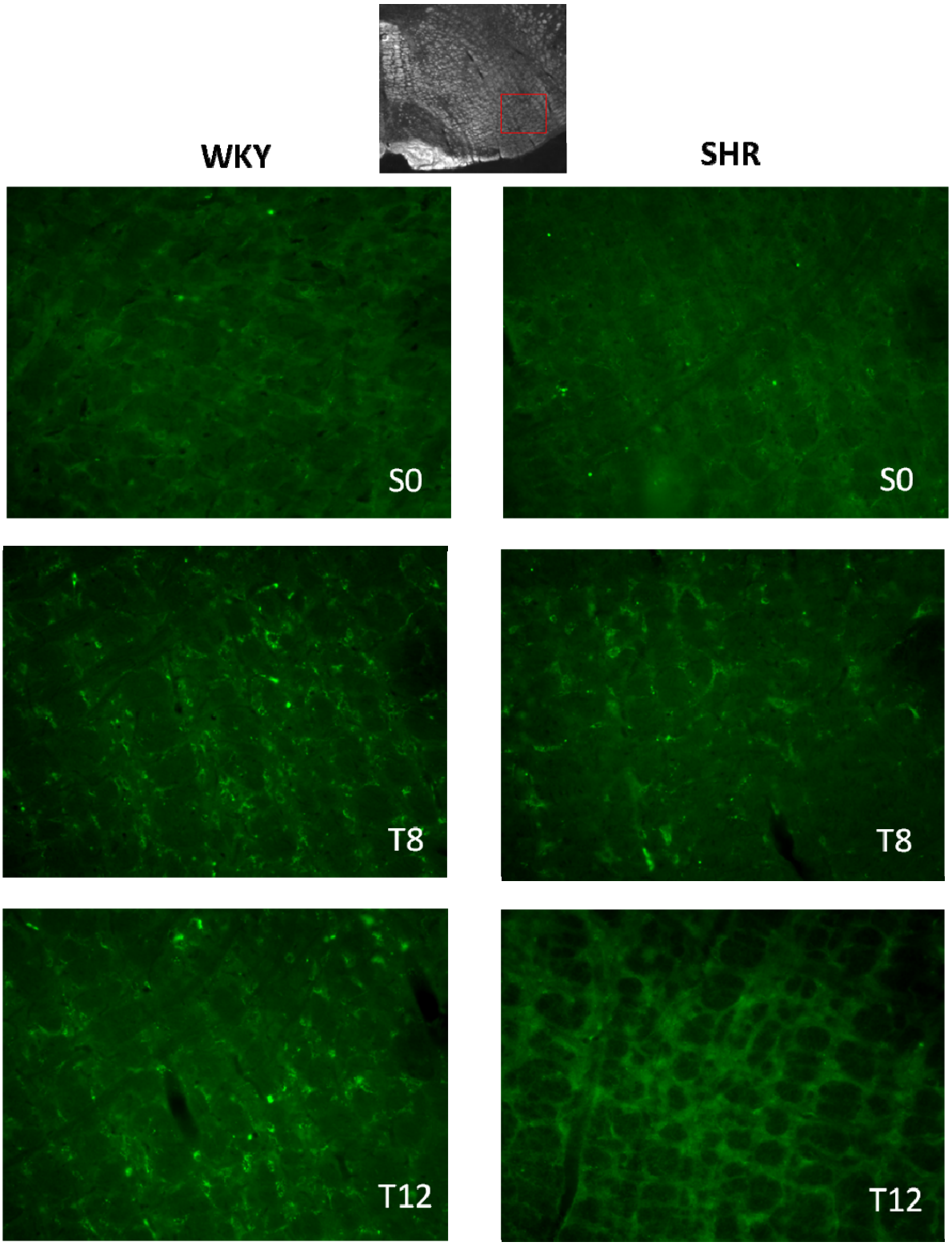
WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.
FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 23. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência para GAD67 no NTS medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



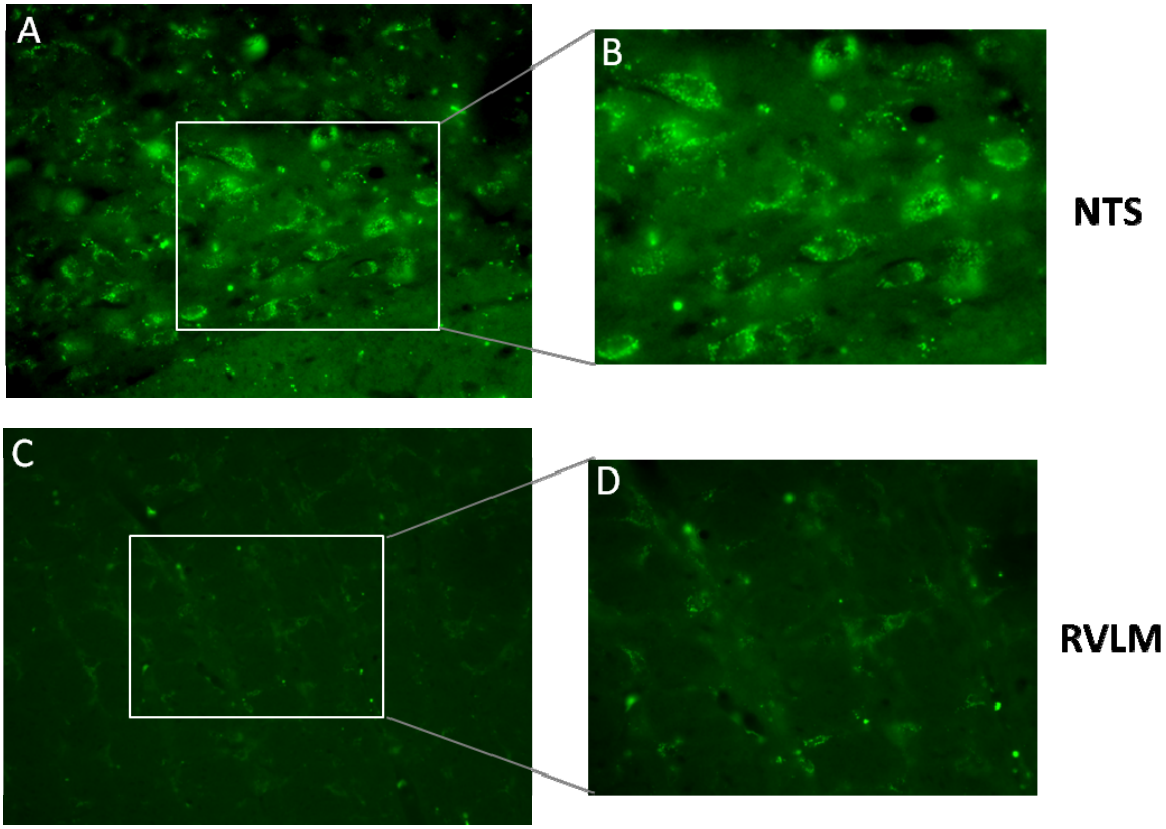
WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.
FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 24. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência com marcação para GAD67 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.
FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 25. Imunofluorescência para GAD67 no NTS e RVLM em neurônios GABAérgicos



NTS (A e B) e RVLM (C e D); B e D são ampliações das áreas especificadas em A e C, ilustrando a marcação em neurônios GABAérgicos
FONTE: Ruggeri (2011)

4.5.3 Expressão gênica e protéica de VGlut2

Na Tabela 10, são apresentados os valores da expressão relativa de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS, em WKY e SHR.

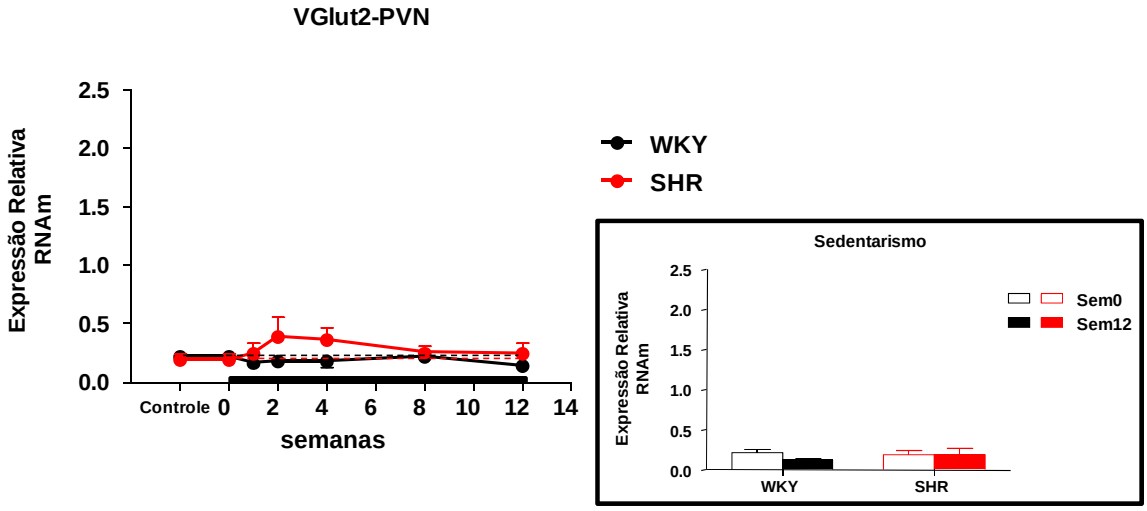
Tabela 10. Valores basais e alterações temporais da expressão de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS, induzidas pelo treinamento em WKY e SHR.

Grupo	PVN		DBS		VBS	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
Controle	0,22±0,04 (8)	0,19±0,05 (6)	0,14±0,04 (7)	0,50±0,24* (8)	0,14±0,03 (7)	0,32±0,19 (7)
T_1	0,16±0,02 (8)	0,24±0,10 (8)	0,11±0,02 (8)	0,19±0,05# (8)	0,13±0,02 (8)	0,16±0,07 (8)
T_2	0,18±0,02 (8)	0,39±0,17 (8)	0,17±0,05 (8)	0,26±0,13 (8)	0,10±0,02 (7)	0,30±0,10 (8)
T_4	0,18±0,06 (7)	0,36±0,10 (6)	0,13±0,03 (7)	0,32±0,09 (8)	0,07±0,01 (7)	0,34±0,15 (6)
T_8	0,22±0,04 (8)	0,25±0,06 (7)	0,18±0,04 (8)	0,39±0,19 (8)	0,12±0,03 (6)	0,72±0,25#* (8)
T_{12}	0,14±0,03 (8)	0,24±0,10 (7)	0,09±0,01 (8)	0,30±0,05 (7)	0,46±0,14 (8)	0,59±0,24 (7)
S_{12}	0,12±0,02 (6)	0,19±0,08 (6)	0,21±0,03 (8)	0,38±0,12 (8)	0,39±0,07 (8)	0,43±0,16 (8)

Valores são média ± EPM. S_{12} indica os valores do grupo sedentário na semana 12; Significância ($P < 0,05$) # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011).

No PVN, não observamos nos grupos WKY e SHR alterações marcantes na expressão de VGlut2 ao longo do treinamento (Figura 26, Tabela 10). Também não se observaram alterações significativas nos grupos mantidos sedentários por 12 semanas (Anexo da Figura 26).

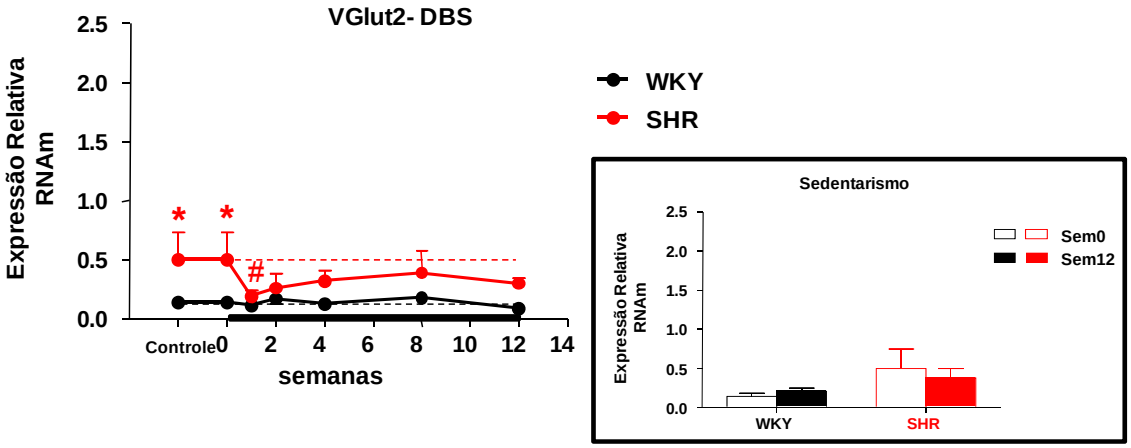
Figura 26. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no PVN ao longo do treinamento em WKY e SHR.



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12.
FONTE: Ruggeri (2011).

No DBS, a expressão relativa de RNAm de VGlut2 (Figura 27, Tabela 10), mostrou-se mais elevada em SHR do que em WKY ($WKY_{controle}$=0,14±0,04 e nos $SHR_{controle}$=0,50±0,24). Nos WKY a expressão relativa de RNAm de VGlut2 não foi alterada pelo treinamento, enquanto que nos SHR, houve uma queda transitória mas significativa em T_1, atingindo valores de 0,19±0,05. Ao comparamos a expressão de RNAm de VGlut2 entre WKY e SHR nas semanas 0 e 12 de sedentarismo, não observamos diferenças significativas no DBS (Anexo da Figura 27).

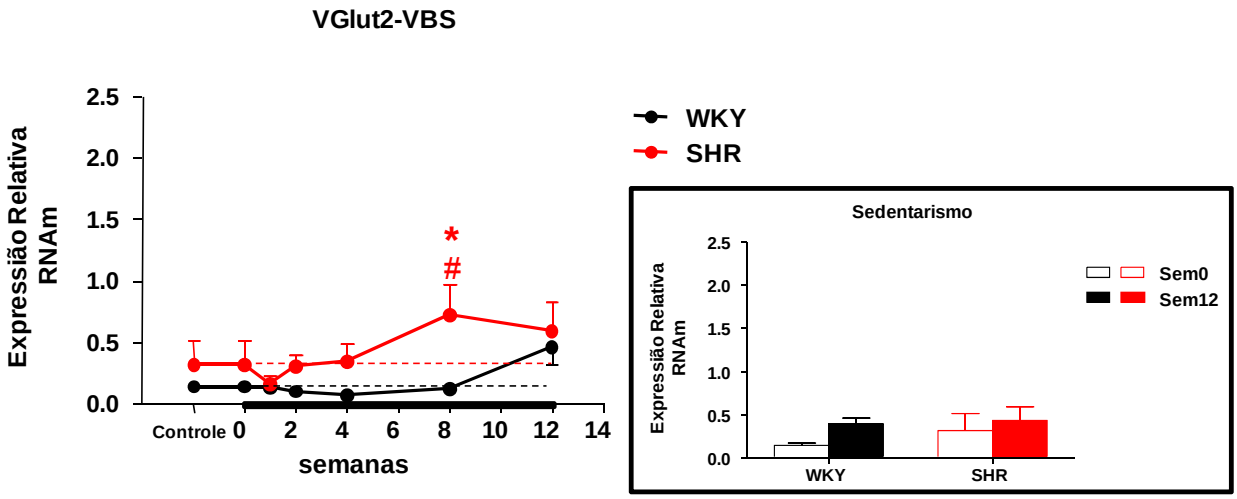
Figura 27. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no DBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.



Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significâncias ($P < 0,05$), * *vs* WKY, # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

A evolução temporal da expressão relativa de RNAm de VGlut2 no VBS (Figura 28, Tabela 10), mostra que nos WKY não houve alteração significativa ao longo das 12 semanas, enquanto os SHR houve tendência a aumento de sua expressão a partir da 4ª.semana, atingindo níveis de significância em T_8 (0,72±0,25, uma elevação de 2,3 vezes em relação ao controle, Tabela 10). Em T_8 o valor do VGlut2 nos SHR foi 6 vezes maior que os dos WKY. No VBS de WKY e SHR a expressão de VGlut2 também não foi alterada pelo sedentarismo (Anexo da Figura 28).

Figura 28. Evolução temporal da expressão de RNAm de VGlut2 no VBS ao longo do treinamento em WKY e SHR.

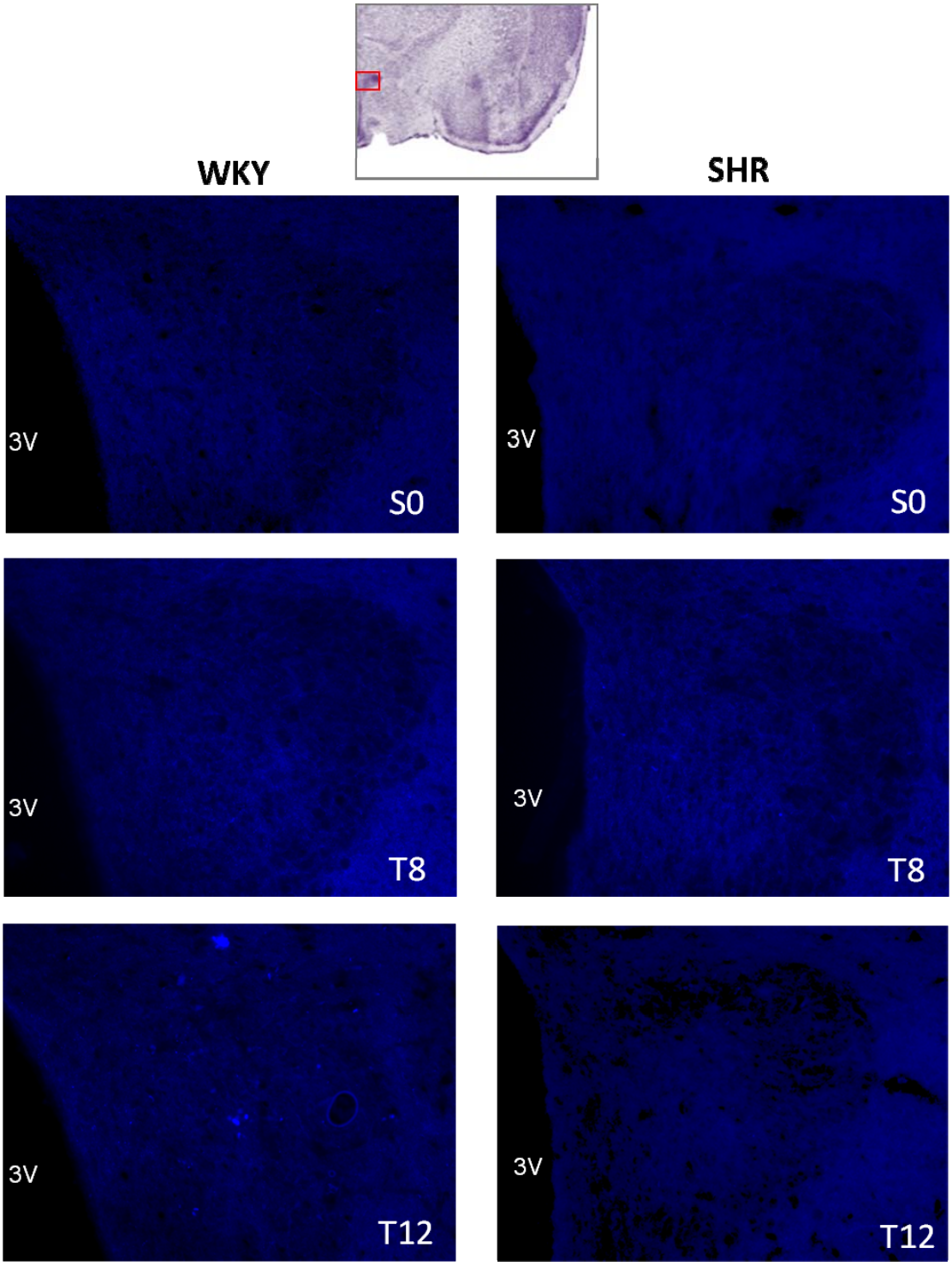


Barra transversal indica duração do treinamento. No anexo, comparação da expressão de RNAm em sedentários nas semanas 0 e 12. Significâncias (P < 0,05) # *vs* semana 0, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

As Figuras de 29 à 32 ilustram para os grupos WKY e SHR a expressão protéica do VGlut2 no PVN (Figuras 29), NTS caudal e medial (Figura 30 e 31, respectivamente) e RVLM (Figura 32). Observamos no NTS medial de SHR (Figura 31) maior imunofluorescência para VGlut2 quando comparado aos WKY na fase inicial dos protocolos (Semana 0).

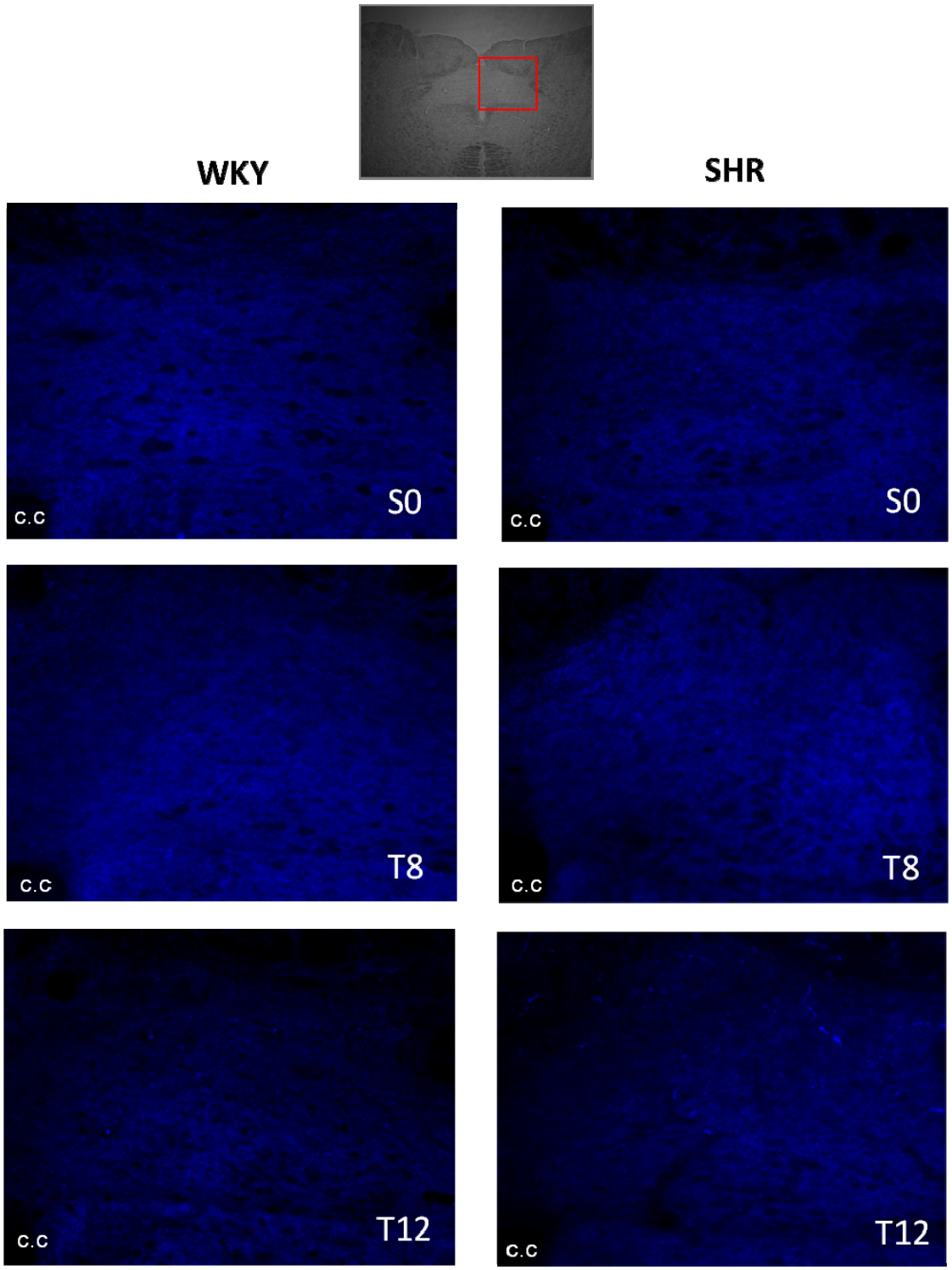
Por outro lado, o treinamento não causou no PVN e NTS de WKY e SHR (Figuras 29 e 30) e no RVLM de WKY (Figura 32) alterações marcantes de imunofluorescência para VGlut2. Houve apenas aumento da imunofluorescência do VGlut2 no RVLM de SHR submetidos ao treinamento aeróbio, como observado nas semanas 8 e 12 do treinamento (Figura 32). Em maior aumento (Figura 33) podemos observar a presença de VGlut2 essencialmente em terminais nervosos no RVLM. Este mesmo padrão foi observado nas demais áreas.

Figura 29. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência com marcação para VGlut2 no PVN de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal na região do hipotálamo e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.
FONTE: Ruggeri (2011)

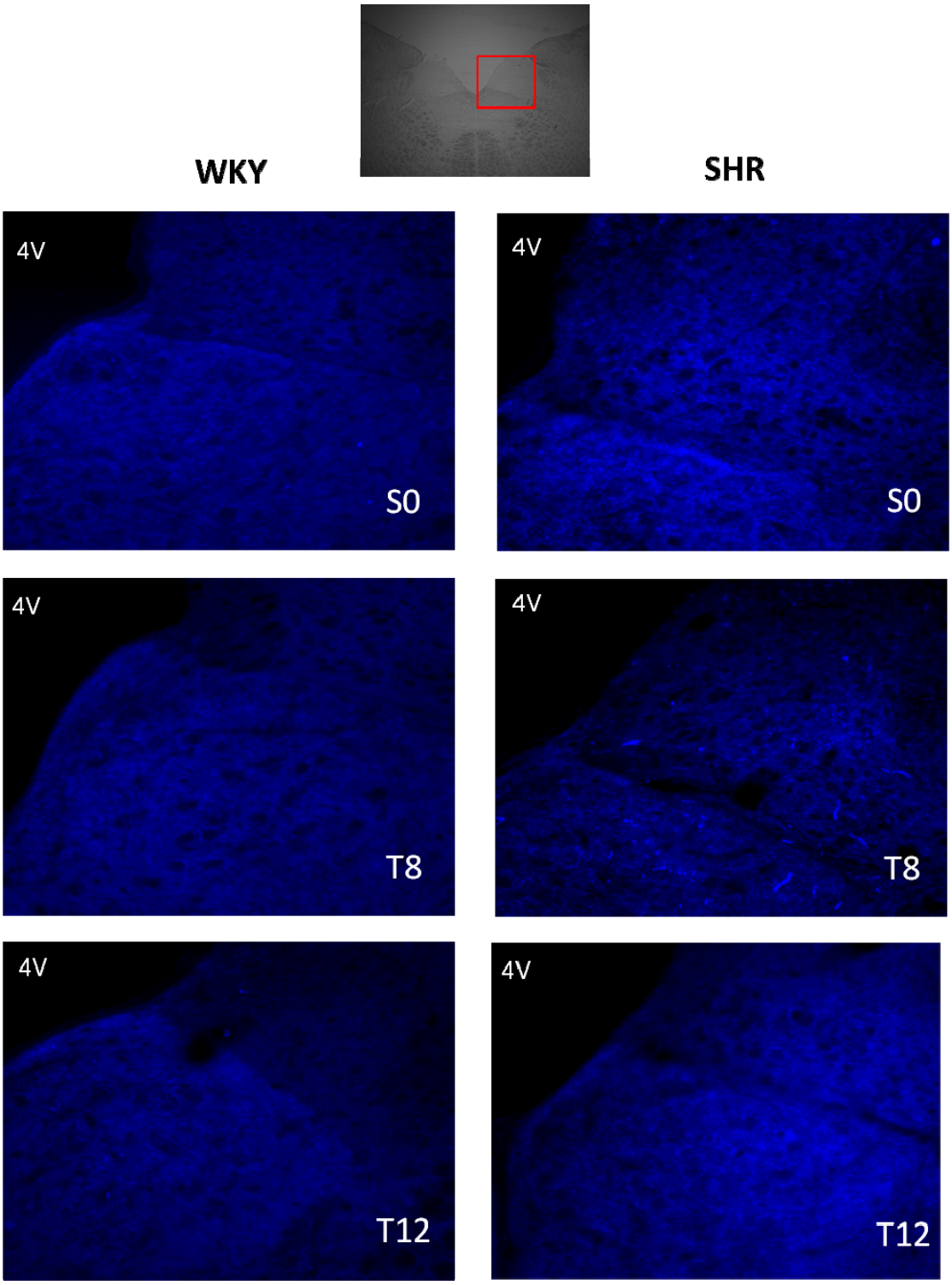
Figura 30. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência com marcação para VGlut2 no NTS caudal de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.

FONTE: Ruggeri (2011)

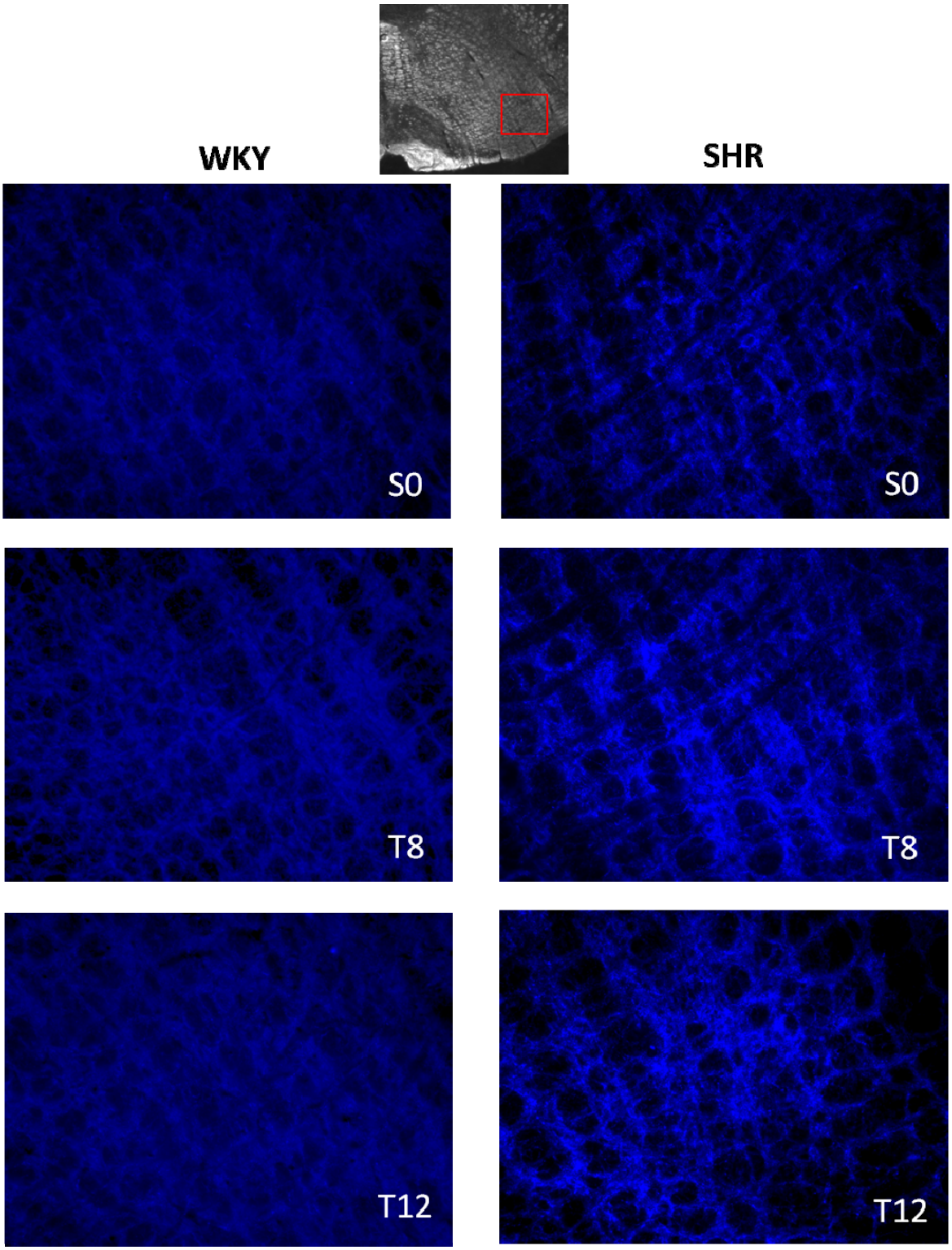
Figura 31. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência com marcação para VGlut2 no NTS medial de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). No topo, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.

FONTE: Ruggeri (2011)

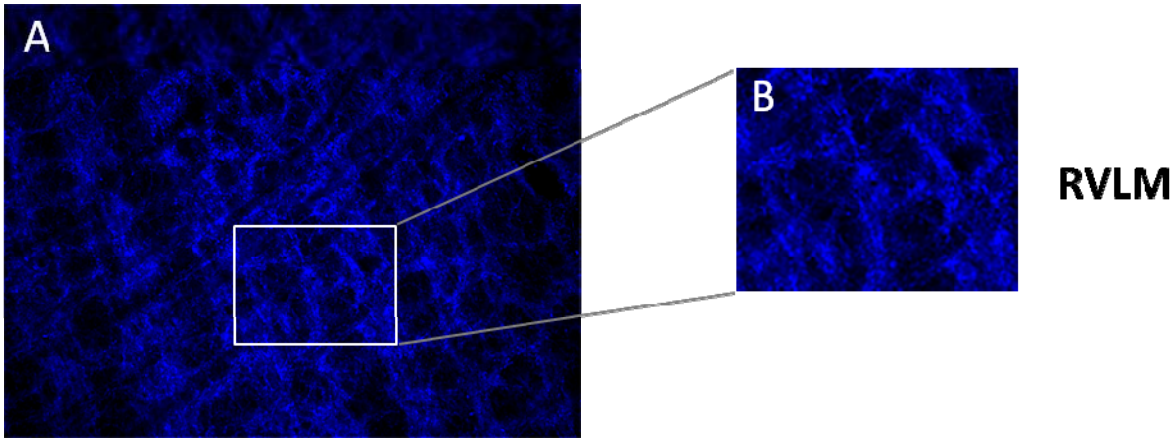
Figura 32. Fotomicrografia ilustrando a imunofluorescência com marcação para VGlut2 no RVLM de WKY e SHR em três momentos do treinamento aeróbio.



WKY (painéis à esquerda) e SHR (painéis à direita); Momentos do treinamento aeróbio: S_0 (semana 0, parte superior), T_8 (parte média) e T_{12} (inferior). Acima, vista anterior do corte coronal ao nível do óbex e destaque (vermelho) para a área fotografada com aumento de 200x.

FONTE: Ruggeri (2011)

Figura 33. Imunofluorescência para VGlut2 no RVLM em neurônios GLUérgicos



RVLM (A) e ampliação da área especificada (B), ilustrando a marcação em neurônios GLUérgicos
FONTE: Ruggeri (2011)

4.6 Relação entre inibição GABAérgica e excitação GLUérgica em áreas autonômicas

Para melhor entender, o feito do treinamento sobre vias inibitórias e excitatórias (neurônios GABAérgicas e GLUérgicos, respectivamente) presentes em áreas autonômicas, calculamos as razões entre a expressão relativa de RNAm de GAD65/expressão relativa de RNAm de VGlut2 e a expressão de relativa RNAm de GAD67/ expressão relativa de RNAm deVGlut2.

4.6.1 Razão entre GAD65/VGlut2

A tabela 11 apresenta as razões de GAD65/VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR obtidos antes (controle, semana 0) e durante os protocolos de treinamento e sedentarismo.

Tabela 11. Alterações temporais induzidas pelo treinamento na razão entre expressão de RNAm de GAD65/expressão de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR.

Grupo	PVN		DBS		VBS	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
Controle	5,28±0,52	6,60±0,84	8,42±0,74	3,72±0,72*	5,01±0,64	4,00±0,79
T_1	10,14±1,57#	6,54±1,59*	12,46±1,19#	6,13±0,64*#	6,04±0,53	5,50±1,06
T_2	9,85±1,35#	5,70±0,96*	6,51±1,37	4,49±0,94	10,42±1,09#	3,54±0,97*
T_4	9,92±1,05#	6,22±0,87*	10,28±1,45	4,98±0,96*	14,55±2,20#	3,51±0,98*
T_8	7,56±0,53	7,89±0,99	9,26±1,56	4,37±0,81*	10,41±1,25#	2,62±0,52*
T_{12}	9,33±1,31#	5,91±1,09*	14,82±2,08#	5,23±0,83*	2,80±0,58	2,79±0,60
S_{12}	8,77±1,16	6,79±1,20	8,51±1,78	4,19±1,22	3,38±0,99	2,67±0,35

Valores são média ± EPM. S_{12} indica os valores do grupo sedentário na semana 12; 7-8 ratos por subgrupo perfazendo 50-56 ratos por linhagem. Significâncias ($P < 0,05$) # *vs* semana 0, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

No PVN, o exercício determinou aumento significativo na razão GAD65/VGlut2 apenas nos WKY (Figura 34A), com elevação de aproximadamente 1,9 vezes em T_1, T_2 e T_4 (valores de 10,14±1,57; 9,85±1,35; 9,92±1,05; respectivamente, Tabela 11) e, embora a razão não se mostrasse alterada em T_8, alcançou valores de 9,33±1,31 em T_{12}, um aumento de 1,8

vezes. Nos SHR embora as expressões relativas de GAD65 (semanas 2, 4 e 8) aumentassem significativamente com o treinamento (Figura 13), o pequeno aumento observado na expressão de VGlut2 (Figura 26) determinou inalteração da razão GAD65/VGlut2 durante o treinamento (Figura 34A). Deve-se, também, ressaltar que em T_1, T_2, T_4 e T_{12} os WKY apresentavam razões significativamente maiores do que os SHR (Figura 34A), sugerindo que o treinamento facilita a inibição GABAérgica em detrimento da potencialização GLUérgica e que este efeito é especialmente observável nos WKY.

Da mesma forma que observado no PVN, o treinamento determinou aumentos significativos das razões GAD65/VGlut2 no DBS dos WKY, que atingiram níveis de significância em T_1 (+1,5 vezes) e T_{12} (+1,8 vezes; Figura 34C, Tabela 11). No DBS dos SHR a inalteração da expressão do GAD65 associada à ligeira redução da expressão do VGlut2 (veja Figuras 14 e 27) determinaram, com exceção de T_1, inalteração da razão GAD65/VGlut2 (Figura 34C). Também à semelhança do observado para o PVN, as razões dos SHR foram menores que as observadas para os WKY, com significância nas semanas 0, 1, 4, 8 e 12 (Figura 34C).

No VBS de WKY, observarmos alterações significativas da razão de RNAm de GAD65/RNAm VGlut2, pois o treinamento determinou aumentos marcantes em T_2, T_4 e T_8 (razão foi aumentada em 2,1 à 2,9 vezes, com o pico na semana 4, Figura 34E). No VBS dos SHR houve tendência à redução da razão GAD65/VGlut2 durante todo o protocolo de treinamento, a qual, no entento, não foi significativamente alterada (Figura 32E). Portanto, o cálculo da razão entre vias inibitórias/excitatórias também mostrou no VBS potencialização da inibição GABAérgica pelo treinamento físico apenas em WKY.

4.6.2 Razão entre GAD67/VGlut2

A tabela 12 apresenta as razões de GAD67/VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR obtidos antes (controle, semana 0) e durante os protocolos de treinamento e sedentarismo.

Tabela 12. Alterações s temporais induzidas pelo treinamento na razão entre expressão de RNAm de GAD67/expressão de RNAm de VGlut2 no PVN, DBS e VBS de WKY e SHR.

Grupo	PVN		DBS		VBS	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
Controle	3,78±0,54	3,68±0,51	5,58±0,54	4,41±0,95	2,84±0,25	2,31±0,42
T_1	6,44±0,75#	4,65±0,64*	9,78±1,29#	3,99±0,34*	3,74±0,65	5,84±1,45#
T_2	5,35±0,77	3,42±0,65*	4,97±1,05	4,15±0,91	5,42±0,97#	3,72±0,85
T_4	6,49±0,97#	4,34±1,33*	10,10±2,34	6,88±1,80	5,81±1,37#	2,93±0,79*
T_8	4,65±0,86	4,84±0,63	9,04±2,52	4,78±2,00	6,47±0,92#	1,26±0,46*
T_{12}	9,09±1.12#	3,77±0,19*	16,30±2,91#	4,11±0,99*	3,79±1,72	2,02±0,53
S_{12}	6,92±1,19	4,90±0,84	5,98±1,17	3,55±0,99	2,37±0,63	2,17±0,25

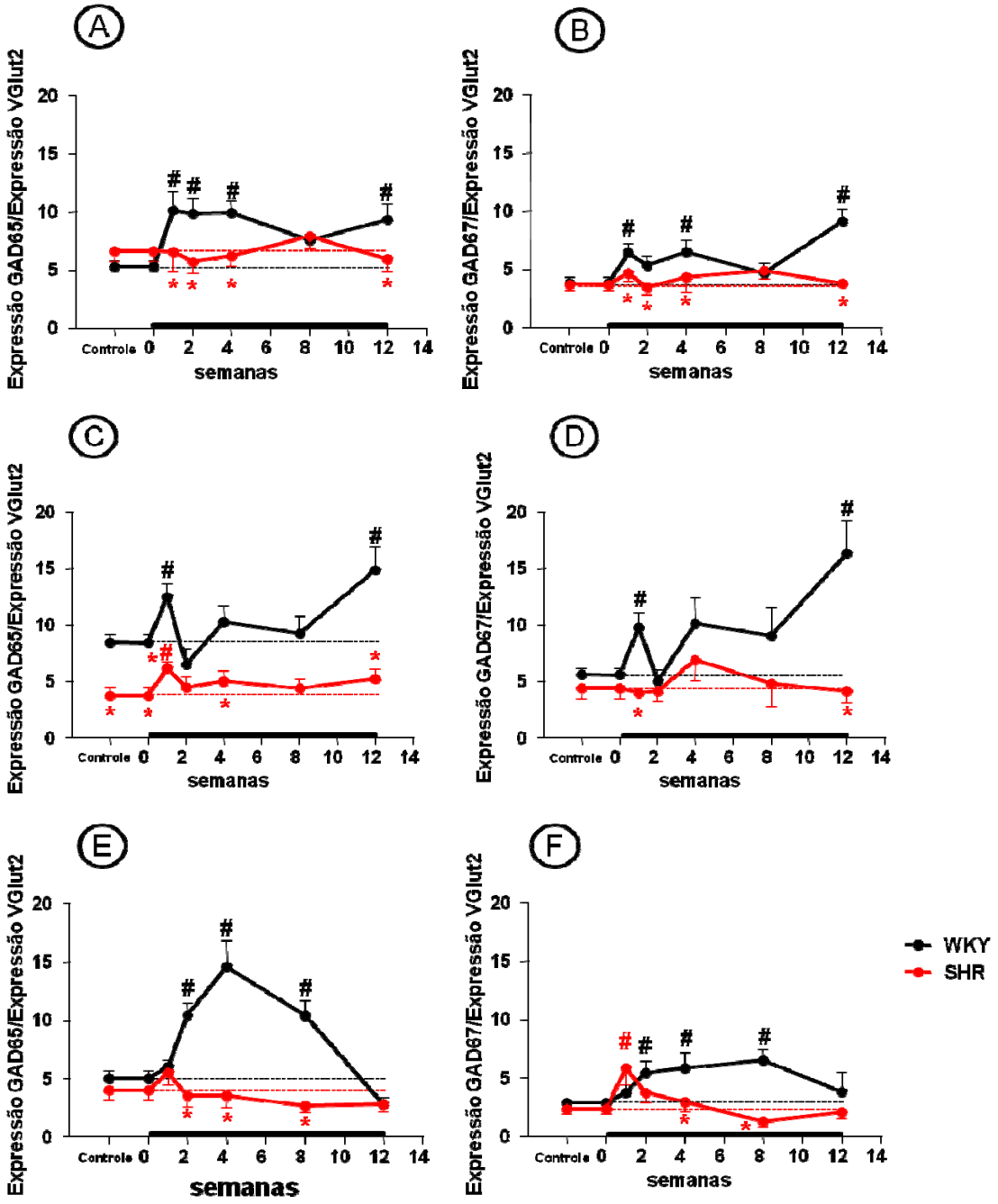
Valores são média ± EPM. S_{12} indica os valores do grupo sedentário na semana 12; 7-8 ratos por subgrupo perfazendo 50-56 ratos por linhagem. Significâncias ($P < 0,05$) # *vs* semana 0, * *vs* WKY.
FONTE: Ruggeri (2011)

No PVN de WKY, a razão GAD67/VGlut2 foi aumentada de 1,7 vezes em T_1 e T_4 (6,44±0,75; 6,49±0,97; respectivamente), atingindo aumento de 2,4 vezes em T_{12} (9,09±1.12 vs 3,78±0,54, Tabela 12, Figura 34B). Não houve alterações significativas da razão GAD67/VGlut2 durante o treinamento de SHR, o que determinou diferenças significativas entre WKY e SHR (Figura 34B).

Da mesma forma que o observado para a razão GAD65/VGlut2, o treinamento determinou no DBS de WKY aumentos significativos das razão GAD67/VGlut2, que atingiram níveis de significância em T_1 (+1,8 vezes) e T_{12} (+2,9 vezes; Figura 34D , Tabela 12). No DBS de SHR, a queda da expressão do GAD67 associado à ligeira redução da expressão do VGlut2 (veja Figuras 20 e 27) determinou neste grupo durante o treinamento inalteração das razão GAD67/VGlut2 (Figura 34D). Portanto, a razão inibição/excitação nos SHR foi menor que a observada para os WKY nas semanas 1 e 12 (Figura 34D).

No VBS dos WKY, a razão RNAm de GAD67/RNAm de VGlut2 estava aumentada em T_2, T_4 e T_8, chegando a elevações de 1,9 a 2,3 vezes, que se manteve entre as semanas 2 e 8 (Figura 34F).Por sua vez, os SHR apresentaram um pico transitório desta razão em T_1, com tendência à redução da razão GAD67/VGlut2 durante a maior parte do protocolo de treinamento (Figura 34F). Assim, no VBS, o cálculo da razão entre vias inibitórias/excitatórias também mostrou nos WKY potencialização da inibição GABAérgica pelo treinamento aeróbio, enquanto que este efeito não foi observado nos SHR.

Figura 34. Comparação das razões entre expressão de GAD65/ VGlut2 e de GAD67/VGlut2, no PVN, no DBS e no VBS, durante o protocolo de treinamento, em WKY e SHR.

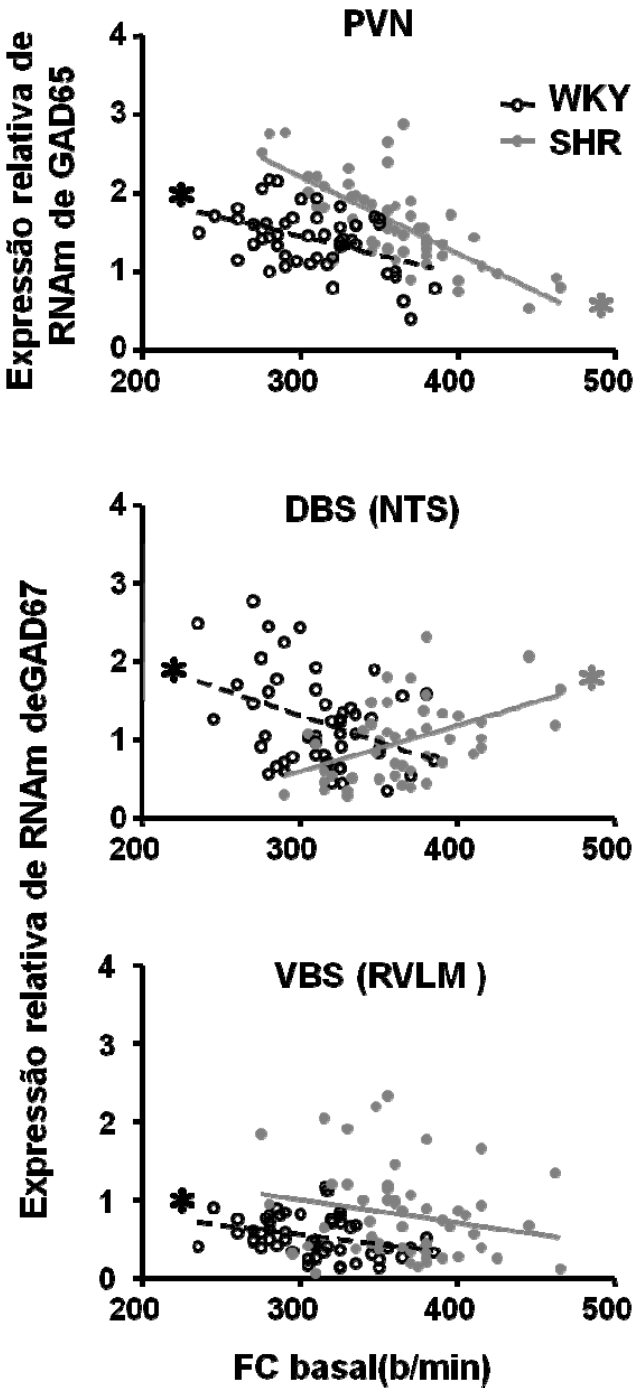


Expressão de GAD65/ VGlut2 (A, C e E) e de GAD67/VGlut2 (B, D e F) no PVN (A e B), no DBS (C e D) e no VBS (E e F); Barra transversal indica duração do treinamento. Significâncias (P < 0,05), * *vs* WKY # *vs* semana 0.
FONTE: Ruggeri (2011)

4.7 Correlação entre a expressão relativa de GAD e FC basal

A Figura 35 mostra para os grupos WKY e SHR nas diferentes áreas autonômicas estudadas, a correlação entre a expressão de GAD65 ou GAD67 com a FC basal apresentada pelos mesmos animais. Observa-se no PVN que o aumento da expressão de GAD65 induzida pelo treinamento foi acompanhado de redução da FC basal, com correlações negativas nos WKY e SHR, ou seja, quanto maior a expressão de GAD neuronal, maior a bradicardia de repouso observada. Correlações similares e significativas entre GAD 67 e FC basal foram também observadas para a expressão de GAD no NTS e RVLM de WKY (Figura 35). Por outro lado a correlação entre GAD67 no RVLM e FC basal dos SHR apresentou grande variabilidade não atingindo níveis de significância. Interessantemente, a resposta oposta ao treinamento observada no NTS de SHR (redução da expressão de GAD67- Figura 20) foi acompanhada de correlação positiva entre os valores de FC basal e os níveis de GAD67 no NTS, ou seja, neste caso a bradicardia de repouso aparecia simultaneamente à redução da expressão de GAD67 no NTS (Figura 35).

Figura 35. Correlações entre a expressão relativa de GAD65 e GAD67 em diferentes áreas autonômicas e os respectivos valores de FC basal durante o protocolo de treinamento em WKY e SHR.



Equações de regressão lineares: PVN: Y_{WKY}= - 0,005x + 2,90; r = 0,450; p<0,001;Y_{SHR}= - 0,010x + 5,14, r= -0,727, p<0,001; NTS: Y_{WKY}= - 0,007x + 3,34, r = -0,374, p= 0,008; Y_{SHR}= 0,006x – 1,19, r = 0,475, p= 0,001; RVLM: Y_{WKY}= - 0,003x + 1,29, r= -0,326, p= 0,017; Y_{SHR}= - 0,003x + 1,88, r= -0,209, p= 0,123.
FONTE: Ruggeri (2011)

5 DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo confirmaram observações anteriores sobre a eficácia do treinamento aeróbio em reduzir a FC de normotensos e hipertensos e a PA de hipertensos, revelando adicionalmente que:

a) a queda da PA nos SHR e da FC em ambos os grupos instalam-se progressivamente, a bradicardia de repouso aparecendo mais precocemente nos SHR (T_2) que nos WKY (T_8);
b) em áreas de controle autonômico a expressão gênica basal do GAD foi mais intensa que do VGlut2; enquanto que a expressão basal do VGlut2 não apresentou diferenças entre as áreas do estudo, a do GAD65 e 67 apresentava-se mais elevada no DBS dos SHR quando comparado à do PVN, mostrando-se reduzida no VBS de ambos os grupos;
c) nos WKY o treinamento aeróbio aumentou a expressão de GAD, alterando principalmente a expressão do GAD65 no PVN, a expressão do GAD67 no DBS e a expressão de ambos no VBS;
d) nos SHR, o treinamento também causou aumento da expressão do GAD65 no PVN, de GAD65 e 67 no VBS, mas reduziu a elevada expressão de GAD67 observada no DBS de SHR sedentários;
e) as alterações na expressão do VGlut2 induzidas pelo treinamento apareceram apenas nos SHR, foram de pequena magnitude, com redução no DBS, mas elevação no VBS;
f) alterações na expressão gênica de GAD65, GAD67 e VGlut2 no PVN, DBS e VBS foram confirmadas por alterações na expressão protéica de GAD65, GAD67 e VGlut2 no PVN, NTS e RVLM;
g) a razão entre inibição GABAérgica/excitação GLUérgica durante o treinamento foi aumentada nos WKY, mantendo-se inalterada nos SHR e similar a dos adultos jovens sedentários, mesmo em idade mais avançada;
h) houve em ambos os grupos correlação significativa entre aumento da expressão gênica de GAD em áreas autonômicas e redução da FC basal, com predominância dos ajustes observados no PVN.

Dados funcionais de desempenho físico na esteira confirmam dados anteriores do nosso laboratório (FELIX; MICHELINI, 2007; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009) e comprovam que o treinamento aeróbio de baixa

à moderada intensidade (50-60% da capacidade máxima de exercício) é eficaz em melhorar o desempenho na esteira e o ganho da capacidade física tanto em WKY quanto SHR ao longo do protocolo de treinamento. Nossos dados indicam também que os SHR apresentavam desde o início dos protocolos, um desempenho melhor que os WKY, o que pode ser explicado por fatores comportamentais ligados à ansiedade e locomoção dos SHR, que se mostraram mais agitados (KULIKOV et al., 1997; RAMOS et al., 1997). Além disso, ambos os grupos treinados WKY e SHR apresentaram ganhos similares de capacidade física, indicando que ambos os grupos foram submetidos ao mesmo estímulo comportamental.

A pequena redução do desempenho observada nos SHRs quando comparados aos WKYs, indica ainda que a hipertensão associada ao envelhecimento influencia negativamente este parâmetro. A análise dos parâmetros hemodinâmicos mostrou durante todo o período experimental PA e FC mais elevadas nos SHR, o que indica que os SHR encontravam-se desde o início dos protocolos na fase estabelecida da hipertensão. É sabido que a hipertensão espontânea cursa com o aumento da atividade simpática periférica (FOLKOW, 1982), a qual propicia o aumento da PA e FC basais. É também sabido que o tônus simpático para o coração e vasos é gerado centralmente pela integração da atividade de várias áreas encefálicas como a medula espinhal, o RVLM, o NTS e vários núcleos hipotalâmicos dentre os quais se destaca o PVN (COOTE, 2007; GUYENET, 2006). Vários estudos têm ainda sugerido que o elevado tônus simpático na hipertensão espontânea é condicionado e/ou potencializado por déficit no funcionamento de projeções GABAérgicas inibitórias em áreas hipotalâmicas, bulbares e espinhais (HORN et al., 1998; KRAMER et al., 2000; SASAKI et al.,1986, 1990, 1992; SHONIS; WALDROP, 1993a, SHONIS et al.,1993b; WANG et al., 2008) e/ ou por facilitação de projeções GLUérgicas excitatórias do PVN a áreas bulbares e/ou espinhais (KLEIBER et al., 2010; KAWABE et al., 2008; SVED, 2004).

Não detectamos, no entanto, nos hipertensos sedentários (*vs* respectivos normotensos sedentários) redução da expressão absoluta do GAD65 e do GAD67 em nenhuma das áreas investigadas (PVN, DBS e VBS). Resultados similares foram também observados em outro modelo de hipertensão - a hipertensão renal 2 rins - 1 clip (BIANCARDI; CAMPOS; STERN, 2010). Por outro lado, Shonis e Waldrop (1993a) e Shonis et al. (1993b) descreveram em SHR aumento da atividade neuronal no hipotálamo caudal, que era determinado por deficiência de GABA nesta área, a qual poderia contribuir para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão. No entanto observaram que esta deficiência não estava presente em SHR jovens (6 a 8 semanas de idade), mas se estabelecia a partir da 11ª e 16ª. semanas (SHONIS et al., 1993b). Deve-se observar que nossos ratos tinham entre ao redor de 10

semanas no início do treinamento, encontrando-se, portanto, na fase em que a deficiência GABAérgica ainda não se encontrava estabelecida. Ao final dos protocolos os ratos encontravam-se entre 22ª. e 23ª. semanas de idade, mas os animais sedentários (S_0 x S_{12}) não apresentaram alterações significativas na expressão de GAD65 e GAD67. É possível que a deficiência na funcionalidade do sistema GABAérgico descrito por vários autores (HORN et al., 1998; SASAKI et al., 1986, 1990, 1992; SHONIS et al., 1993a, 1993b; WANG et al., 2008) não implique necessariamente na atividade biossintética do GABA, mas na síntese/ armazenamento, liberação do neurotransmissor e/ou expressão de seus receptores. Estas possibilidades estão ainda para serem investigadas.

Interessante observar-se que o treinamento aeróbio determinou em ambos os grupos instalação progressiva da bradicardia de repouso. A redução da FC basal é uma característica marcante do treinamento aeróbio e um indicativo de sua eficiência (CLAUSEN et al., 1977; SCHEUER; TIPTON, 1977). A eficácia do treinamento aeróbio em reduzir a FC basal de normotensos e hipertensos já fora descrita por vários grupos de pesquisa, seja em animais de experimentação, seja em humanos (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; AMARAL et al., 2001; CERONI et al., 2009; CLAUSEN, 1977; CORNELISSEN; FAGARD, 2005; FOLKOW, 1982; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009; MARTINS et al., 2005; MELO; MARTINHO JR; MICHELINI, 2003; PESCATELLO et al., 2004; SCHLÜTER; SCHRECKENBERG; REBELO, 2010; SILVA et al., 1997; VERAS-SILVA at al., 1997). A novidade do presente trabalho está na demonstração das alterações temporais com que as reduções de FC se verificam. Demonstramos que a bradicardia de repouso aparecia mais precocemente nos SHR (queda significativa a partir da 2ª.semana) e mais tardiamente nos WKY (a partir da 8ªsemana) mantendo-se nestes níveis até o final do treinamento.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório já haviam demonstrado que a bradicardia de repouso subsequente ao treinamento era facilitada por ajustes do controle autonômico ao coração: aumento da atividade vagal em normotensos e hipertensos, a qual era mediada por ativação das projeções OTérgicas do PVN ao NTS/DMV (CAVALLERI et al., 2011; MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007a, 2007b; MICHELINI; STERN, 2009;) e redução da atividade simpática em hipertensos (CERONI et al., 2009; MICHELINI; STERN, 2009). Estas respostas, determinando alteração do balanço simpato-vagal ao coração, com predomínio do tônus vagal, condicionavam a bradicardia de repouso. Negrão et al. (1992) e Boyett (2009) também destacaram a redução da freqüência cardíaca intrínsica do marcapasso após treinamento aeróbio de baixa intensidade como uma possível contribuição à instalação

da bradicardia de repouso. Os dados do presente trabalho vêm sugerir um possível fator determinante da redução do simpático induzida pelo treinamento aeróbio de baixa à moderada intensidade: a facilitação do sistema GABAérgico central em áreas de controle autonômico, propiciando uma maior inibição da circuitaria neuronal geradora do tônus simpático, o que, consequentemente, reduz a FC. De fato observamos haver nos WKY facilitação da expressão/atividade de neurônios GABAérgicos em todas as áreas de controle autonômico estudadas e no PVN e RVLM de SHR. Deve-se observar que os efeitos do treinamento sobre os neurônios GABAérgicos dos WKY foram similares nas 3 áreas autonômicas testadas e em todas o aumento da expressão de GAD induzida pelo treinamento correlacionava-se com a redução da FC basal observada nos animais treinados. Nos SHR, por outro lado, a queda da FC foi acompanhada de aumento marcante do conteúdo de GAD apenas no PVN, com elevação não significativa no RVLM, mas correlação inversa no NTS, ou seja, a bradicardia de repouso se estabeleceu frente à redução do elevado conteúdo de GAD observado nos SHR sedentários. Estas observações sugerem a preponderância da inibição GABAérgica no PVN de ratos treinados em desencadear a bradicardia de repouso (observe nos diferentes grupos a coincidência temporal entre a alteração da expressão de GAD neuronal no PVN e a redução da FC) e que a redução da inibição GABAérgica induzida pelo treinamento no NTS de SHR deva estar relacionada a outro mecanismo de modulação. Nesta linha de raciocínio, trabalhos funcionais já haviam demonstrado que a administração intracerebroventricular de GABA (SASAKI et al., 1986) e a inibição de sua degradação (SASAKI et al., 1990) reduziam a FC basal enquanto que o bloqueio da síntese de GABA no hipotálamo de SHR determinava aumento da FC (SHONIS et al., 1993b). Mais recentemente Moreira et al. (2005) também demonstraram que a ativação de receptores $GABA_A$ com muscimol no CVLM aumentava a FC. Estas observações confirmam os efeitos da ativação ou inibição do sistema GABAérgico central em reduzir ou aumentar a FC. O que nossos dados vieram demonstrar é que o treinamento aeróbio per se é capaz de aumentar a expressão (dados de imunofluorescência) e a funcionalidade (correlação entre expressão de GAD e FC basal) de neurônios GABAérgicos em áreas de controle autonômico de WKY e SHR, determinando em consequência a instalação da bradicardia de repouso nos animais treinados.

Discordante destes achados foi a observação de que o treinamento determinava redução da expressão de GAD67 no NTS dos SHR. Deve-se ter presente que os SHR apresentavam na situação basal níveis mais elevados de GAD67 quando comparados aos respectivos controles, o que poderia representar uma tentativa de compensação aos elevados níveis da PA. Neste sentido Mueller e Hasser (2006) já haviam demonstrado que a

administração bilateral de muscimol (agonista $GABA_A$) no NTS aumentava, enquanto que a administração bilateral de bicuculina (antagonista de receptores $GABA_A$) reduzia a PA, a FC e a atividade simpática lombar, respostas estas que apresentavam marcante redução após treinamento aeróbio. Embora o significado funcional destas observações esteja por ser identificada, estas comprovam a redução do tônus GABAérgico no NTS após o treinamento.

Uma observação interessante de nosso estudo foi a da expressão preferencial de GAD65 no PVN e de GAD67 no NTS, bem como os efeitos do treinamento em aumentar a GAD65 no PVN, mas o GAD67 no NTS. Fong et al. (2005) demonstraram que ambas as isoformas, GAD65 e GAD67, são expressas em áreas autonômicas do encéfalo e medula espinhal: imunoreatividade para GAD65 foi observada no córtex e hipocampo (BELICHENKO et al., 2009), em vários núcleos hipotalâmicos (SEARLES et al., 2000), várias áreas bulbares (STORNETTA; GUYENET, 1999) e na medula espinhal (DEUCHARS et al., 2005). Da mesma forma a expressão de GAD67 foi descrita em diferentes núcleos hipotalâmicos (BIANCARDI; CAMPOS, STERN, 2010; HORN et al., 1998; SEARLES et al., 2000;) e bulbares (FONG et al., 2005; STORNETTA; GUYENET, 1999), bem como na medula espinhal (DEUCHARS et al., 2005). Biancardi, Campos e Stern (2010) mostraram que a imunofluorescência para o GAD67 no PVN concentra-se preferencialmente nas terminações nervosas, enquanto Stornetta; Guyenet (1999) e Fong et al. (2005) descrevem que no NTS e outras áreas bulbares que GAD65 e GAD67 expressavam-se no corpo celular e terminações nervosas, com elevada densidade do GAD67 no NTS (FONG et al., 2005). Nossos dados, mostrando que o treinamento aeróbio elevou preferencialmente o GAD65 no PVN e o GAD67 no NTS e no RVLM, sugerem que o efeito do treinamento manifestou-se com maior intensidade no corpo celular de neurônios GABAérgicos, ou seja, na área biossintética.

Observamos também queda de pequena magnitude, mas significativa, da PAM apenas nos SHR, a partir da 8ª.semana de treinamento. A queda da PA induzida pelo treinamento aeróbio de baixa à moderada intensidade já fora descrita por nosso e outros laboratórios em dieferentes modelos de hipertensão (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; AMARAL et al., 2001; CERONI et al., 2009; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; HIGA-TANIGUCHI; FÉLIX; MICHELINI, 2009; LITTLE et al., 2001; MARTINS et al., 2005; MELO; MARTINHO JR; MICHELINI, 2003; SCHLÜTER; SCHRECKENBERG; REBELO, 2010; SILVA et al., 1997; VERAS-SILVA at al., 1997), bem como no homem (CORNELISSEN; FAGARD, 2005; PESCATELLO et al., 2004). Vários mecanismos têm sido propostos para se explicar a redução da PA de hipertensos após o treinamento: remodelamento da parede arteriolar com

redução da relação parede/luz (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003); alteração do balaço entre fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, com predomínio dos primeiros (HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004); a redução do tônus simpático cardíaco e vasomotor (CERONI et al., 2009; MICHELINI; STERN, 2009; NELSON et al., 1986). Embora a redução da FC basal nos SHR treinados indicasse redução do tônus simpático a partir da 2ª.semana do treinamento, este fator isoladamente não foi suficiente para reduzir a PA, que mostrou queda significativa na 8ª.semana de treinamento. Demonstramos anteriormente que a queda da PA subsequente ao treinamento aeróbio correlacionava-se com a redução da razão parede/luz de arteríolas musculares esqueléticas e com a resistência vascular local (AMARAL; ZORN, MICHELINI, 2000; AMARAL; MICHELINI, 2011). O treinamento por 2 semanas provavelmente não foi suficiente para remodelar as arteríolas e a queda da PA só foi observada quando à redução do tônus simpático somou-se a remodelagem estrutural dos vasos de resistência.

Dados da literatura têm indicado que a hipertensão arterial é acompanhada de hipertetonia das projeções excitatórias do PVN a áreas bulbares e/ou espinhais (KAWABE et al., 2008; KLEIBER et al., 2010 SVED, 2004). Nossos resultados relativos à expressão gênica e protéica de VGlut2 mostraram aumento significativo do conteúdo de VGlut2 no NTS de SHR sedentários *vs* WKY sedentários, sem alterações significativas nas demais áreas estudadas. Com exceção da redução transitória (T1) da expressão de RNAm para VGlut2 no NTS de SHR e do aumento da sua expressão no RVLM de SHR após 8 semanas, o treinamento não alterou a expressão gênica e o conteúdo protéico de VGlut2 nas áreas autonômicas estudadas. São raros na literatura os trabalhos relativos aos efeitos do treinamento sobre a expressão/funcionalidade de neurônios GLUérgicos. Em um dos pouco trabalhos disponíveis Mueller e Hasser (2005) mostraram que a ativação do NTS com microinjeção de glutamato produziam reduções dose-dependentes de PA, FC e atividade simpática lombar que não eram alteradas pelo treinamento aeróbio. Da mesma forma respostas pressoras e simpato-excitatórias à administração bilateral de antagonista de receptores GLUérgicos ionotrópicos no NTS também não eram alteradas pelo treinamento (MUELLER; HASSER, 2006). Por outro lado, Kleiber et al. (2008) observaram que administraçaào de M-metil-D-aspartato (NMDA) no PVN causava aumento da atividade simpática renal, a qual era normalizada após treinamento físico. Nossos dados indicaram nos SHR redução precoce e transitória da expressão de VGlut2 no NTS e aumento da mesma no RVLM após a 8ª.semana de treinamento, sem alterações nos animais normotensos. É possível que as alterações induzidas pelo treinamento na atividadae das vias GLUérgicas difira de uma

para a outra área cerebral e entre diferentes modelos experimentais. Esta possibilidade também aguarda confirmação experimental.

Embora utilizado com sucesso anteriormente (BIANCARDI; CAMPOS, STERN, 2010; KAWABE et al., 2008) é possível também que o marcador utilizado para se investigar em neurônios GLUérgicos as alterações induzidas pela hipertensão e pelo treinamento - o transportador vesicular de glutamato, isoforma 2 (VGlut2) - não reflita com precisão os ajustes em neurônios GLUérgicos desencadeados pelo exercício (alterações na síntese? liberação? expressão de receptores?). Com efeito em trabalho recente demonstrou-se no córtex motor, cerebelo e estriado que o treinamento determinava alterações na expressão das subunidades 1 e 2/3 de receptor de glutamato tipo AMPA, a qual variada com a duração do treinamento: houve aumento na expressão das subunidades de receptores AMPA após 30 dias, mas efeitos opostos foram observados entre 3 e 7 dias de treinamento (REAL et al., 2010). Deve-se ter presente que a síntese de glutamato, diferentemente da de GABA, conta com a participação de várias enzimas, dificultando seu estudo e que o treinamento envolve processos regulatórios complexos, muitos dos quais ainda não foram devidamente estudados.

O fato da expressão do VGlut2 não alterar com o treinamento no PVN, NTS e RVLM dos WKY proporcionou nestes grupos aumentos marcantes da razão GAD/VGlut2, indicando que nos ratos normotensos o treinamento favoreceu a inibição GABAérgica frente à ativação GLUérgica. Nos SHR a ligeira elevação da expressão de VGlut2 no PVN (não significativa) e sua elevação tardia no RVLM compensavam o aumento da expressão de GAD, determinando durante o treinamento inalteração da razão GAD/VGlut2. Por outro lado a queda na expressão de VGlut2 no NTS dos SHR compensou a queda na expressão do GAD nesta área, elevando inicialmente a razão inibição/excitação, mas mantendo-a próximo aos níveis basais durante o treinamento. Desta forma, nas 3 áreas estudadas dos SHR, a razão inibição/excitação foi mantida constante e em níveis similares à dos adultos jovens sedentários mesmo com idade mais avançada. Estes dados indicam que o treinamento foi eficaz em evitar nos SHR a deficiência GABAérgica induzida pelo envelhecimento conforme proposta por vários autores (SASAKI et al., 1986, 1990, 1992; SHONIS et al., 1993b; HORN et al., 1998). Dados anteriores da literatura, comparando a atividade da GAD em áreas encefálicas de SHR e seus controles normotensos já haviam demonstrado o regulação negativa do sistema GABAérgico no hipotálamo posterior, hipocampo e substância negra dos SHR (CZYZEWKA; SZAFRAN et al., 1989). Também HORN et al. (1998), demonstraram que o hipotálamo posterior de SHR apresentava reduzida imunorreatividade para RNAm de GAD67. Por outro lado SASAKI et al. (1989) descreveram que o conteúdo de GABA no hipotálamo de SHR não diferia do

observado nos WKY, mas que a quantidade de GABA acumulada após inibição de sua degradação era menor em SHR. Foi também descrito que a administração intraventricular do agonista de receptor $GABA_A$ reduzia mais a PA de SHR que dos WKY (SASAKI et al., 1990) e que a microinjeção de inibidor da síntese de GABA no hipotálamo posterior, aumentava a PA e FC de SHR jovens (6-8 semanas), mas não tinha efeito em SHR mais velhos (11 a 16 semanas) (SHONIS et al., 1993b), sugerindo deficiência da atividade GABAérgica em SHR mais velhos. Nossos resultados, confirmam, portanto, a eficácia do treinamento aeróbio em se contrapor à perda da inibição GABAérgica nos animais hipertensos.

6 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho nos permitem afirmar que o treinamento aeróbio aumenta, em áreas de controle autonômico de normotensos e hipertensos, a expressão gênica e protéica do ácido glutâmico descarboxilase, a enzima responsável pela síntese de GABA e que esta resposta adaptativa ao treinamento contribui sobremaneira para a redução da FC basal dos indivíduos treinados. O aumento da inibição GABAérgica subsequente ao treinamento está presente em diferentes áreas autonômicas, sendo fundamental importância sua ocorrência no PVN de normotensos e hipertensos. Os dados mostram ainda inalteração da expressão gênica e protéica de VGlut2 em normotensos treinados, elevação de sua expressão no RVLM mas queda no NTS. Estas respostas induzidas pelo treinamento determinam aumento significativo da razão inibição GABAérgica/ excitação GLUérgica nos normotensos e evitando a redução da mesma, que caracteriza o envelhecimento dos hipertensos espontâneos. Podemos, portanto, afirmar que a facilitação da inibição GABAérgica induzida pelo treinamento nas áreas de controle autonômico é um dos mecanismos condicionantes dos efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular.

REFERÊNCIAS*

AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v. 44, p. 814-826, 2011.

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 gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 18, n. 11, p. 1563-1572, 2000.

BELICHENKO, P. V.; KLESCHEVNIKOV, A. M.; MASLIAH, E.; WU, C.; TAKIMOTO-KIMURA, R.; SALEHI, A.; MOBLEY, W. C. Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentate in Ts65Dn mouse model of down syndrome. **J. Comp. Neurol**. v. 512, n. 4, p. 453-466, 2009.

BEZERRA, S. M. M. S.; SANTOS, C. M.; MOREIRA, E. D.; KRIEGER, E. M.; MICHELINI, L. C. Chronic AT1 receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. **Hypertension**, v. 38, p. 569-575, 2001.

BIANCARDI, V. C; CAMPOS, R. R; STERN, J. E. Altered balance of γ- aminobutyric acidergic and glutamatergic afferents imputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of hypothalamus of renovascular hypertensive rats. **Comp. Neurol. Res. Systems Neurosci.**, v. 518, p. 567-585, 2010.

BLESSING, W. W; REIS, D. J. Evidence that GABA and glycine-like imputs inhibit vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit. **Neurosci. Lett**., v. 37, n. 1, p. 57-62, 1983.

BLOOM , F. E. Neurotransmission and the central nervous system. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN, G. A. eds. **Goodman & Gilman`s:** the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 293-320.

BOYETT, M. R. And the beat goes on' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. **Exp. Physiol**., v. 94, n. 10, p. 1035-1049, 2009.

---

* De acordo com

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS.

NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BRAGA, D. C.; MORI, E.; HIGA-TANIGUCHI, K. T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. 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 barorecptor gain sensitivy in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-1022, 2000.

BUJIS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F. W. lntra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell. Tiss. Res.**, v. 186, n. 3, p. 423-433, 1978.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**., v. 301, p. R958-R966, 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.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. The 'abc' of GABA receptors: a brief review'. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 26, p. 937-940, 1999.

CHEN, Q.; LI, D. P.; PAN, H. L. Presynaptic α_1 adrenergic receptors differentially regulate synaptic glutamate and GABA release to hypothalamic presympathetic neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 316, n. 2, p. 733-742, 2006.

CHEN, Y. L.; LIU, Y. F.; HUANG, C. Y.; LEE, S. D.; CHAN, Y. S.; CHEN, C. C.; et al. Normalization effect of sports training on blood pressure in hypertensives. **J. Sports Sci**., v. 28, p. 361-367, 2010.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L.A.; IZZO JR, J.L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT JR, J. T.; 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, p. 1206-1252, 2003.

CLAUSEN, J. P. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. **Physiol. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 779-815, 1977.

COOTE, J. H. Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. **Exp. Physiol.**, v. 92.1, p. 3-18, 2007.

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

CZYZEWSKA-SZAFRAN, H.; WUTKIEWICZ, M.; REMISZEWSKA, M.; JASTRZEBSKI, Z.; CZARNECKI, A.; DANYSZ, A. Down-regulation of the GABA-ergic system in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats (SHR), **Pol. J. Pharmacol. Pharm**., v. 41, n. 6, p. 619-627, 1989.

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

DEUCHARS, S. A.; MILLIGAN, C. J.; STORNETTA, R. L.; DEUCHARS, J. GABAergic neurons in the central region of the spinal cord: a novel substrate for sympathetic inhibition. **J. Neurosci**., v. 25, n. 5, p.1063-70, 2005.

DEGTYARENKO, A. M.; KAUFMAN, M. P. MLR-induced inhibition of barosensory cells in the NTS. **Am. J. Physiol. Heart-Circ. Physiol**, v. 298, p. 2575-2584, 2005.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol, Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 273, p. 1271-1282, 1997.

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

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

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol. Rev**., v. 64, n. 2, p. 347-504, 1982.

FONG, A. Y.; STORNETTA, R. L.; FOLEY, M.; POTTS, J. T. Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. **J. Comp. Neurol**., v. 493, p. 274-290, 2005.

FREMEAU JR, R. T.; VOGLMAIER, S.; SEAL, R. P.; EDWARDS, R. H. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. **Trends Neurosci**., v. 27, n. 2, p. 98-103, 2004.

GRAS, C.; HERZOG, E.; BELLENCHI, G. C.; BERNARD, V.; RAVASSARD, P.; POHL, M.; GASNIER, B.; GIROS, B.; EL MESTIKAWY, S. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons. **J. Neurosc**., v. 22 , n. 13, p. 5442-5451, 2002.

GRASSI, G.; MANCIA, G. Neurogenic hypertension: is the enigma of its origin near the solution? **Hypertension**, v. 43, p. 154-155, 2004.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Rev. Neurosci**., v. 7, p. 335-346, 2006.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Aminoácidos transmissores. In:_____**Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 32, p. 527-540.

HARKANY, T.; HARKANY, T.; HOLMGREN, C.; HÄRTIG, W.; QURESHI, T.; CHAUDHRY, F. A.; STORM-MATHISEN, J.; DOBSZAY, M. B.; BERGHUIS, P.; SCHULTE, G.; SOUSA, K. M.; FREMEAU JR, R. T.; EDWARDS, R. H.; MACKIE, K.; ERNFORS, P.; ZIMBERTER, Y. Endocannabinoid-independent retrograde signalling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 21, p. 4978-4988, 2004.

HERZOG, E.; GILCHRIST, J.; GRAS, C.; MUZERELLE, A.; RAVASSARD, P.; GIROS, B.; GASPAR, P.; EL MESTIKAWY, S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. **Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 983-1002, 2004.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxidase and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol. Ther.**, v. 102, p. 87-96, 2004.

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

HIGA-TANIGUCHI, 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. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 282, p. 537-545, 2002.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; SILVA, F. C. P.; SILVA, H. M. V.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergetic innervation in normotensive and hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. 1717-1727, 2007.

HILL, L.; DROSTE, S. K.; NUTT, D. J.; LINTHORST, A. C. E.; REUL, J. M. H. M. Voluntary exercise alters $GABA_A$ receptor subunit and glutamic acid decarboxylase-67 gene expression in the rat forebrain. **J. Psychopharmacol.**, v. 24, n. 5, p. 745-756, 2010.

HORN, E. H.; SHONIS, C. A.; HOLZWARTH, M. A.; WALDROP, T. G. Decrease in glutaminic acid decarboxylase level in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens**., v. 16, n. 5, p. 625-633, 1998.

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

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. **J. Comp. Neurol**.,v. 233, n. 3, p. 308-332, 1985a.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. **J. Comp. Neurol**., v. 233, n. 3, p. 333-349, 1985b.

KALIA, M.; WOODWARD, D. J.; SMITH, W. K.; FUXE, K. Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. **J. Comp. Neurol**., v. 233, n. 3, p. 350-364, 1985c.

KAPLAN, N. M. Guidelines for the treatment of hypertension: An American view. **J. Hypertens.**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 1995.

KAPLAN, N. M. Obesity in hypertension: effects on prognosis and treatment. **J. Hypertens**., v. 16, n. 1, p. 35-37. 1998.

KAWABE, T.; CHITRAVANSHI, V. C.; KAWABE, K.; SAPRU, H. N. Cardiovascular function of a glutamatergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the tractus solitaries in the rat. **Neuroscience**. v. 153, n. 3, p. 605-617, 2008.

KLEIBER, A. C.; ZHENG, H.; SHARMA, N. M.; PATEL, K. P. Chronic AT_1 receptor blockade normalizes NMDA-mediated changes in renal sympathetic nerve activity and NR_1 expression within the PVN in rats with heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**., v. 298, p. H1546-H1555, 2010.

KLEIBER, A. C.; ZHENG, H.; SCHULTZ, H. D.; PEULER, J. D; PATEL, K. P. Exercise training normalizes enhanced glutamate-mediated sympathetic activation from the PVN in heart failure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**., v. 294, p. R1863–R1872, 2008.

KORNER, P. I. Baroreceptor resetting and other determinants of baroreflex properties in hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**., v. 15, p. 45-64, 1989.

KRAMER, J. M.; PLOWEY, E. D.; BEATTY, J. A.; LITTLE, H. R.; WALDROP, T. G. Hypothalamus, hypertension, and exercise. **Brain Res. Bull.**, v. 53, n. 1, p. 77-85, 2000.

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

KRAMER, J. M.; BEATTY, J. A.; PLOWEY, E. D.; WALDROP, T. G. Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**., v. 29, p. 122-126, 2002.

KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E. Influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 2, p. 720-723, 1999.

KULIKOV, A.; AGUERRE, S.; BERTON, O.; RAMOS, A.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test anxiety. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 281, p. 775-784, 1997.

LAUGHLIN, M. H.; SCHRAGE, W. G.; MCALLISTER, R. M.; GARVERICK, H. A.; JONES, A. W. Interaction of gender and exercise training: vasomotor reactivity of porcine skeletal muscle arteries. **J. Appl. Physiol**., v. 90, p. 216-227, 2001.

LEE, K. S.; HAN, T. H.; JO, J.Y.; KANG, G.; LEE, S. Y.; RYU, P. D.; IM, J.H.; JEON, B. H.; PARK, J. B. Serotonin inhibits GABA synaptic transmission in presympathetic paraventricular nucleus neurons. **Neurosci. Lett**., v. 439, n. 2, p. 138-42, 2008.

LI, D. P; PAN, H. L. Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension. **Am. J. P. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, n. 3, p. 1110-1119, 2006.

LI, D. P.; PAN, H. L. Role of gamma-aminobutyric acid $(GABA)_A$ and $GABA_B$ receptors in paraventricular nucleus in control of sympathetic vasomotor tone in hypertension. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 320, n. 2, p. 615-626, 2007.

LITTLE, H. G.; KRAMER, J. M.; BEATTY, J. A.; WALDROP, T. G. Chronic exercise increases GAD gene expression in the caudal hypothalamus of spontaneously hypertensive rats**. Molecular Brain Research**, v. 95, p. 48-54, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTEN, T. D. Analysis or relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2-ΔΔCt method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOUTZENHISER, R.; BIDANI, A.; CHILTON, L. Renal myogenic response kinetic attributes and physiological role. **Circ. Res**., v. 90, p. 1316-1324, 2002.

MANCIA, G.; GRASSI, G. Antihipertensive treatment: past, present and future. **J. Hypertens.**, v.16, n. 1, p. 1-7, 1998.

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, p. 1004-1009, 2005.

MCARDLE, W. D.; KATCK, F. I.; KATCH, V. L. Exercício, Envelhecimento e Saúde Cardiovascular. In:_____ **Fundamentos da Fisiologia do Exercício**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

MCKINLEY, M. J.; ALBINTON, A. L.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MAY, C. N.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; MENDELSOHN F. A. O.; CHAI, S. Y. The brain renin angiotensin system: location and physiological roles. **Int. J. Biochem. Cell. Biol**., v. 35, p. 901-918, 2003.

MELO, R. M.; MARTINHO JR., E.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, p. 851-857, 2003.

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. I75-I79, 1988.

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, n. 4, 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. Conceitos básicos sobre a pressão arterial. In: MION JR. D, OIGMAN W, NOBRE F. (Ed.). **MAPA – Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial**, 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 1-9.

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic preautonomic neurons on circulatory control: Reflex mechanisms and changes during exercise. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, 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 neuro-hormonais. In: AIRES, M. M (Ed). **Fisiologia**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 571-593.

MICHELINI, L. C. Regulação a longo-prazo da pressão arterial. In: AYRES, M. M (Ed). **Fisiologia**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p 594-604.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Neuronal plasticity in central autonomic networks: Role in cardiovascular control during exercise. **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 9, p. 947-960, 2009.

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

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

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

MITCHELL, J. H. J. B. Wolffe memorial lecture: neural control of the circulation during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc**., v. 22, n.2, p. 141-154, 1990.

MIURA, M.; REIS, D. J. Termination and secondary projections of carotid nerve in the cat brain stem. **Am. J. Physiol**., v. 217, p. 142-153, 1969.

MOECHARS, D.; WESTON, M. C.; LEO, S.; CALLAERYTS-VEGH, Z.; GORIS, I.; DANEELS, G.; BUIST, A.; CIK, M.; VANDERSPEK, P.; KASS, S.; MEERT, T.; D'HOOGE, R.; ROSENMUND, C.; HAMPSON, R. M. Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 46, p. 12055-12066, 2006.

MOLTENI, R.; YING, Z.; PINILLA, F.G. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity regulated genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur. J. Neurosci**., v. 16, n. 6, p. 1107-1116, 2002.

MOREIRA, T. S.; SATO, M. A.; TANAKA, A. C.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E. Role of pressor mechanisms from the NTS and CVLM in control of arterial pressure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**., v.289, p. R1416-R1425, 2005.

MUELLER, P. J. Physical (in)activity-dependent alterations at the rostral ventrolateral medulla: influence on sympathetic nervous system regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**., v. 298, p. R1468-R1474, 2010.

MUELLER, P. J.; HASSER, E. M. Piruvate role of the NTS in alterations in neural control of the circulation folloing exercise training in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, p. 383-392, 2006.

MUNTNER, P.; ROCCELLA, H. E. J.; WHELTON, P. K. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the US population. **Hypertension,** v. 39, p. 897-902, 2002.

NEGRÃO, C. E; MOREIRA, E. D.; SANTOS, M. C.; FARAH, V. M.; KIEGER, E. M. Vagal function impairment after exercise training. **J. Appl. Physiol**., v. 72, n. 5, p. 1749-1753, 1992.

NELSON, L.; JENNINGS, G. L.; ESLER, M. D.;KORNER, P. I. The effect of changing levels of physical activity on blood-pressure and hemodynamics in patients within essential hypertension. **Lancet**, v. 2, p. 473-476, 1986.

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

NISHIMURA, M.; MILSTED, A.; BLOCK, C. H.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension. **Hypertension**., v. 20, p. 158-167, 1992.

OLSEN, R.W.; BETZ, H. GABA and Gluycine. In: SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W.; BRADY, S. T.; PRICE, D. L (Ed). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**. 17th ed, Canadá: Elsevier Academic Press, 2006. p. 291-301.

PALKOVITS, M. The anatomy of central cardiovascular neurons. In: FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, B.; HÖKFELT, T. (Ed). **Central Adrenalin Neurons: Basic Aspects and their Role in Cardiovascular Functions**. Oxford: Pergamon Press, 1980. p. 3-17.

PASQUALINI, L.; SCHILLACI, G.; INNOCENTE, S.; PUCCI, G.; COSCIA, F.; SIEPI, D.;LUPATTELLI, G.; CIUFFETTI, G.; MANNARINO, E. Lifestyle intervention improves microvascular reactivity and increases serum adiponection in overweight hypertensive patients. **Nutr. Met. Cardiovasc. Dis**., v. 20, p. 87-92, 2010.

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.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PIALOUX, V.; BROWN, A. D.; LEIGH, R.; FRIEDENREICH, C. M.; POULIN, M. J. Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal woman. **Hypertension**. v. 54, p. 1014-1020, 2009.

POTTS, J. T. Inhibitory neurotranmission in the nucleus tractus solitarii: implications for baroreflex resetting during exercise. **Exp. Physiol.**, v. 91, p. 59-72, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates** (Compact 6th ed). London : Academic, 2009.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav. Brain Res**., V.85, n. 1, p. 57-69, 1997.

REAL, C. C.; FERREIRA, A. F.; HERNANDES, M. S.; BRITTO, L. R.; PIRES, R. S. Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain. **Brain Res**. v. 1363, p. 63-71, 2010.

ROWELL, L. B. Reflex control of the circulation during exercise. **Int. J. Sports Med**., v. 13, n.1, p. S25-S27, 1992.

ROWELL, L. B.; O'LEARY, D. S. Reflex control of the circulation during exercise:chemoreflexes and mechanoreflexes. **J. Appl. Physiol.**, v. 69, n. 2, p. 407-418, 1990.

RUGGERI, A. **Evolução temporal dos efeitos do treinamento aeróbio sobre o conteúdo de ácido γ-aminobutírico e glutamato em áreas de controle autonômico de ratos normotensos e hipertensos**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fisologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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.

SASAKI, S.; TANAKA, T.; HAYASHI, J; KAWASAKY, S.; NAKATA, T.; NAKAGAWA, M. Decreased hypothalamic GABA turnover in spontaneously hypertensive rats (Abstract). **Am. J. Hypertens.**, v. 2, p. 103A, 1989.

SASAKI, S.; TANAKA, T.; KAWASAKY, S.; HAYASHI, J; OGURO, M.; TAKEDA, K.; NAKAGAWA, M. Chronic central GABAergic stimulation attenuates hypothalamic hyperactivity and development of spontaneous hypertension in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol**., v. 15, p. 706-713, 1990.

SASAKI, S.; KUWABARA, T.; YOSHITOMI, T.; YONEDA, Y.; TAKENAKA, K.; TAKESATO, T.; TANAKA, M.; HIRATA, M.; TANABE, S.; NAKATA, K.;TAKEDA, K.; NAKAGAWA, M. Decreased hypothalamic and medullary GABA turnover in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc. Res**., v. 26, p261-264, 1992.

SASAKI, S.; LEE, L.C.; IYOTA, I.; KAMBARA, S.; OKAJIMA, H.; INOUE, A. TAKAHASHI, H.; TAKEDA, K.; YOSHIMURA, M.; NAKAGAWA, M.; IJICHI, H. Central GABA-ergic stimulation attenuates hypertension and hypoyhalamic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 4, supl.3, p. S171-174, 1986.

SASAKI, S.; LEE, L. C; TANAKA, Y.; YOTA, I.;FUKUYAMA, M.; INOUE, A.; TAKEDA, K.; YOSHIMURA, M.; NAKAGAWA, M.; IJICHI, H. Hypotension and hypothalamic depression produced by intacerebroventricular injections of GABA in spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ.,** v. 50, p. 1140-1148, 1986.

SAWCHENKO, P.; SWANSON, L. W. Central noradrenergíc pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. **Science**, v. 214, n. 4521, p. 685-687, 1981.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. lmmunohistochemical 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, n. 3, p. 260-272, 1982.

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

SCHLÜTER, K.; SCHRECKENBERG, R.; REBELO, R. M. C. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. **Hypertens. Res.**, v. 33, p. 1155-1161, 2010

SEARLES, R.V.; YOO, M. J.; HE, J. R.; SHEN, W. B.; SELMANOFF, M. Sex differences in GABA turnover and glutamic acid decarboxylase (GAD(65) and GAD(67)) mRNA in the rat hypothalamus. **Brain Res**. v. 878, p. 11-19, 2000.

SHONIS, C. A.; WALDROP, T. G. Augmented neural activity in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. **Brain Res. Bull**., v. 30, p. 45-452, 1993a.

SHONIS, C. A.; PEANO, C. A.; DILLON, G. H.; WALDROP, T. G. Cardiovascular responses to blockade of GABA synthesis in the hypothalamus of the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res. Bull**., v. 31, p. 493-499, 1993b.

SILVA, G. J. J.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 30, n. 2, p. 714-719, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 13, n. 4, p. 256-312, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 95 (supl.1), p. 1-51, 2010.

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

SOUZA, C. G.; 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, n. 9, p. 1471-1476, 2001.

SPYER, K. M. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **J. Physiol**.; v. 474, p. 1–19, 1994.

STORNETTA, R. L & GUYENET, P. G. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. **J Comp Neurol**. v. 407, n. 3, p.367-80, 1999.

SUN, M. K. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. **Progr. Neurobiol.**, v. 47, n. 3 ,p. 157-223, 1995.

SVED, A. Tonic glutamatergic drive of RVLM vasomotor neurons? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol**., v. 287, p. R1301-1303, 2004.

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

VAN GIERSBERGEN, P. L. M.; PALKOViTS, M. DE JONG W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiol. Rev.**,v. 72, n. 3, p. 789-824, 1992.

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.

VAROQUI, H.; SCHAFER, M. K. H.; ZHU, H.; WEIHE, E.; ERICKSON, J. D. Identification of the differentiation-associated Na^+/ P_I transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 1, p. 142-155, 2002.

WANG, L.; SPARY, E.; DEUCHARS, J.; DEUCHARS, S. A; Tonic GABAérgic inhibition of sympathetic preganglionic neurons: a novel substrate for sympathetic control. **J. Neurosci**., v. 28, n. 47, p. 12445-12452, 2008.

WATSON, P. A.; REUSCH, J. E.; MCCUNE, S. A; LEINWAND, L. A.; LUCKEY, S. W.; et al. Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptative cardiac hypertrophy in response to exercise. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**., v. 293, p. H246-H259, 2007.

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