

**MARINA TUPPY CAVALLERI**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO E DA REMOÇÃO  
DOS BARORRECEPTORES ARTERIAIS SOBRE A  
MODULAÇÃO OCITOCINÉRGICA DO CONTROLE  
CARDIOVASCULAR EM NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

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

São Paulo  
2012

**MARINA TUPPY CAVALLERI**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO E DA REMOÇÃO  
DOS BARORRECEPTORES ARTERIAIS SOBRE A  
MODULAÇÃO OCITOCINÉRGICA DO CONTROLE  
CARDIOVASCULAR EM NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini

Versão original

São Paulo  
2012

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

© reprodução total

Cavalleri, Marina Tuppy.

Efeitos do treinamento aeróbio e da remoção dos barorreceptores arteriais sobre a modulação ocitocinérgica do controle cardiovascular em normotensos e hipertensos / Marina Tuppy Cavalleri. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Ajustes periféricos e centrais do controle cardiovascular na hipertensão e normotensão: Efeitos do treinamento físico

Versão do título para o inglês: Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity.

Descritores: 1. Treinamento físico 2. Hipertensão 3. Barorreceptor 4. Desnervação sinoaórtica 5. Neurônios Ocitocinérgico 6. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                   Marina Tuppy Cavalleri.

Título da Tese:                   Efeitos do treinamento aeróbio e da remoção dos barorreceptores arteriais sobre a modulação ocitocinérgica do controle cardiovascular em normotensos e hipertensos.

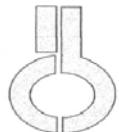
Orientador(a):                   Lisete Compagno Michelini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)                    Reprovado(a)

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÉNCIAS 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 **013** nas fls. **54**do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Lisete Compagno Michelini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Efeito do treinamento e da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais sobre a modulação vasopressinérgica e ocitocinérgica do controle cardiovascular em normotensos e hipertensos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Marina Tuppy Cavalleri, Kátia Burgi, Maria Tereza Jordão** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **29.04.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de abril de 2008.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

*DEDICO ESTA TESE A MEU MARIDO JOSÉ PAULO  
E A MEUS FILHOS ENZO E LUCA, SEM OS QUAIS  
NÃO HAVERIA MOTIVAÇÃO ALGUMA  
PARA SEGUIR EM FRENTE.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lisete Compagno Michelini, por ter acreditado em mim e me dado à oportunidade de trabalhar ao seu lado e acima tudo pela grande contribuição para minha formação tanto científica como ser humano.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena e toda equipe do seu laboratório pela grande ajuda.

À Rosangela (Rosa) por todo apoio tanto técnico quanto pessoal, essa tese não ficaria pronta sem a sua ajuda. Muuuuito obrigada.

À prima/irmã/amiga Kátia por toda a ajuda, amizade e apoio.

Ao Alexandre Ceroni, técnico do laboratório, que mesmo às vezes um pouco nervoso me ajudou muito. Obrigada!!!

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

À grande amiga Tereza por todo apoio e amizade!!!!!! Muito obrigada gorda!!!!!!

A mais nova integrante do laboratório, Josi, que em pouco tempo cativou meu coração e se tornou uma grande amiga, obrigada pela ajuda tanto científica como pessoal e claro pelas váaaaaaarias cervejas!!!!

Aos meus filhos Enzo e Luca. Obrigado por tudo, não teria conseguido sem vocês!!!

Ao meu marido/amigo/companheiro José Paulo por todo apoio, carinho, compreensão e pelos momentos que se dispôs da minha presença para que eu cumprisse esta etapa. Te amo!!!

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

Aos meus irmãos, Paula e André pelo carinho e amizade que sempre tiveram por mim.

Ao **CNPQ**, pelo grande auxilio financeiro que propiciou a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram me incentivando e apoiando, nesta jornada.

Obrigada por tudo!!!!

Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima. "  
( Louis Pasteur )

## RESUMO

Cavalleri MT. Efeitos do treinamento aeróbio e da remoção dos barorreceptores arteriais sobre a modulação ocitocinérgica do controle cardiovascular em normotensos e hipertensos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Demonstramos anteriormente que as projeções ocitocinérgicas (OTérgicas) provenientes do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que se projetam para o tronco cerebral são responsáveis por mediar os ajustes da freqüência cardíaca (FC) e esses efeitos benéficos induzidos pelo treinamento físico (TF) são abolidos pela desnervação sinoaórtica (DSA; Ceroni et al., 2009). No presente estudo procuramos determinar o efeito combinado do treinamento e da DAS sobre os neurônios OTérgicos do PVN em SHR e WKY. Os ratos foram submetidos à cirurgia DSA ou SHAM e treinados (55% da capacidade máxima) ou mantidos sedentários por três meses. Após as medidas hemodinâmicas basais, os ratos foram profundamente anestesiados. Os cérebros frescos foram congelados e fatias foram cortadas para isolarmos o PVN; as amostras foram processadas para a expressão de OT (Real Time PCR) e os cérebros fixados foram processados para imunofluorescência para OT. Nos ratos SHAM o TF determinou um aumento na capacidade física e no ganho do controle reflexo da FC. O TF reduziu a FC de repouso (-8%) em ambos os grupos, com uma queda na pressão arterial (~10%) apenas nos ratos SHR. Essas mudanças foram acompanhadas por um aumento significativo da expressão do mRNA para OT no PVN (3,9 e 2,2 vezes em WKY e SHR, respectivamente) e na densidade de OT nos neurônios OTérgicos do PVN (2,6 vezes em ambos os grupos) com correlações significativas entre o conteúdo de OT e a bradicardia de repouso induzida pelo

treinamento. A DSA aboliu a expressão do mRNA de OT no PVN e reduziu drasticamente a densidade de OT no PVN de WKY e SHR. O TF não teve efeito sobre a FC, mRNA para OT ou conteúdo de OT após a DSA. A ausência crônica da sinalização aferente dos barorreceptores e quimiorreceptores revela o papel fundamental da sinalização aferente em mediar a plasticidade/atividade dos neurônios OTérgicos do PVN como os efeitos benéficos do treinamento sobre o controle cardiovascular.

**Palavras-chave:** Hipertensão. Treinamento físico. DSA. Ocitocina.

## ABSTRACT

Cavalleri MT. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. [Ph. D. thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

We showed previously that oxytocinergic (OTergic) projections from the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) to the dorsal brainstem mediate training-induced heart rate (HR) adjustments and that beneficial effects of training are blocked by sinoaortic denervation (SAD; *Exp Physiol* 2009;94:630-40; 1103-13). We sought now to determine the combined effect of training and SAD on PVN OTergic neurons in SHR and WKY. Rats underwent SAD or SHAM surgery and were trained (55% of maximal capacity) or kept sedentary for 3 months. After hemodynamic measurements at rest, rats were deeply anesthetized. Fresh brains were frozen and sliced to isolate the PVN; samples were processed for OT expression (Real Time PCR) and fixed brains were processed for OT immunofluorescence. In SHAM rats, training improved treadmill performance and increased the gain of baroreflex control of HR. Training reduced resting HR (-8%) in both groups, with a fall in blood pressure (-10%) only in SHR rats. These changes were accompanied by marked increases in PVN OT mRNA expression (3.9- and 2.2-fold in WKY and SHR rats, respectively) and peptide density in PVN OTergic neurons (2.6-fold in both groups), with significant correlations between OT content and training-induced resting bradycardia. SAD abolished PVN OT mRNA expression and markedly reduced PVN OT density in WKY and SHR. Training had no effect on HR, PVN OT mRNA, or OT content following SAD. The chronic absence of inputs from baroreceptors and chemoreceptors uncovers the pivotal role of afferent

signaling in driving both the plasticity and activity of PVN OTergic neurons and the beneficial effects of training on cardiovascular control.

**Key words:** Hypertension. Exercise. SAD. Oxytocin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Esquema ilustrativo mostrando a alça primária ou bulbar de controle reflexo da PA (receptores, aferências periféricas, áreas bulbares, eferências pelo sistema nervoso autônomo) e a alça suprabulbar ou modulatória do controle cardiovascular (áreas bulbares, projeções catecolaminérgicas ascendentes, núcleos hipotalâmicos, projeções vasopressinérgicas e ocitocinérgicas descendentes ao bulbo). ..... 27
- Figura 2** - Esquema ilustrativo especificando as secções dos baros e quimiorreceptores durante a cirurgia de desnervação sinoaórtica..... 38
- Figura 3** - Esquema ilustrando as regiões de interesse (NTS; RVLM; PVN) de onde foram obtidos os punches para realização da técnica de RT-PCR. ..... 42
- Figura 4** - Imunofluorescência para OT no PVN medial e caudal, indicando os subnúcleos analisados: dorsal cap (DC), ventromedial (VM), magnocelular (Mg) e posterior (post). ..... 48
- Figure 5** - A. Alterações do desempenho em esteira nos grupos WKY e SHR antes e após as cirurgias SHAM e SAD. B. Comparação da redução do desempenho induzido pelas cirurgias SHAM e SAD. Significâncias ( $p<0,05$ ) são + vs antes da cirurgia; \* vs WKY; # indica uma variação significativa..... 51
- Figura 6** - Evolução temporal do desempenho em esteira de WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM e SAD. Valores são médias  $\pm$ EPM. Significâncias ( $p<0,05$ ) são \* vs WKY; + vs S; # vs semana..... 52
- Figura 7** - Comparação das alterações no desempenho em esteira (ganho) nos ratos WKY e SHR, SHAM e SAD submetidos aos protocolos de treinamento e sedentarismo. Significância ( $p<0,05$ ) + vs S, # semana zero..... 54

<b>Figura 8</b> - Registros da PA pulsátil e FC em 8 ratos representativos dos grupos WKY <sub>SHAMS</sub> e WKY <sub>SHAMT</sub> ; SHR <sub>SHAMS</sub> e SHR <sub>SHAMT</sub> , WKY <sub>SADS</sub> e WKY <sub>SADT</sub> ; SHR <sub>SADS</sub> e SHR <sub>SADT</sub> .....	55
<b>Figura 9</b> - Comparação dos efeitos da desnervação sino aórtica e do treinamento aeróbio sobre os valores basais de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD) e pressão de pulso. Significância ( $p<0,05$ ) * vs WKY; + vs S, # vs SHAM.....	58
<b>Figura 10</b> - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre os valores basais de pressão arterial media (PAM). Significância* vs WKY; + vs S, # vs SHAM ( $p<0,05$ ).....	59
<b>Figura 11</b> - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores basais de freqüência cardíaca (FC). Significância * vs WKY; + vs S, # vs SHAM $p<0,05$ .....	59
<b>Figura 12</b> - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA de OT no PVN. Significância $p<0,05$ , * vs WKY; + vs S, # vs SHAM. ....	61
<b>Figura 13</b> - Correlação entre a expressão de mRNA de OT no PVN e a freqüência cardíaca (FC) basal em WKY e SHR sedentários e treinados submetidos à cirurgia SHAM ou a desnervação sino aórtica (SAD). As equações de regressão foram $Y_{WKY.SHAM} = -0.07x + 24$ , $r = -0.89$ , $P<0.05$ ; $Y_{SHR.SHAM} = -0.03x + 13$ , $r = -0.88$ , $P<0.05$ ; $Y_{WKY.SAD} = -0.003x + 0.37$ , $r = -0.04$ , $P>0.05$ ; $Y_{SHR.SAD} = -0.003x + 0.31$ , $r = -0.06$ , $P>0.05$ . † indica correlação significativa. ....	62
<b>Figura 14</b> - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA OTr no NTS.....	63

- Figura 15** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA OTr no RVLM. Significâncias ( $p<0,05$ ) \* vs WKY; + vs S; # vs SHAM.....64
- Figura 16** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN medial de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) intactos (SHAM). Os núcleos do PVN medial são o dorsal cap (dc), ventromedial (vm) e o magnocelular (mg); 3V indica o 3º ventrículo cerebral.....66
- Figura 17** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN medial de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) desnervados (SAD). Os núcleos do PVN medial são o dorsal cap (dc), ventromedial (vm) e o magnocelular (mg); 3V indica o 3º ventrículo cerebral.....67
- Figura 18** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN posterior de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) nos grupos intactos (SHAM). 3V indica o 3º ventrículo cerebral.....68
- Figura 19** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN posterior de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) nos grupos desnervados (SAD). 3V indica o 3º ventrículo cerebral.....69
- Figura 20** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade de OT em diferentes subnúcleos do PVN: posterior, ventromedial, dorsal cap e magnocelular. Significâncias ( $p<0,05$ ) \* vs WKY; + vs S; # vs SHAM.....71

**Figura 21** - A. Fotomicrografias comparando a densidade de neurônios OTérgicos no SON de WKY e SHR sedentários submetidos à desnervação sinoaórtica (SAD) ou a cirurgia fictícia (SHAM). No painel inferior (B) comparação da densidade relativa de OT no SON dos grupos WKY e SHR sedentários submetidos à SAD ou SHAM. Valores correspondem a medidas em 4-6 cortes/rato, 3-4 ratos/grupo.....73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Seqüência dos primers para HPRT, OT e OTR utilizados no experimento, com designação das respectivas temperaturas de anelamento dos primers (TM), tamanho do fragmento (pares de bases) originadas após PCR (amplicon) e numero de acesso ao GeneBank .....	45
<b>Tabela 2</b> - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima antes e após as cirurgias SHAM e SAD .....	50
<b>Tabela 3</b> - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima dos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 6, 12 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento e sedentarismo. ....	53
<b>Tabela 4</b> - Valores absolutos de pressão arterial sistólica, diastólica e média, pressão de pulso e freqüência cardíaca basais nos oito grupos experimentais. ....	57
<b>Tabela 5</b> - Sensibilidade do reflexo barorreceptor, avaliadas à partir do cálculo do índice médio de bradicardia (IBR) e taquicardia (ITR) reflexas nos diferentes grupos experimentais .....	60
<b>Tabela 6</b> - Valores de expressão relativa de mRNA de OT no PVN e mRNA de OTr no DBS e RVLM nos oito grupos experimentais. ....	61
<b>Tabela 7</b> - Valores da densidade de OT no PVN posterior e diferentes subnúcleos do PVN medial (ventromedial, dorsal cap e magnocelular) nos oito grupos experimentais. ....	70
<b>Tablela 8</b> - Equações de regressão linear correlacionando alterações na imunorreatividade de OT com alterações na frequencia cardiaca basal induzidas pelo	

treinamento nos diferentes subnúcleos do PVN de WKY e SHR submetidos a SAD ou SHAM..... 72

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1 – Grupos experimentais.....40**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Mecanismos bulbares e suprabulbares no controle da pressão arterial.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Hipertensão arterial e o treinamento aeróbio como terapia anti-hipertensiva: efeitos periféricos e centrais.....</b>	<b>28</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Animais experimentais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Teste de esforço máximo .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Desnervação sinoaórtica / cirurgia fictícia (SHAM).....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Adaptação à esteira e treinamento aeróbio de baixa intensidade .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 Grupos experimentais.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Canulação arterial e venosa .....</b>	<b>40</b>
<b>3.7 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....</b>	<b>41</b>
<b>3.8 Comprovação da desnervação sinoaórtica .....</b>	<b>41</b>
<b>3.9 Coleta do tecido cerebral.....</b>	<b>41</b>
<b>3.10 Expressão gênica por Real-Time PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>3.10.1 Extração do ácido ribonucléíoco (tRNA).....</b>	<b>43</b>
<b>3.10.2 Precipitação e lavagem do tRNA .....</b>	<b>43</b>
<b>3.10.3 Integridade do tRNA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10.4 Reação de transcrição do ácido desoxirribonucleíoco complementar (cDNA) .....</b>	<b>44</b>
<b>3.10.5 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real time PCR) .....</b>	<b>45</b>
<b>3.10.6 Análise dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time PCR) .....</b>	<b>46</b>
<b>3.11 Técnica de imunofluorescência para ocitocina.....</b>	<b>46</b>
<b>3.11.1 Quantificação da Imunofluorescência.....</b>	<b>47</b>
<b>3.12 Apresentação dos dados e análise estatística .....</b>	<b>49</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>

<b>4.1 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira de WKY e SHR SHAM e SAD50 .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a hemodinâmica basal e sobre o controle reflexo da FC .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre o sistema OTérgico central.....</b>	<b>60</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre o desempenho físico .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre os parâmetros hemodinâmicos basais .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre o sistema OTérgico central.....</b>	<b>78</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo A- Artigo publicado relacionado à tese .....</b>	<b>96</b>
<b>Anexos B - Artigo publicado não relacionado à tese.....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Mecanismos bulbares e suprabulbaros no controle da pressão arterial

A pressão arterial (PA) é a força motriz responsável pela manutenção da perfusão sistêmica adequada. É resultante da combinação entre o débito cardíaco, resistência periférica e capacidade venosa. É de suma importância que a PA seja mantida em níveis adequados frente a qualquer situação fisiológica como o repouso, o sono, a vigília, o exercício ou mesmo em diferentes patologias. Diversos mecanismos são responsáveis por controlar/manter a pressão arterial (PA) através de ajustes da volemia, da capacidade e retorno venoso, do débito cardíaco (DC) e da resistência periférica (RP). Estes mecanismos envolvem respostas a longo prazo (balanço entre a ingestão/excreção de água e sal), fatores estruturais e respostas mais rápidas (mecanismos neurais, hormonais e locais) (Michelini, 2008). A regulação a curto e médio prazo ou regulação neuro-hormonal da PA envolve basicamente mecanismos reflexos mediados pelos mecanorreceptores arteriais (barorreceptores), quimiorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares além de outros receptores extrínsecos ao sistema cardiovascular, sendo de grande importância para a manutenção da PA tanto no repouso quanto no exercício físico. A regulação comandada pelos barorreceptores arteriais é considerada o principal mecanismo de controle fásico da PA.

Os barorreceptores são terminações nervosas sensíveis à deformação localizadas na adventícia e borda media advencial do arco aórtico e seio carotídeo. São estimulados por alterações da PA que são codificadas em freqüência de potenciais de ação os quais são enviados estas informações a áreas de integração central, desencadeando respostas neurais e hormonais para corrigir de forma rápida as elevações e/ou quedas da PA, propiciando uma rápida e eficiente estabilização da PA batimento a batimento (Michelini e Franchini, 1999).

É bem conhecido que no “círculo neuronal” de regulação da PA, o núcleo do trato solitário (NTS), ocupa uma posição chave para a integração cardiovascular por que se constitui na 1<sup>a</sup> estação sináptica dos barorreceptores periféricos (Bailey et al.,

2006; Dampney, 1994; Michelini e Morris, 1999; Miura e Reis, 1969). A cada sístole arterial, a distensão dos receptores causa despolarização dos terminais nervosos, gerando potenciais de ação que trafegam pelas fibras aferentes dos barorreceptores em direção ao bulbo dorsal, onde contatam e excitam neurônios de segunda ordem localizados no NTS. Neurônios glutamatérgicos do NTS projetam-se para o bulbo ventrolateral caudal (BVLc) onde ativam neurônios inibitórios gabaérgicos que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral (BVLr), área em que se situam os corpos celulares dos neurônios bulbo espinhais simpatoexcitatórios (glutamatérgicos) que se projetam aos pré-ganglionares da medula espinhal (colinérgicos), os quais por sua vez excitam os pós-ganglionares simpáticos (noradrenérgicos). Frente à inibição do BVLr pelo BVLc, ocorre redução do tono simpático com aumento da capacidade venosa (CV) e redução do retorno venoso (RV), redução da freqüência (FC) e contratilidade cardíacas e redução da resistência periférica (RP). Paralelamente, outros neurônios glutamatérgicos do NTS projetam-se e excitam os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (colinérgicos) localizados no núcleo motor dorsal do vago (DMV) e no núcleo ambíguo (NA), os quais se projetam aos pós-ganglionares localizados intramuralmente no coração, reduzindo, quando estimulados, a freqüência cardíaca (FC) (Michelini, 2008). Há, portanto durante estímulação dos barorreceptores, queda da PA, corrigindo sua elevação inicial e trazendo a PA de volta a seus níveis basais. Respostas opostas (aumento do RV, aumento da FC da contratilidade e do débito cardíaco (DC), aumento da RP resultando em aumento da PA) ocorrem durante quedas transitórias da PA que estimulam menos ou não estimulam os barorreceptores arteriais (Michelini, 2008). Desta forma os barorreceptores arteriais, sensíveis a variações instantâneas da PA, mantêm momento-a-momento o controle do tônus simpático e parassimpático para o sistema cardiovascular (Dampney, 1994; Michelini, 1999; 2004; Palkovits, 1980).

Além das respostas neurais, a maior ou menor estimulação dos barorreceptores arteriais acarreta importantes respostas hormonais. Assim durante quedas mantidas de PA há liberação de catecolaminas plasmáticas, intensa liberação de renina, com consequente ativação de formação de angiotensina II e aldosterona, aumento da concentração de vasopressina plasmática e redução da liberação de fator natriurético

atrial, os quais aumentando a resistência periférica e propiciando a retenção hídrica contribuem de forma importante para o restabelecimento da PA a seus níveis basais. Respostas opostas (redução das catecolaminas plasmáticas e dos níveis circulantes de angiotensina II aldosterona e vasopressina e aumento da liberação do fator natriurético atrial) são desencadeadas durante elevações da PA, determinado redução da resistência periférica e do volume circulante, os quais favorecem a queda da PA e seu retorno aos níveis basais.

Além das projeções bulbares o NTS projeta-se também diretamente ou indiretamente, para diferentes áreas suprabulbaras de integração cardiovascular como o hipotálamo (núcleos supra-ótico, SON e paraventricular, PVN), a amígdala e o córtex (Dampney, 1994; Palkovits, 1980; Sawchenko e Swanson, 1981). O NTS recebe também, projeções monossinápticas e/ou polissinápticas de inúmeras estruturas corticais, hipotalâmicas (em especial do PVN), da amígdala, do mesencéfalo, da ponte e do próprio bulbo (Bujis et al., 1978; Nilaver et al., 1980, Sawchenko e Swanson, 1982; Sofroniew e Schrell, 1981). Estas conexões ascendentes do NTS a áreas hipotalâmicas (Kannan e Yamashita, 1985; Van Der Kooy et al., 1984; Ricardo e Koh, 1978) e descendentes do hipotálamo ao NTS e outras áreas bulbares e da medula espinhal (Badoer e Merolli, 1998; Kannan e Yamashita, 1985; Pyner e Coote, 2000; Shafton et al., 1998; Swanson e Sawchenko, 1980) fornecem a estrutura anatômica para um pronto circuito de controle suprabulbar. Além disso, o NTS está em estreita aposição e recebe densa projeção aferente da área postrema (AP), órgão circumventricular que detecta níveis de hormônios circulantes no sangue e no líquido cefalorraquidiano (Ferrario et al., 1986; Bishop e Hay, 1993).

O hipotálamo é uma importante área de integração de funções neuro-vegetativas e comportamentais. Entre os “centros” de modulação, o PVN é de fundamental importância para o controle neuroendócrino, autonômico e comportamental. O PVN comprehende grupamentos de neurônios vasopressinérgicos (VPérgicos) e ocitocinérgicos (OTérgicos) magnocelulares e parvocelulares, cujos axônios projetam-se respectivamente à neurohipófise (liberação de vasopressina (VP) e ocitocina (OT) para o plasma) e ao bulbo e medula espinhal (projeções VPérgicas e OTérgicas que

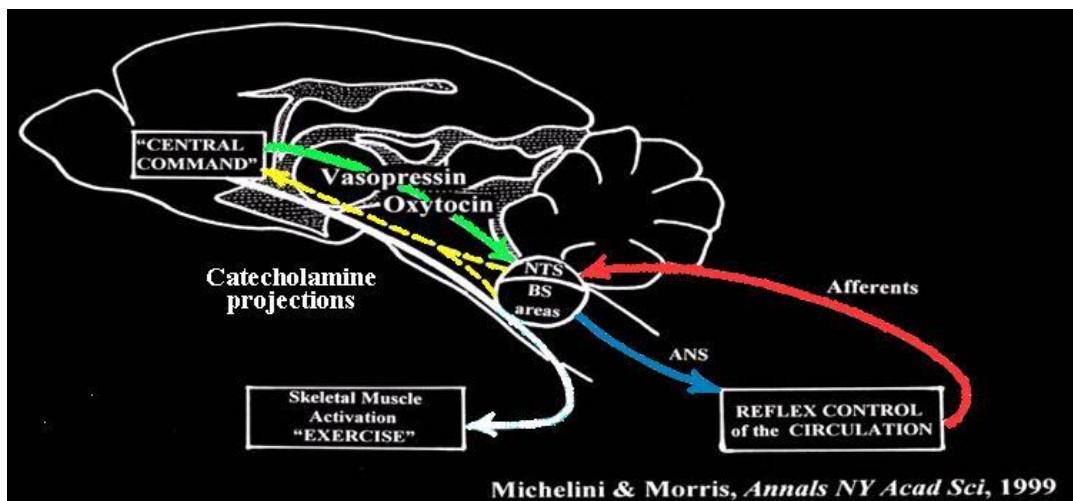
estão envolvidas no controle autonômico da circulação). Enquanto a alça primária de regulação cardiovascular (afferentes periféricos e áreas de integração bulbar) utiliza como neurotransmissores os aminoácidos excitatório (GLU) e inibitório (GABA), a alça suprabulbar (NTS→PVN→NTS, Figura 1) utiliza-se de neurotransmissores catecolaminérgicos e peptidérgicos, de efeito mais lento e que agem como moduladores de integração primaria bulbar (Dampney, 1994; Michelini, 2007a, b; Michelini e Stern, 2009; Sved e Gordon, 1994). As projeções monossinápticas recíprocas entre NTS → PVN (predominantemente noradrenérgicas (Norérgicas) (Kalia et al., 1985; Sawchenko e Swanson, 1981) e entre PVN → NTS, (essencialmente VPérgicas e OTérgicas) (Buijs et al., 1978; Michelini e Morris, Figura 1; Nilaver et al., 1980; Sawchenko e Swanson, 1982; Sofroniew e Schrell, 1981) fornecem substrato anatômico para um importante e pronto sistema de controle através do qual o PVN, controla parâmetros cardiovasculares.

As alças de integração bulbar e suprabulbar (Figura 1) ativadas pelos barorreceptores funcionam conjuntamente de forma a garantir um controle mais eficaz da PA, principalmente durante atividades comportamentais (como é o caso do exercício físico) quando a integração suprabulbar torna-se preponderante em garantir as respostas necessárias à eficiência circulatória (Michelini e Morris, 1999; Michelini, 2001). Por exemplo, elevações de pequena magnitude da PA durante exercício dinâmico (~10-15 mmHg) não são acompanhadas de bradicardia reflexa, mas de intensa resposta taquicárdica, essencial ao aumento do DC, garantindo o fluxo sanguíneo adequado nesta situação (Ludbroock, 1983; Michelini e Morris, 1999; Mitchell, 1990; Michelini, 2007b; Rowell, 1990).

Por outro lado, a eficiência do reflexo barorreceptor encontra-se bastante comprometida na hipertensão arterial crônica (Guo e Abboud, 1984; Krieger et al., 1982; Moreira et al., 1988; Santos et al., 1995, 1998). A manutenção da função barorreflexa durante elevação mantida da PA é possibilitada pela adaptação dos barorreceptores arteriais, os quais apresentam deslocamento de sua faixa de funcionamento para os níveis da hipertensão e, ao se acomodarem aos níveis elevados de PA, passam a mantê-lo como se estes fossem os valores normais (Krieger et al.,

1982). No entanto, a adaptação a hipertensão é acompanhada de redução na sensibilidade dos aferentes aórticos e carotídeos em sinalizar as alterações pressóricas (Krieger et al., 1982; Moreira et al., 1988; Santos et al., 1998). Há prejuízo da integração central a nível do NTS (Michelini e Bonagamba, 1990), alteração do balanço simpato-vagal ao coração com predomínio simpático (Bezerra et al., 2001), aumento da atividade simpática vasomotora (Bezerra et al., 2001) os quais conjuntamente reduzem o funcionamento do reflexo barorreceptor (Santos et al., 1995). Embora as alterações induzidas pela hipertensão na alça primária do controle barorreflexo sejam relativamente bem conhecidas, pouco se sabe sobre os efeitos da hipertensão e da hipertensão associada ao treinamento aeróbio sobre o funcionamento da alça suprabulbar de integração. Uma observação recente de nosso laboratório (Ceroni et al., 2009) indicou que o treinamento aeróbio de baixa intensidade é eficaz em minimizar o déficit do controle reflexo da FC em ratos hipertensos espontâneos (SHR). Não se conhece, no entanto, os mecanismos centrais que condicionam este efeito.

**Figura 1** - Esquema ilustrativo mostrando as alça bulbar e suprabulbar de controle reflexo da PA.



Alça primária ou bulbar de controle reflexo da PA (receptores, aferências periféricas, áreas bululares, eferências pelo sistema nervoso autônomo) e a alça suprabulbar ou modulatória do controle cardiovascular (áreas bulares, projeções catecolaminérgicas ascendentes, núcleos hipotalâmicos, projeções vasopressinérgicas e ocitocinérgicas descendentes ao bulbo).

FONTE: (Michelini e Morris, 1999).

## **1.2 Hipertensão arterial e o treinamento aeróbio como terapia anti-hipertensiva: efeitos periféricos e centrais.**

A hipertensão arterial é uma doença crônico-degenerativa de natureza complexa e multifatorial que atinge cerca de 20 a 30 % da população adulta e 50% ou mais da população idosa além de ser a principal causa de complicações cardiovasculares (Chobanian et al., 2003, Chockalingam, 2008; Mancia e Grassi, 1998). Encontra-se freqüentemente associada a doenças cardiovasculares de alta morbidade e mortalidade como o acidente vascular cerebral, a arteriosclerose, a doença coronariana crônica, o infarto agudo do miocárdio, a doença arterial periférica, a insuficiência renal, etc. Diferentes "trials" internacionais, assim como dados do Ministério da Saúde no Brasil tem indicado as doenças cardiovasculares como a causa de morte mais freqüente (Chobanian et al., 2003, Chockalingam, 2008; Loutzenhiser et al., 2002; Mancia et al., 1998; Muntner et al., 2002). Como revisado anteriormente, diferentes mecanismos são responsáveis por gerar/controlar a PA e, portanto alterações nestes mecanismos podem levar a um descontrole dos níveis pressóricos, instalando-se assim um quadro de hipertensão. Desvendar os mecanismos que levam ao aumento incontrolável de PA e principalmente como eles podem ser corrigidos é de grande interesse experimental e clínico.

Uma vez estabelecida, a hipertensão não tem cura exigindo terapia continuada. Esta constatação tem justificado a procura constante por tratamentos eficazes em reduzir/minimizar os níveis pressóricos. A queda ainda que parcial da PA tem se mostrado eficaz em reduzir a morbi-mortalidade, melhorando significativamente a qualidade de vida dos indivíduos hipertensos (Mancia et al., 2005). No entanto reduzir os níveis de PA é uma tarefa árdua e têm preocupado clínicos/pesquisadores há mais de seis décadas. O tratamento da hipertensão inclui diversas terapias farmacológicas como diuréticos, vasodilatadores, atenuadores do sistema simpático, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da renina, da enzima de conversão e dos receptores da angiotensina II, além de terapias não farmacológicas, que envolvem mudanças de estilo

de vida (Chobanian et al., 2003). Entre as mudanças de estilo de vida, citam-se a restrição da ingestão de sal e álcool, a perda de peso corporal, e principalmente a realização regular de atividade física (Cléroux et al., 1999; Pescatello et al., 2004).

Vários estudos têm confirmado a potencialidade da atividade física repetitiva em reduzir a PA o que, no entanto, depende da intensidade do exercício. Exercícios de baixa intensidade a moderada (40-60% VO<sub>2</sub> max) têm se mostrado eficazes em reduzir a PA enquanto os exercícios de alta intensidade (>85% VO<sub>2</sub> max) não o fazem (Gava et al., 1995; Pescatello et al., 2004; Véras-Silva et al., 1997).

Em particular, o treinamento aeróbio (T), isoladamente e/ou em associação com terapias farmacológicas, tem se mostrado bastante eficaz em reduzir os níveis pressóricos de indivíduos hipertensos leves e/ou moderados a severos (Cleroux et al., 1999; Kaplan, 1991; Kenney e Seals, 1993; Mancia et al., 1998) e tem sido indicado como uma das primeiras condutas terapêuticas (Chobanian et al., 2003). O T também tem se mostrado eficaz em reduzir a PA em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial e entre eles os SHR, tidos como um dos melhores modelos de hipertensão essencial no homem (Amaral et al., 2001; Franca e Michelini, 2001; Melo et al., 2003).

Deve-se ressaltar que o T não altera a PA de normotensos, de forma que a potencialidade em reduzir a PA de hipertensos tem sido atribuída à capacidade do T em alterar os diferentes mecanismos que condicionam o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a queda da PA subsequente ao T em hipertensos:

- redução da FC (Amaral et al., 2000,2001; Jackson et al., 2005; Melo et al., 2003; Veras e Silva et al., 1997);
- redução da reatividade vascular periférica a agentes adrenérgicos (Nelson et al., 1986);
- alteração do balanço simpato-vagal, com redução do tônus simpático ao coração e vasos (Grassi et al., 1994; Negrão et al., 1993);
- aumento da sensibilidade à insulina (Mikines et al., 1989);

- alteração da reatividade vascular, com diminuição da sensibilidade de receptores adrenérgicos e facilitação da liberação de EDRFs em relação aos EDCFs (Koller et al., 1995; Vanhoutte, 1996);
- angiogênese capilar e neoformação de vênulas na musculatura esquelética com aumento da condutância vascular local (Adair et al., 1995; Amaral et al., 2000, 2001; Coimbra et al., 2008; Melo et al., 2003; Struijker-Boudier et al., 1992);
- normalização da elevada razão parede / luz de arteríolas musculares esqueléticas, com normalização da resistência vascular local a qual contribui para redução da resistência periférica (Amaral et al., 2000; Amaral e Michelini, 2011; Melo et al., 2003).

Estes mecanismos, corrigindo as alterações periféricas induzidas pela hipertensão, contribuiriam significativamente para a redução dos níveis pressóricos após o T.

Em relação aos normotensos, trabalhos de nosso e outros laboratórios tem sistematicamente demonstrado que o T induz a bradicardia de repouso e intensa angiogênese capilar em músculos exercitados, mas não modifica de forma significativa o DC (a redução da freqüência é compensada pelo aumento do volume sistólico) e a RP, não alterando os níveis de PA (Amaral et al., 2000; 2001; Clausen, 1977; Greene et al., 1992; Melo et al., 2003). Estas constatações não significam necessariamente que o T não seja benéfico ao sistema cardiovascular de normotensos. Estudos prévios de nosso laboratório foram pioneiros em demonstrar que além das adaptações periféricas o T também determina importantes ajustes em mecanismos centrais de controle cardiovascular. Demonstramos, em ratos normotensos, haver após exercício dinâmico, aumento específico do conteúdo endógeno de VP na região dorsal do bulbo ao nível do obéx compreendendo o NTS, o DMV e adjacências o que sugeria intensa ativação destas projeções a uma importante região de controle cardiovascular durante o exercício (Dufloth et al., 1997; Michelini, 1998). Demonstramos ainda que:

- a ativação das projeções VPérgicas durante exercício era potencializada pelo T (Dufloth et al., 1997; Michelini, 1998), o qual facilitava também a ativação de projeções OTérgicas a esta área (Braga et al., 2000; Michelini, 2001);

- a administração de VP exógena ou seu bloqueio endógeno no NTS de ratos acordados facilitava ou deprimia, respectivamente a taquicardia do exercício (Dufloth et al., 1997; Michelini e Morris, 1999) enquanto que a administração de OT ou bloqueio de seus receptores nesta região reduzia ou potencializava a resposta taquicárdica ao exercício (Braga et al., 2000; Michelini, 2001). Em nenhuma destas situações houve alteração da resposta pressora ao exercício;
- o T era acompanhado de importante plasticidade do sistema OTérgico central: aumento da expressão de RNAm de OT no hipotálamo e maior densidade de projeções OTérgicas ao NTS / DMV, sem alteração da expressão RNAm de receptores de OT na região dorsal do bulbo, (Martins et al., 2005) e que o bloqueio de receptores OTérgicos no NTS / DMV era acompanhado de maior taquicardia do exercício, indicando que a ativação das projeções OTérgicas era eficaz em reduzir a resposta taquicárdica de indivíduos treinados (Higa-Taniguchi e Michelini, 2009, Michelini e Stern, 2009);
- o T não alterava a expressão de VP no hipotálamo e de seus receptores nas regiões de projeção (NTS / DMV), mas aumentava a sensibilidade do receptor a seu agonista endógeno (aumento do KD e IC<sub>50</sub>, radioautografia quantitativa, Souza et al., 2001).

Estes resultados, em conjunto com observações anteriores de nosso laboratório demonstrando que a VP agia em receptores V1 do NTS para reduzir a inibição simpática, durante elevações de PA e deslocar o “set point” do controle reflexo da FC para níveis mais elevados de PA sem alterar sua sensibilidade (Michelini, 1994; Michelini e Bonagamba, 1988), e, que a ativação de receptores OTérgicos no NTS / DMV facilitava o tônus vagal ao coração, propiciando a redução da FC durante elevações transitórias da PA (Higa et al., 2002), permitiram a proposição de que as projeções VPérgicas e OTérgicas do PVN ao NTS/DMV constituem importantes mecanismos de modulação do controle cardiovascular e de que o T é eficaz em melhorar o controle autonômico da circulação em animais normotensos (Michelini, 2007a,b; Michelini e Stern, 2009).

A ativação de projeções VPérgicas ao NTS (que ocorre nos grupos sedentários e treinados (Dufloth et al., 1997) determina, durante o exercício, deslocamento temporário do controle reflexo da FC para níveis mais elevados de PA, permitindo a oclusão da

bradicardia reflexa durante as elevações de pequena magnitude da pressão (faixa de 10~15 mmHg). Esta resposta, característica do exercício dinâmico, permite o aparecimento da resposta taquicárdica essencial ao aumento do DC (Michelini, 2007b; Michelini e Stern, 2009). Por outro lado, a ativação das projeções OTérgicas ao NTS/DMV presente apenas nos grupos treinados (Braga et al., 2000) explica a redução da taquicardia do exercício em cargas submáximas, outra característica funcional do T (é importante lembrar que o treinamento é acompanhado de aumento do volume sistólico, o que permite a manutenção do DC com menor gasto energético (Michelini, 2007b; Michelini e Stern, 2009).

Estas observações demonstram a eficácia do T em ativar as vias eferentes da alça suprabulbar de modulação, ajustando o controle bulbar da função cardíaca e aumentando sua eficiência em indivíduos normotensos. É importante que se ressalte que além deste efeito o T também facilita a sinalização aferente do bulbo ao hipotálamo, bem como aumenta a excitabilidade de neurônios pré-autonômicos do PVN. Dados recentes do nosso laboratório, em colaboração com o laboratório do Dr. Javier E. Stern nos EUA tem demonstrado que o T induz alterações plásticas em neurônios Norérgicos ascendentes do NTS ao PVN, aumentando a imunorreatividade para Dopamina  $\beta$  hidroxilase (DBH) em diferentes subnúcleos do PVN e, principalmente, aumentando a densidade de botões sinápticos imunorreativos para DBH em neurônios pré-autonômicos OTérgicos que se projetam ao NTS/DMV (Higa-Taniguchi et al., 2007). O aumento da ineração noradrenérgica ascendente ao PVN foi também, após T, acompanhada de aumento da excitabilidade intrínseca e da razão “input/output” (patch clamp em fatias do hipotálamo) especificamente em neurônios pré-autonômicos VPérgicos e OTérgicos (Jackson et al., 2005) que se projetam ao bulbo dorsal. Por outro lado houve redução da razão input/output nos neurônios magnocelulares do PVN (Jackson et al., 2005). Mais recentemente demonstramos ainda que o treinamento aeróbio, era efetivo em facilitar o controle OTérgico do PVN ao NTS também em ratos SHR, embora com resposta de menor magnitude que a observada nos normotensos (Higa-Taniguchi et al., 2009).

Em conjunto estes resultados demonstram que o T induz em normotensos e hipertensos importantes alterações plásticas e funcionais na alça supra-bulbar de modulação do controle cardiovascular, ajustando as respostas cardiovasculares ao exercício. Não se conhecem, no entanto, os mecanismos que desencadeiam estes ajustes centrais. Brum et al. (2000) demonstraram que o T facilitava a sinalização aferente pelos barorreceptores arteriais e aumentava o ganho da atividade do nervo depressor aórtico durante variações transitórias da PA. Além disto, observação mais recente do nosso laboratório, mostrou que a desnervação sinoaórtica (SAD) abole os efeitos benéficos do T sobre a FC (não há bradicardia de repouso em normotensos e hipertensos) e não há queda de PA nos hipertensos (Ceroni et al., 2009). Os efeitos da remoção dos barorreceptores arteriais (SAD) foram extensamente estudados por Krieger e colaboradores (Franchini e Krieger, 1994; Irigoyen et al., 1998; Krieger et al., 1964; Trindade e Krieger, 1984). Há, após a SAD, hiperatividade simpática com aumento da pressão na fase aguda, mas não fase na crônica, a qual se caracteriza por níveis normais de PA acompanhados por labilidade intensa e persistente, causada pela falta de correção instantânea das oscilações de pressão mediada pelos barorreceptores durante as atividades comportamentais (Franchini e Krieger, 1994; Trindade e Krieger, 1984). É, portanto, possível que a sinalização aferente mediada pelos barorreceptores arteriais seja um dos mecanismos desencadeantes dos ajustes cardiovasculares centrais ao treinamento aerobio. Não se conhecem no entanto, os efeitos da SAD sobre a plasticidade/funcionabilidade da alça suprabulbar de modulação e em especial sobre as projeções OTérgicas do PVN ao NTS. Pretendemos, portanto no presente projeto estudar as alterações plásticas/funcionais induzidas pela remoção dos barorreceptores arteriais sobre as respostas cardiovasculares e sobre expressão do sistema OTérgicos central.

Além disto, observações recentes do nosso laboratório têm indicado que os ajustes centrais ao T são modificados pela hipertensão crônica. Em SHR submetidos ao T de baixa intensidade, houve apenas tendência não significativa ao aumento da ineração noradrenérgica ascendente a neurônios pré-autonômicos (Higa-Taniguchi et al., 2007). Observamos também que a hipertensão é acompanhada por vários efeitos

“deletérios” sobre o controle central do sistema circulatório, como a depressão do sistema OTérgico central (redução da expressão de mRNA do receptor de OT no NTS/DMV) (Martins et al., 2005), conforme evidenciado pelas técnicas de RT-PCR e hibridização *in situ*. Estas alterações poderiam condicionar os déficits da regulação reflexa da PA que caracterizam a hipertensão (Bezerra et al., 2001; Moreira et al., 1992; Santos et al., 1998).

Deve-se notar que o T é eficaz em determinar bradicardia de repouso e em reduzir a PA de SHR (Ceroni et al., 2009; Martins et al., 2005; Melo et al., 2003). Se a SAD interfere ou não com o sistema OTérgico central de hipertenso, não o sabemos. Também desconhecemos se há ou não em normotensos e hipertensos alterações plásticas e/ou funcionais em áreas de modulação bulbar e supra bulbar importantes para a regulação cardiovascular como PVN e o NTS e se a remoção dos barorreceptores pode alterar a modulação suprabulbar mediada pelas projeções OTérgicas.

A ausência deste importante mecanismo de correção instantânea da PA nos permitirá inferir sobre o papel desempenhado pelos barorreceptores (e quimiorreceptores) arteriais nos ajustes dos mecanismos de controle cardiovascular desencadeados pelo treinamento aeróbio.

É nossa hipótese de trabalho que a ausência de sinalização aferente altere a integração suprabulbar do reflexo barorreceptor e prejudique a modulação OTérgica central.

## 2 OBJETIVOS

Frente às evidências experimentais acima elencadas e buscando-se identificar em normotensos e hipertensos o papel desempenhado pelos barorreceptores arteriais nas alterações do sistema OTérgico central induzidas pelo treinamento aeróbio, são objetivos deste projeto, utilizando WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T):

- a) avaliar os efeitos da SAD sobre os valores basais de PA e FC (estudos funcionais)
- b) investigar em WKYs, WKYt, SHRs e SHRt submetidos à SAD ou a cirurgia fictícia (SHAM) os efeitos da remoção dos barorreceptores arteriais sobre:
  - a expressão de mRNA para OT e seu receptores no hipotálamo e áreas bulbares (técnica do RT-PCR)
  - a densidade de neurônios OTérgicos no hipotálamo e sobre a densidade de suas projeções bulbares (técnica de imunofluorescência), identificando as áreas envolvidas na mediação destes efeitos
- c) correlacionar, nos grupos normotensos e hipertensos com e sem remoção dos barorreceptores os dados funcionais às alterações de expressão e conteúdo do sistema OTérgico central induzidas pelo TF.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais**

Foram utilizados ratos WKY e SHR machos provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com dois a três meses de idade, pesando entre 170-200 g no início dos protocolos. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente durante todo o período de experimentação. Os animais foram alojados em caixas de Plexiglas (cinco por caixa) no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica e mantidos em ciclo claro/escuro 12/12 horas e controle de temperatura ambiental, recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB/USP com protocolo nº 013 registrado nas fls 54 do livro 02, aprovado em 29/04/2008. A validade desta licença foi em 21/03/2011 prorrogada até 29/04/2014.

#### **3.2 Teste de esforço máximo**

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada individualmente e de forma indireta, através do teste de esforço máximo. O teste constitui na avaliação do desempenho do rato em esteira ergométrica iniciando-se com a velocidade de 0,3 km/h, com incrementos de velocidade de 0,3 em 0,3 km/h a cada 3 minutos até o ponto de exaustão do animal. O teste foi realizado para todos os animais antes e após a desnervação sinoaórtica ou cirurgia fictícia, assim como no início (semana zero), na metade (6<sup>a</sup> semana) e do final dos protocolos (12<sup>a</sup> semana) de corrida e sedentarismo.

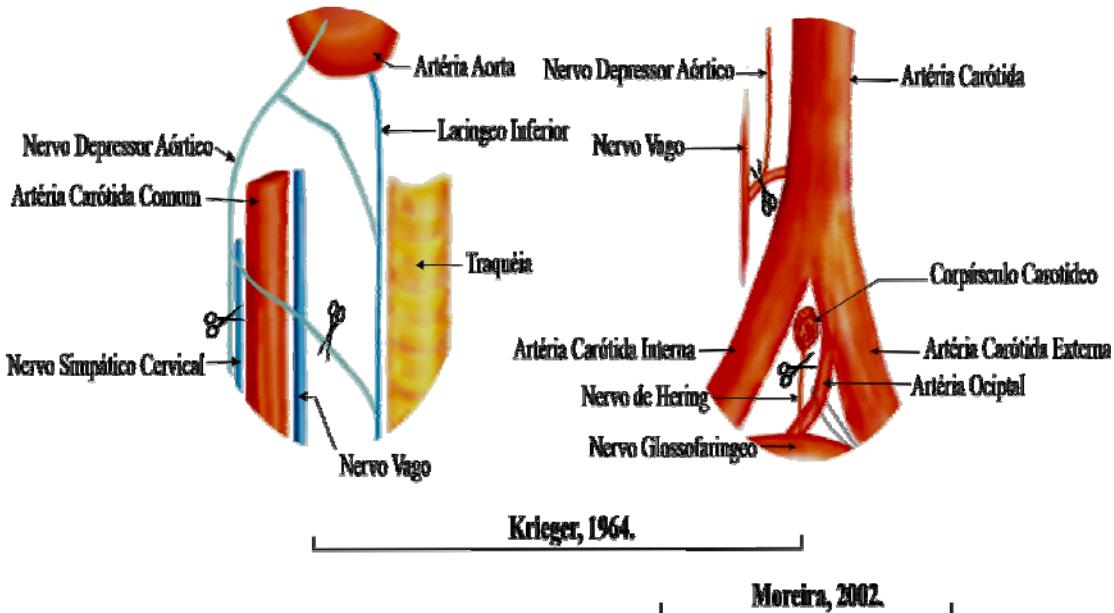
### **3.3 Desnervação sinoaórtica / cirurgia fictícia (SHAM)**

A remoção dos barorreceptores arteriais foi realizada pela técnica de desnervação sinoaórtica (SAD) de acordo com o método descrito por Krieger (1964) e adaptada por Krieger e Moreira, 2007 (comunicação pessoal)\*. Visa à secção das aferências barorreceptoras aórticas e carotídeas resultando na perda da função barorreflexa, mas preservando a integridade do tronco simpático cervical.

Para tanto os animais foram anestesiados com ketamina, xilazina e acepromazina (0,7: 0,2: 0,1v/v, 0,04-0,08 ml/100 g peso, i.m). O procedimento cirúrgico consistiu em uma incisão mediana na região cervical anterior seguido da separação dos músculos pré-tráqueais e localização bilateral do feixe vasculo nervoso (artéria carótida, nervo vago e tronco simpático Figura 2). As fibras barorreceptoras aórticas que trafegam como um ramo separado ou junto ao tronco simpático foram identificadas, isoladas e seccionadas preservando-se o tronco simpático. A bifurcação da carótida comum foi localizada, exposta e dissecada completamente nos dois lados, seccionando-se as fibras carotídeas e destruindo-se o corpúsculo carotídeo. Finalmente, o terceiro contingente de fibras barorreceptoras aórticas que trafega junto ao nervo laríngeo inferior foi interrompido pela secção do nervo laríngeo superior. Os ratos controles foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) que consiste nas mesmas etapas cirúrgicas, exceto a secção/remoção das fibras barorreceptoras. Após a sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico (cetoprofeno 2mg/kg) e antibiótico (Pentabiótico Veterinário 24000 UI/Kg), e foram mantidos em caixas individuais até a completa recuperação cirúrgica ( $\approx$  1 semana).

\* Krieger e Moreira. São Paulo, 2007.

**Figura 2** - Esquema ilustrativo especificando as secções dos barorreceptores e quimiorreceptores durante a cirurgia de desnervação sinoaórtica.



FONTE: (Moreira, ED, 2011)

### 3.4 Adaptação à esteira e treinamento aeróbio de baixa intensidade

O protocolo de treinamento foi feito em esteira ergométrica (KT 3000, Inbramed, Millennium, Porto Alegre, R. S., Brasil) adaptada para ratos. A esteira é constituída de 10 (dez) raias de alumínio e tampa de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente de penumbra para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. Estas modificações facilitam a corrida dos ratos evitando-se o uso de choques elétricos.

O período de adaptação dos animais na esteira ergométrica estendeu-se por 2 semanas (cinco sessões de 0,3 a 0,7 km/h, 0% inclinação, 10 minutos/dia), após os ratos foram submetidos ao primeiro teste de esforço máximo cujos resultados foram utilizados para alocar os ratos, com capacidade física equivalente, aos grupos SAD e SHAM. Após as cirurgias e um período de readaptação à esteira (5 dias) os ratos foram submetidos ao segundo teste de esforço máximo, cujos resultados foram utilizados para se alocar ratos com capacidade física equivalente aos grupos SHAM treinados (T).

SHAM sedentários (S), SAD T e SAD S. Os resultados deste segundo teste de esforço também foram utilizados para se calcular a velocidade media de endurance nos grupos T. Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo.

O protocolo de treinamento aeróbio de baixa intensidade (50-60 % da carga máxima atingida no teste de esforço) abrangeu um programa de exercício repetitivo 1 h/dia, 5 dias/semana, por 12 semanas, padronizado em nosso laboratório (Amaral et al., 2000, 2001; Melo et al., 2003). Iniciava-se com tempos curtos (20-30 minutos/dia) e velocidades baixas (50% da velocidade máxima), atingindo 60% da velocidade máxima e 1h/dia na 3<sup>a</sup> semana. A inclinação foi sempre mantida em 0%. Na sexta e décima segunda semanas foram realizados novos testes de esforço máximo para se reajustar a intensidade do treinamento e aferir-se o ganho da capacidade física dos animais respectivamente. A intensidade escolhida (50-60% da capacidade máxima) tem sido indicada como a intensidade ideal para obtenção de efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular de normotensos e hipertensos (Ceroni et al., 2009; Felix e Michelini, 2007; Martins et al., 2005).

Os ratos alocados ao grupo S foram mantidos sedentários por igual período de tempo e, apenas uma vez/semana colocados na esteira (5 min. com velocidade de ~0,5 km/h) para que se acostumassem ao manuseio experimental e à esteira. Os ratos sedentários também realizaram testes de capacidade máxima nos mesmos períodos que os treinados.

### **3.5 Grupos experimentais**

Com os ratos WKY e SHR, submetidos ou não à desnervação sino aórtica e aos protocolos de treinamento ou sedentarismo, foram formados 8 grupos experimentais, a saber :

**Quadro 1 – Grupos experimentais.**

Grupos	Intactos (SHAM)	Grupos	Desnervados (SAD)
1	WKY <sub>SHAM S</sub>	5	WKY <sub>SAD S</sub>
2	WKY <sub>SHAM T</sub>	6	WKY <sub>SAD T</sub>
3	SHR <sub>SHAM S</sub>	7	SHR <sub>SAD S</sub>
4	SHR <sub>SHAM T</sub>	8	SHR <sub>SAD T</sub>

FONTE: (Cavalleri, 2012).

### **3.6 Canulação arterial e venosa**

O procedimento de canulação é necessário para a avaliação direta dos parâmetros hemodinâmicos. Ao final dos protocolos de treinamento ou sedentarismo, os ratos foram anestesiados com ketamina, xilazina e acepromazina (0,7:0,2:0,1v/v, 0,04 ml/100 g peso, i.m.). Foi dissecada a fossa ilíaca para isolamento e canulação crônica da artéria femoral. A cânula intra-arterial foi confeccionada com dois segmentos de Tygon 13 cm do tubo 0,06:0,02 in soldada por aquecimento a 3 cm do tubo 0,03:0,01 in, preenchida com solução salina heparinizada (0,1:1ml) e mantida ocluída com um pino de aço. A parte mais fina da cânula foi introduzida em sentido cranial e fixada na artéria, à parte mais grossa foi exteriorizada e fixada no dorso do pescoço do animal através do tecido subcutâneo. Ao mesmo tempo cirúrgico foi introduzida uma segunda cânula na veia femoral para injeção de drogas. Após sutura e assepsia da pele, os ratos foram tratados com analgésico e antibiótico e foram mantidos em caixas individuais para recuperação cirúrgica.

### **3.7 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

Os valores basais de PA e FC foram obtidos 24 horas após canulação e 26-30 horas após a última sessão de exercício, com os animais acordados e com livre movimentação. Para tanto a cânula arterial foi acoplada ao sistema de registro (transdutor mais pré-amplificador conectados ao 3400 Gould Recorder, Cleaveland, OH, EUA) e os registros basais contínuos obtidos por 30-40 minutos após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. A FC foi registrada simultaneamente em outro canal (Biotach Gould, Cleaveland, EUA).

### **3.8 Comprovação da desnervação sinoaórtica**

A comprovação da eficiência da SAD em eliminar todas as aferências dos barorreceptores arteriais foi feita após os registros basais de PA e FC. Foram administradas doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio iv (0,2 a 0,8 µg/kg) e registrados as variações de PA e FC correspondentes. A ausência de bradicardia e taquicardia reflexas indicavam a eficácia de desnervação sino-aórtica.

### **3.9 Coleta do tecido cerebral**

Após os registros funcionais os ratos foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico, 60mg/Kg) e, imediatamente após a parada respiratória perfundidos via ventrículo esquerdo com solução salina tamponada (0,01 PBS, ph 7,4 ~ 20 ml/min por 5min). A pressão de perfusão foi mantida em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes.

Os ratos destinados aos experimentos de PCR (~8 ratos/grupo) a seguir decapitados para remoção do cérebro que foi imediatamente congelado (gelo seco). Fatiias cerebrais (800-1000 µm de exessura) do hipotálamo e do tronco cerebral (nível do óbex) foram isoladas para obtenção de “punches” bilaterais (~1,5 mg/punch) direcionados ao PVN (englobando as partes medial e caudal do núcleo e tecidos

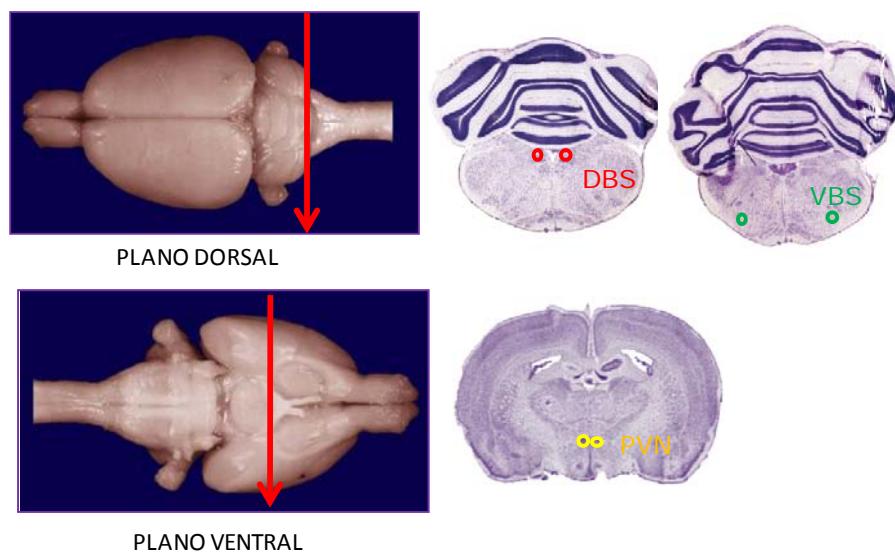
circunvizinhos), ao NTS (englobando o NTS medial, intermediário e caudal, mais DMV e tecidos circunvizinhos), e ao RVLM (englobando o RVLM, NA e áreas circunvizinhas). As amostras foram coletadas em 500 µl de Trizol® (Invitrogen, São Paulo, S. P., Brasil) e armazenadas a - 80 °C até o processamento do PCR.

Os ratos destinados aos estudos de imunofluorescência (4-5 animais /grupo) foram após a perfusão com salina tamponada, perfundidos com paraformaldeído a 4% (em PBS, ph 7,2, 10 ml/min, por 50 min). Os ratos foram decapitados para remoção do cérebro que foi pós fixado em paraformaldeído 4% por 4 horas a 4 °C e crioprotegidos em 0,01M PBS contendo 30% de sacarose a 4 °C por 3-4 dias. Os cérebros foram enrolados em papel alumínio e armazenados a -80 °C até o processamento histológico.

### 3.10 Expressão gênica por Real-Time PCR

A expressão gênica para os genes de interesse foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR).

**Figura 3** - Esquema ilustrando as regiões de interesse (NTS; RVLM; PVN) de onde foram obtidos os punches para realização da técnica de RT-PCR.



FONTE: (Cavalleri, 2012).

### **3.10.1 Extração do acido ribonucléíoco (tRNA)**

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogenização das amostras de tecidos (punches do PVN, NTS e RVLM) em Trizol®. Após a homogenização as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e então se adicionou 0,2 ml de clorofórmio em cada tubo. Após 15 segundos de agitação por inversão, os tubos foram deixados em repouso por 2-3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 12000 g (15 min a 4 °C). A fase aquosa sobrenadante ( $\approx$  400  $\mu$ l) foi então separada para novo eppendorf.

### **3.10.2 Precipitação e lavagem do tRNA**

O tRNA foi precipitado pela adição de 250  $\mu$ l de álcool isopropílico a 100% acrescentando-se de 2,5  $\mu$ l de glicogênio de ostra. Após 15 segundos de agitação por inversão os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e, então, centrifugados a 12000 g (10 min a 4 °C).

Para lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o RNA precipitado (pellet) foi lavado com 500  $\mu$ l etanol 75% e posteriormente centrifugado a 7500g (5min, 4 °C). Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e com auxilio de ponteiras eliminou-se por capilaridade os resíduos de etanol. Os tubos foram deixados por 10 minutos a temperatura ambiente para secagem total do pellet, na seqüência, adicionou-se 18  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC em cada tubo. Após a diluição dos pelletes, os tubos foram aquecidos a 55-60 °C com agitação seguidos por choque térmico em gelo. O RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro (onda de 260 e 280 nm) e armazenado a -80 °C.

### **3.10.3 Integridade do tRNA**

A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TRIS acetato EDTA, contendo 2 µl/100ml de brometo de etídio, aplicando-se em cada poço 5 µl de uma solução contendo: 0,5 µl de amostra de RNA; 3,5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC 0,01% e 1 µl de tampão de amostra, fixando-se uma voltagem de 70 V por aproximadamente 1 hora (até correr 2/3 do gel). Posteriormente, os géis foram revelados sob luz de ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas com um detector de imagem Chimr-Imager 5500-Alpha Innotech Corporation (Cidade do Cabo, África do Sul). O tempo de exposição foi ajustado pela auto-exposição do aparelho. Por fim, foram visualizadas as bandas 28S e 18S, indicadoras de integridade do RNA.

### **3.10.4 Reação de transcrição do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)**

Cuidadosamente, 2µg de tRNA (amostra) foram avolumados para 10µl de H<sub>2</sub>O DEPC. A esta solução foi adicionado 1µl de oligo dt seguido de aquecimento a 70<sup>0</sup>C por 5 minutos. A esta solução foi adicionado 9 µl de um mix contendo 1 µl da mistura de trifosfato de desoxinucleotideos (dNTPs); 4 µl de tampão de reação; 2,4 µl de magnésio; 0,6 µl de RNase out e, por ultimo, 1 µl da enzima reverse transcriptase Impron II. A mistura foi então homogenizada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente seguido de aquecimento em banho maria a 42<sup>0</sup>C por 1 hora. Posteriormente foi incubada a 70<sup>0</sup>C durante 15 minutos para inativação da enzima. As amostras foram, então, armazenadas a 20<sup>0</sup>C até serem submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR).

### 3.10.5 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real time PCR)

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de cDNA , 0,5 µl do oligonucleotídeo sense, 0,5 µl do oligonucleotídeo anti-sense, 8 µl de H<sub>2</sub>O DEPC e por fim 12,5 µl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen).

As seqüências dos RNA foram extraídas do *GenBank*, desenhadas com auxilio do software *Primer3.e* analisadas no *Blast* para verificar especificidade e tamanho de fragmento. As seqüências dos oligonucleotideos utilizados para amplificação do cDNA, bem como o numero de acesso ao *GenBank* são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Seqüência dos primers para HPRT, OT e OTR utilizados no experimento, com designação das respectivas temperaturas de anelamento dos primers (TM), tamanho do fragmento (pares de bases) originadas após PCR (amplicon) e numero de acesso ao GeneBank.

Gene	Sequências sense e antisense	Número de acesso ao GeneBank	Produto amplificado	Temperatura de anelamento (°C)
HPRT	5'-tttgctgacactgtggattac-3' 5'-tactttatgtccccccgtga-3'	# NM_012583	125	60
OT	5'-tagacctggatatgcgcaag-3' 5'-ctcgagaaggcagactcag-3'	# NM_012996.2	272	60
Otr	5'-atcgtgtgctggacacacttt-3' 5'-aagagcatggcaatgatgaa-3'	# NM_012871. 2	100	60

FONTE: (Cavalleri, 2012).

As condições de PCR utilizadas para amplificar os genes foram: 2 min a 52 °C, 5 min a 95 °C, seguindo-se 40 ciclos na seguinte seqüência: 15 seg 95 °C, 60 seg 60 °C, 20 seg 72 °C, seguido de curva de dissociação (60 a 95 °C).

Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research. A expressão gênica foi quantificada utilizando o calculo do Ct (cycle threshold) utilizando-se o método do ΔΔCt (Pfaffe, 2000). Os resultados foram

apresentados em unidades arbitrárias referente à variação da taxa de indução (fold increase) em relação ao grupo controle. A expressão do gene HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferase), continuamente expresso em todas as amostras, foi utilizada como controle interno para normalização das amostras.

### **3.10.6 Análise dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time PCR)**

A analise dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real foi realizada através da especificidade da reação com SYBR Green, confirmada pela curva de dissociação. A linearidade e eficiência do teste foram avaliadas previamente através de curvas de diluição da amostra. Uma vez que os *amplicons* duplicam-se a cada ciclo, é possível determinar a eficiência de cada reação calculando-se a inclinação (slope) da curva padrão. As reações foram consideradas aceitáveis quando apresentaram eficiência próximas ao ótimo, 1. Este procedimento indica a eficiência dos oligonucleotideos e a melhor diluição do produto de RT a ser utilizada nos ensaios.

## **3.11 Técnica de imunofluorescência para ocitocina**

Os blocos correspondentes ao hipotálamo foram montados no pedestal do criostato (Leica, CM 3050, Solms, Alemanha), com auxílio de gel apropriado (Tissue Freezing Medium – TBS), para obtenção de cortes seqüenciais de 25 µm abrangendo toda a extensão do núcleo de interesse: PVN 1.3 mm a 2.3 mm; NTS: 13.3 mm a 14.3 mm em relação ao Bregma (Paxinos e Watson, 1986). Os cortes coronais foram coletados em diferentes poços de placa de cultura (Falcon 3047) contendo PBS (Phosphate Buffer Saline) a 0,01M, e em seguida, processados para imunofluorescência. Após três lavagens com PBS 0,01M de 10 minutos cada, os cortes foram incubados com anticorpo-primário contra Ocitocina (polyclonal guinea pig anti-oxytocin, Bachem, na concentração de 1/200.000), juntamente com NDS (5% do

volume total) + PBS 0,01M + TRITON x 100 0,3%. O período de incubação foi de 14-16 horas (“over night”). Os controles negativos dos experimentos foram feitos através da omissão de anticorpos primários. Após mais três lavagens de 10 minutos com PBS 0,01M os cortes foram incubados com anticorpos secundários CY3<sub>GP</sub> (CY<sup>TM</sup>3-conjugated affine pure Donkey Anti-Guinea Pig IgG, Jackson Immuno, na concentração de 1/500) por 2 horas. Após 3 novas lavagens com PBS 0,01M os cortes foram colocados numa placa de Petri contendo PBS 0,01 M, e com um pincel puxados delicadamente para a lâmina deixando todos os cortes alinhados. As lâminas montadas foram deixadas para secar em ar ambiente no escuro. Foi colocado Vectashield® (Mounting Medium, Cat.No. H-10000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, C. A., EUA) e as lâminas foram recobertas com lamínula, evitando-se a formação de bolhas. Todas as bordas foram vedadas com esmalte de unha incolor. As imagens foram capturadas em microscópio Leica DMLB, objetiva 40X e posteriormente analisadas e quantificadas através do programa Image J 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

### **3.11.1 Quantificação da Imunofluorescência**

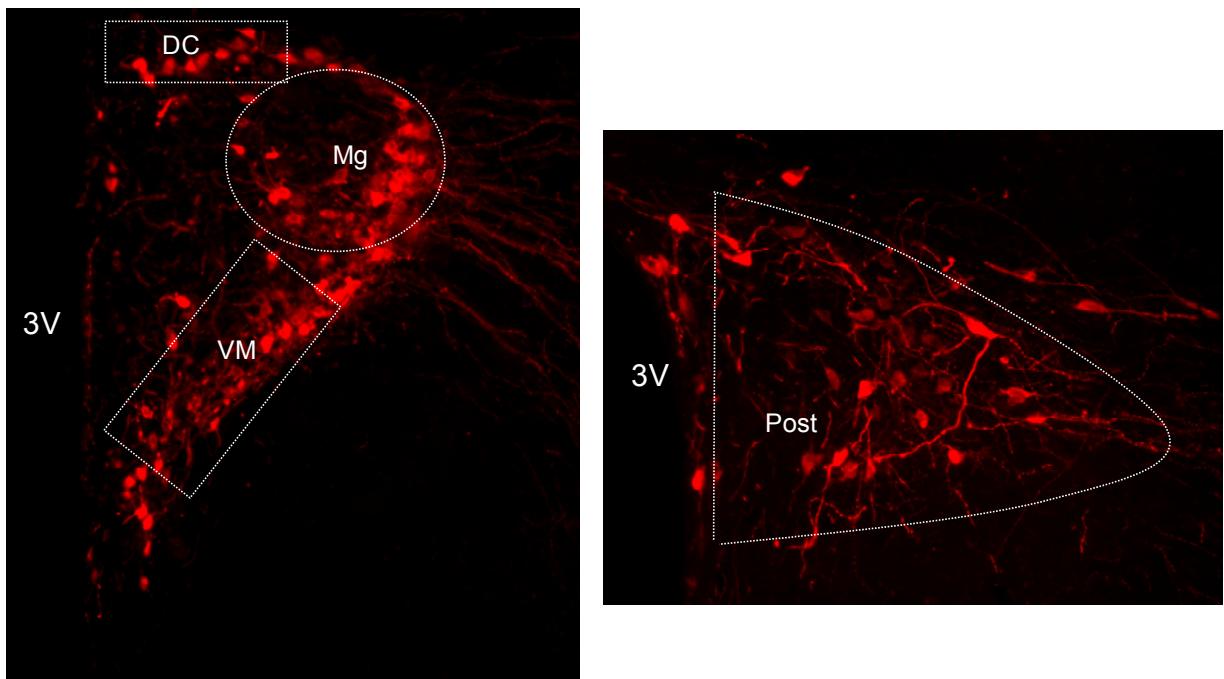
As imagens foram analisadas para localização das áreas de interesse. A quantificação de marcação foi realizada através da análise de imagem utilizando-se o programa Image J 1.42q.

No PVN, onde se situam os corpos celulares dos neurônios OTérgicos, a análise foi feita por região, garantindo-se uma análise refinada e específica de cada subnúcleo do PVN: dorsal cap (DC), ventromedial (VM) e magnocelulares (Mg) no PVN medial e região caudal do PVN (post) (Figura 4). Inicialmente foram traçadas janelas cujos formatos abrangessem os diferentes subnúcleos. Estas janelas foram arquivadas e utilizadas para análise dos diferentes subnúcleos em todas as imagens de modo a manter as mesmas áreas para a aquisição dos dados. No NTS e RVLM não existem neurônios OTérgicos mas sim projeções nervosas marcadas e a análise da densidade das projeções também foi realizada regionalmente em janelas apropriadas. A

intensidade em cada janela sobreposta à imagem foi mensurada (intensidade da região de interesse – intensidade de background calculado em áreas adjacentes). O threshold foi ajustado para passar intensidades 1,5 x acima do background da imagem.

A densidade do sinal (expressa como porcentagem da área de interesse, ou seja, a área ocupada pelo sinal/área de interesse total x 100) foi calculada para cada área cerebral (PVN, NTS, RVLM).

**Figura 4** - Imunofluorescência para OT no PVN medial e caudal, indicando os subnúcleos analisados: dorsal cap (DC), ventromedial (VM), magnocelular (Mg) e posterior (post).



FONTE: (Cavalleri, 2012).

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

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O desempenho em esteira nos grupos SHAM e SAD para SHR e WKY durante os protocolos de treinamento e sedentarismo foi analisado pela analise de variância (ANOVA) de 3 fatores para medidas repetidas (tempo). Os dados funcionais e de expressão gênica e protéica foram analisados pela ANOVA FATORIAL (grupo: SAD x SHAM, linhagem: SHR x WKY e condição: S x T), seguida pelo teste *post-hoc* de Fisher LSD. O software utilizado para realização dos cálculos estatísticos foi o STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre o desempenho em esteira de WKY e SHR

As Tabelas 2 e 3 e as Figuras 5 e 6 apresentam os valores médios absolutos de velocidades máximas atingidas durante os testes de esforços máximos realizados antes e após as cirurgias SHAM e SAD, bem como as alterações de velocidades máximas atingidas nos testes esforço máximos realizados durante os protocolos de treinamento (T) e sedentarismo (S).

No inicio dos experimentos, os SHR apresentaram melhor desempenho em esteira quando comparados a seus respectivos controles WKY ( $1,40 \pm 0,03$  a  $1,44 \pm 0,03$  Km/h vs.  $0,83 \pm 0,02$  a  $0,89 \pm 0,02$  Km/h, respectivamente, Tabela 2). Observou-se em ambos os grupos queda discreta do desempenho nos ratos submetidos à cirurgia SHAM. Por outro lado, a SAD promoveu queda significativa no desempenho dos WKY (de  $0,89 \pm 0,02$  Km/h para  $0,68 \pm 0,02$  Km/h) e SHR (de  $1,44 \pm 0,03$  Km/h para  $1,26 \pm 0,04$  km/h) quando avaliados 2 semanas após a cirurgia (Tabela 2 e Figura 5).

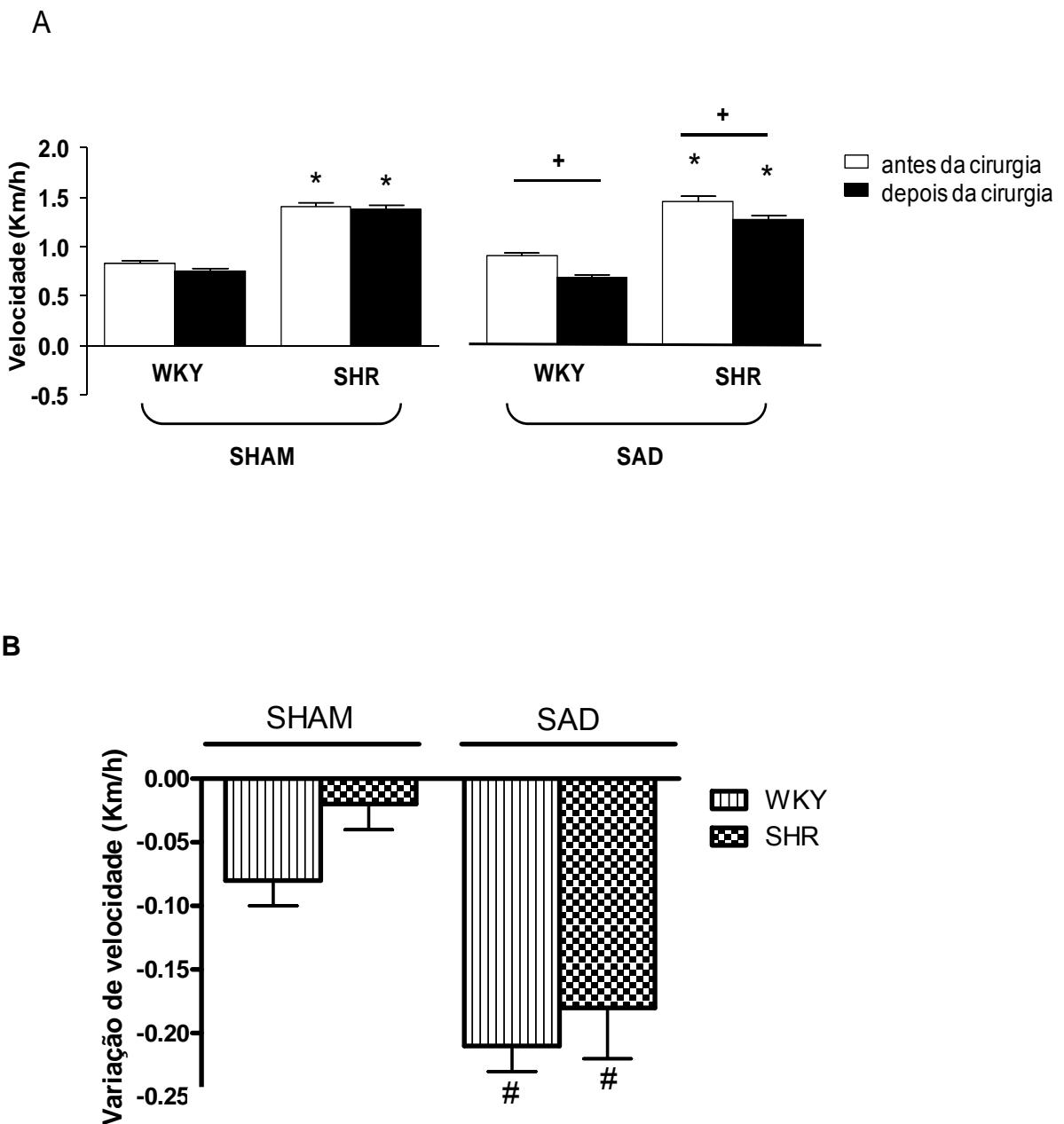
**Tabela 2** - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima antes e após as cirurgias SHAM e SAD.

<b>Desempenho em Esteira</b>	<b>SHAM</b>		<b>SAD</b>	
	WKY (n=54)	SHR (n=58)	WKY (n=60)	SHR (n=52)
Vel. <b>antes</b> da cirurgia (Km/h)	$0.83 \pm 0.02$	$1.40 \pm 0.03^*$	$0.89 \pm 0.02$	$1.44 \pm 0.03^*$
Vel. <b>após</b> a cirurgia (Km/h)	$0.75 \pm 0.02$	$1.38 \pm 0.03^*$	$0.68 \pm 0.02^+$	$1.26 \pm 0.04^{*+}$

Valores são média  $\pm$  EPM. Significâncias ( $p < 0,05$ ) são \* vs WKY ; + vs antes.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

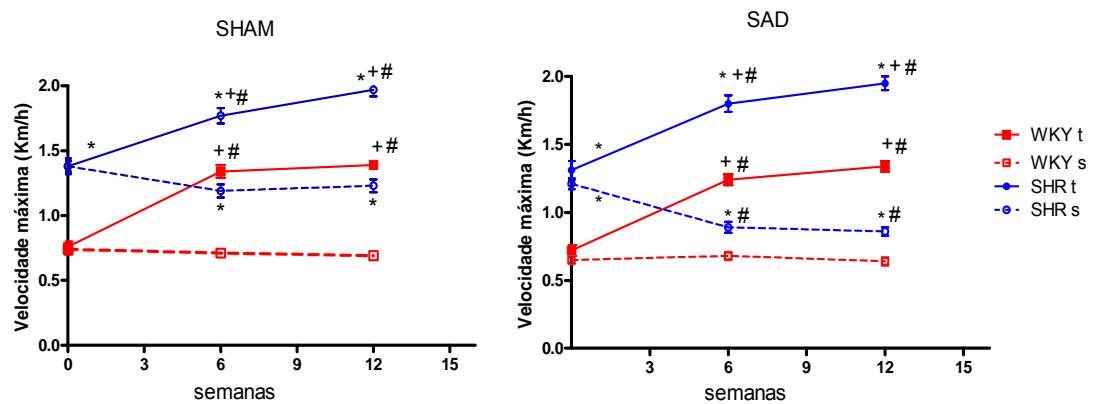
**Figure 5 - A.** Alterações do desempenho em esteira nos grupos WKY e SHR antes e após as cirurgias SHAM e SAD. **B.** Comparação da redução do desempenho induzido pelas cirurgias SHAM e SAD.



Significâncias ( $p<0,05$ ) são + vs antes da cirurgia; \* vs WKY; # indica uma variação significativa.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

Conforme observado na Tabela 3 e Figura 6, em ambos os grupos SHR e WKY submetidos à SAD ou SHAM o T determinou melhora significativa no desempenho em esteira ergométrica, observada já na sexta semana de treinamento. Após 12 semanas de treinamento os SHR submetidos à SAD ou SHAM atingiram velocidades similares de  $1,95 \pm 0,05$  e  $1,97 \pm 0,05$  Km/h, enquanto os WKY atingiram velocidades menores, mas também similares de  $1,34 \pm 0,04$  e  $1,39 \pm 0,03$  Km/h, respectivamente, confirmando o melhor desempenho dos SHR já observado nos ratos intactos antes de qualquer procedimento cirúrgico e/ou experimental e que o TF foi igualmente eficaz em aumentar o desempenho dos WKY e SHR intactos e desnervados (Tabela 3, Figura 6). Nos WKY submetidos à SAD ou SHAM e que foram mantidos sedentários por igual período de tempo, não houve alterações significativas das respectivas velocidades atingidas nos testes de esforço máximo, de forma que ao final das 12 semanas o desempenho dos WKY variava entre  $0,69 \pm 0,03$  e  $0,64 \pm 0,03$  Km/h. Já os SHR SAD sedentários ao final das 12 semanas, apresentaram uma maior perda na capacidade física quando comparado ao SHAM ( $-0,35 \pm 0,05$  vs  $-0,15 \pm 0,08$  Km/h, respectivamente, Tabela 3, Figura 6).

**Figura 6** - Evolução temporal do desempenho em esteira de WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T) submetidos à cirurgia SHAM e SAD.



Valores são médias  $\pm$ EPM. Significâncias ( $p < 0,05$ ) são \* vs WKY; + vs S; # vs semana.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

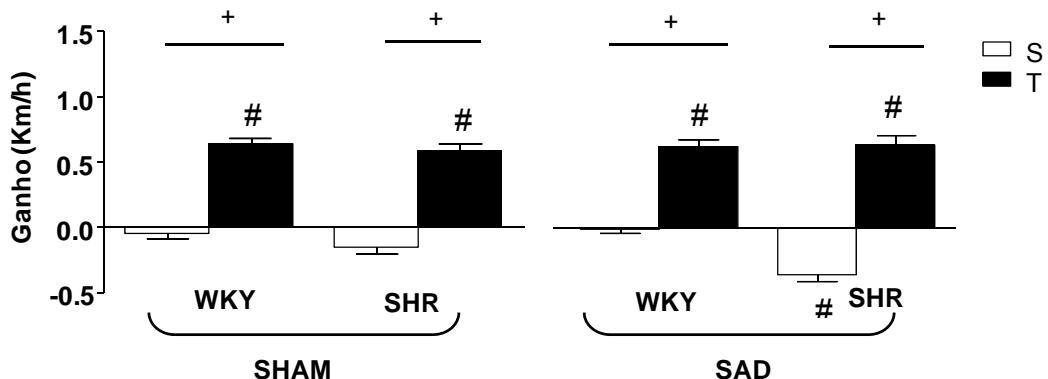
Tabela 3 - Valores absolutos de velocidade máxima atingida durante os testes de capacidade máxima dos grupos SHAM e SAD nas semanas 0, 6, 12 e o ganho obtido ao final dos protocolos de treinamento e sedentarismo.

<b>SHAM</b>	<b>WKY s (n=15)</b>	<b>WKY t (n=14)</b>	<b>SHR s (n=14)</b>	<b>SHR t (n=15)</b>
Semana 0	0,74±0,04	0,76±0,04	1,38±0,06*	1,38±0,04*
Semana 6	0,71±0,03	1,34±0,05+#+	1,19±0,05*	1,77±0,06* + #
Semana 12	0,69±0,03	1,39±0,03+#+	1,23±0,05*	1,97±0,05* + #
Ganho	-0,05±0,03	+0,64±0,04+	-0,15±0,08	+0,59±0,05 +
<b>SAD</b>	<b>WKY s (n=14)</b>	<b>WKY t (n=13)</b>	<b>SHR s (n=13)</b>	<b>SHR t (n=12)</b>
Semana 0	0,65±0,03	0,72±0,04	1,21±0,04*	1,31±0,07*
Semana 6	0,68±0,03	1,24±0,04+ #	0,89±0,03*#	1,80±0,06*+ #
Semana 12	0,64±0,03	1,34±0,04+ #	0,86±0,03*#	1,95±0,05*+ #
Ganho	-0,01±0,04	+0,62±0,05+	-0,35±0,05	+0,64±0,06+

Valores são médias ±EPM. Significâncias ( $p<0,05$ ) são \* vs WKY; + vs S; # vs semana zero.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

A comparação do ganho do desempenho (diferença entre a 12<sup>a</sup> e a semana 0) entre os grupos (Figura 7) mostra claramente a eficácia do T em aumentar a capacidade física de todos os grupos treinados ( $p<0,05$  para alteração de ganho) com aumentos equivalentes em WKY<sub>SHAMT</sub>, WKY<sub>SADT</sub>, SHR<sub>SHAMT</sub> e SHR<sub>SADT</sub>, sem alterações significativas nos grupos sedentários com exceção do grupo SHR<sub>SADs</sub> que apresentou um prejuízo na sua capacidade física ao final do protocolo (-0,35±0,05). Na comparação entre grupos treinados é importante notar, que ao final dos protocolos, o desempenho em esteira foi similarmente aumentado pelo treinamento em todos os grupos experimentais (vs semana zero,  $p<0,05$ , Figura 7, Tabela 3).

**Figura 7** - Comparação das alterações no desempenho em esteira (ganho) nos ratos WKY e SHR, SHAM e SAD submetidos aos protocolos de treinamento e sedentarismo.



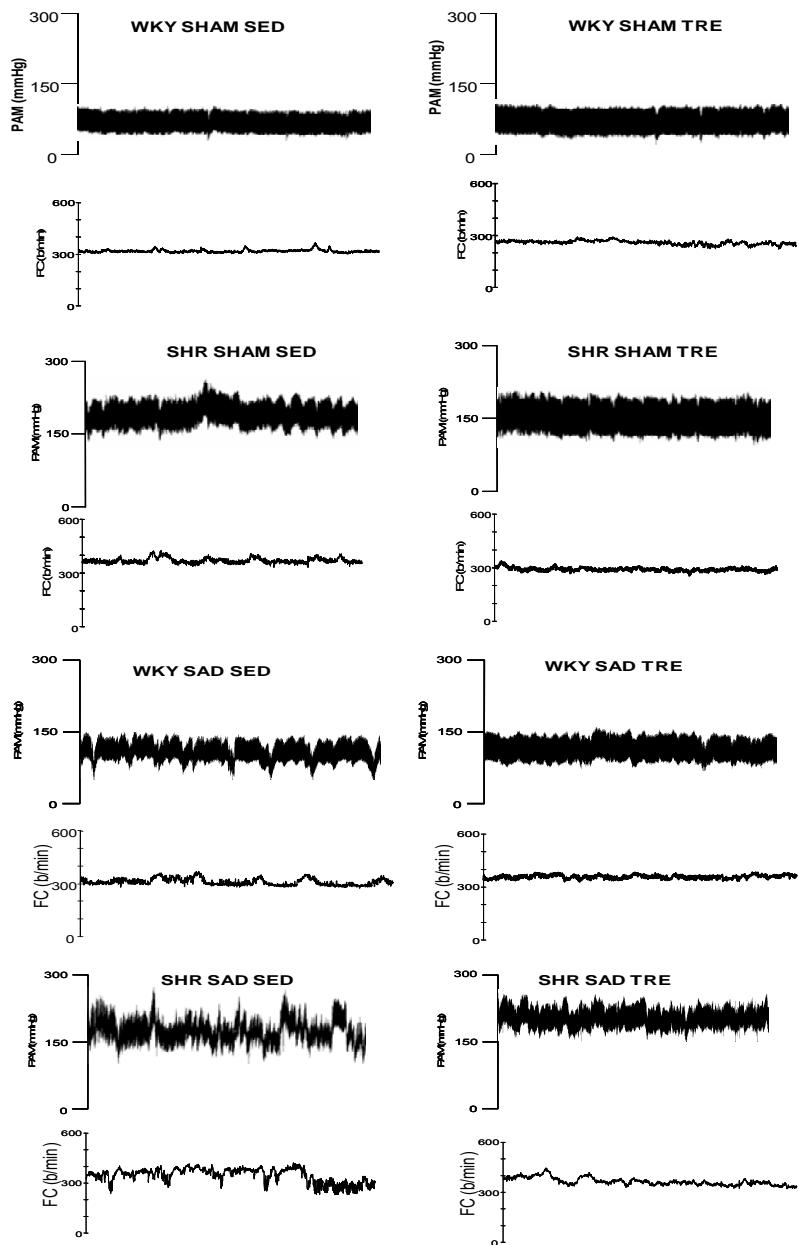
Significância ( $p<0,05$ ) + vs S, # semana zero.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

#### 4.2 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a hemodinâmica basal e sobre o controle reflexo da FC

A Figura 8 apresenta trechos dos registros hemodinâmicos de pressão arterial pulsátil e freqüência cardíaca basais para oito animais representativos dos oito grupos experimentais. Observou-se que os SHR do grupo SHAM apresentam valores elevados de PA e FC, além de apresentarem uma maior labilidade da PA quando comparados aos controles WKY. Observou-se também, que o T reduziu a FC (SHR e WKY), a PA e sua labilidade especificamente dos SHR<sub>SHAM</sub>. Por outro lado a SAD aumentou a labilidade pressórica em ambos os grupos WKY e SHR, a qual, no entanto encontrava-se também reduzida após o T. Interessante foi a observação que no grupo SHR submetido à SAD o treinamento aeróbio parece perder a eficácia em reduzir a PA e FC, ocasionando inclusive aumento adicional de seus valores absolutos. Também nos WKY SAD não se observou redução da FC basal (Figura 8).

**Figura 8** - Registros da PA pulsátil e FC em 8 ratos representativos dos grupos WKY<sub>SHAMS</sub> e WKY<sub>SHAMT</sub>; SHR<sub>SHAMS</sub> e SHR<sub>SHAMT</sub>; WKY<sub>SADS</sub> e WKY<sub>SADT</sub>; SHR<sub>SADS</sub> e SHR<sub>SADT</sub>.



FONTE: (Cavalleri, 2012).

Os valores médios absolutos de pressão arterial (sistólica, diastólica e média), pressão de pulso e freqüência cardíaca de todos os oito grupos experimentais (WKY<sub>SHAMS</sub> e WKY<sub>SHAMT</sub>; SHR<sub>SHAMS</sub> e SHR<sub>SHAMT</sub>, WKY<sub>SADS</sub> e WKY<sub>SADT</sub>; SHR<sub>SADS</sub> e SHR<sub>SADT</sub>) são apresentados na Tabela 4. As medidas hemodinâmicas obtidas durante o repouso mostraram que os grupos SHR SHAM, exibam maior pressão arterial (sistólica, diastólica e média) maior pressão de pulso e FC mais elevada que seus respectivos controles normotensos (Tabela 4, Figuras 9, 10,11). Nos grupos SHAM o TF foi efetivo em diminuir os valores basais de FC (de 362±6 para 323±3 nos SHR e de 310±5 para 289±5 b/min nos WKY, correspondendo a quedas de 11% e 7% respectivamente) e em 10% a PAM dos SHR (de 180±2 para 162±5 mmHg), sem alteração significativa da PAM dos WKY(Tabela 4, Figuras 10 e 11). Além de elevada labilidade (Figura 8) a SAD foi acompanhada nos WKY e SHR sedentários por aumento das pressões sistólicas, diastólicas e média, sem alteração da pressão de pulso e da FC (Tabela 4, Figuras 9, 10, 11). Interessante, foi à observação de que nos grupos submetidos à SAD, o T aumentou a FC basal nos SHR e WKY (de 347±8 para 375±7 e de 320±7 para 348±6 b/min, p <0,05), correspondendo a aumentos de 8% e 9% respectivamente (Tabela 4, Figura 11). O T também determinou aumentos significativos da PAM dos SHR (de 183±2 para 195±4 mmHg p <0,05, correspondendo a um aumento de 7%), sem alterar significativamente a PA no grupo WKY. O T não determinou qualquer alteração da pressão de pulso nos SHR e WKY submetidos à SAD ou SHAM (Tabela 4, Figura 9).

Observamos também que o T melhorou o controle reflexo da FC dos grupos SHAM, conforme indicado pelo cálculo dos índices de bradicardia e taquicardia reflexas (Tabela 5): houve aumentos de 44% e 43% nos WKYt vs WKYs e de 36% e 25% nos SHRt vs SHRs respectivamente para bradicardia e taquicardia reflexas. Por outro lado as respostas bradicárdicas e taquicárdicas encontravam-se muito deprimidas após a SAD (Tabela5), confirmando a eficácia da remoção das aferências dos barorreceptores.

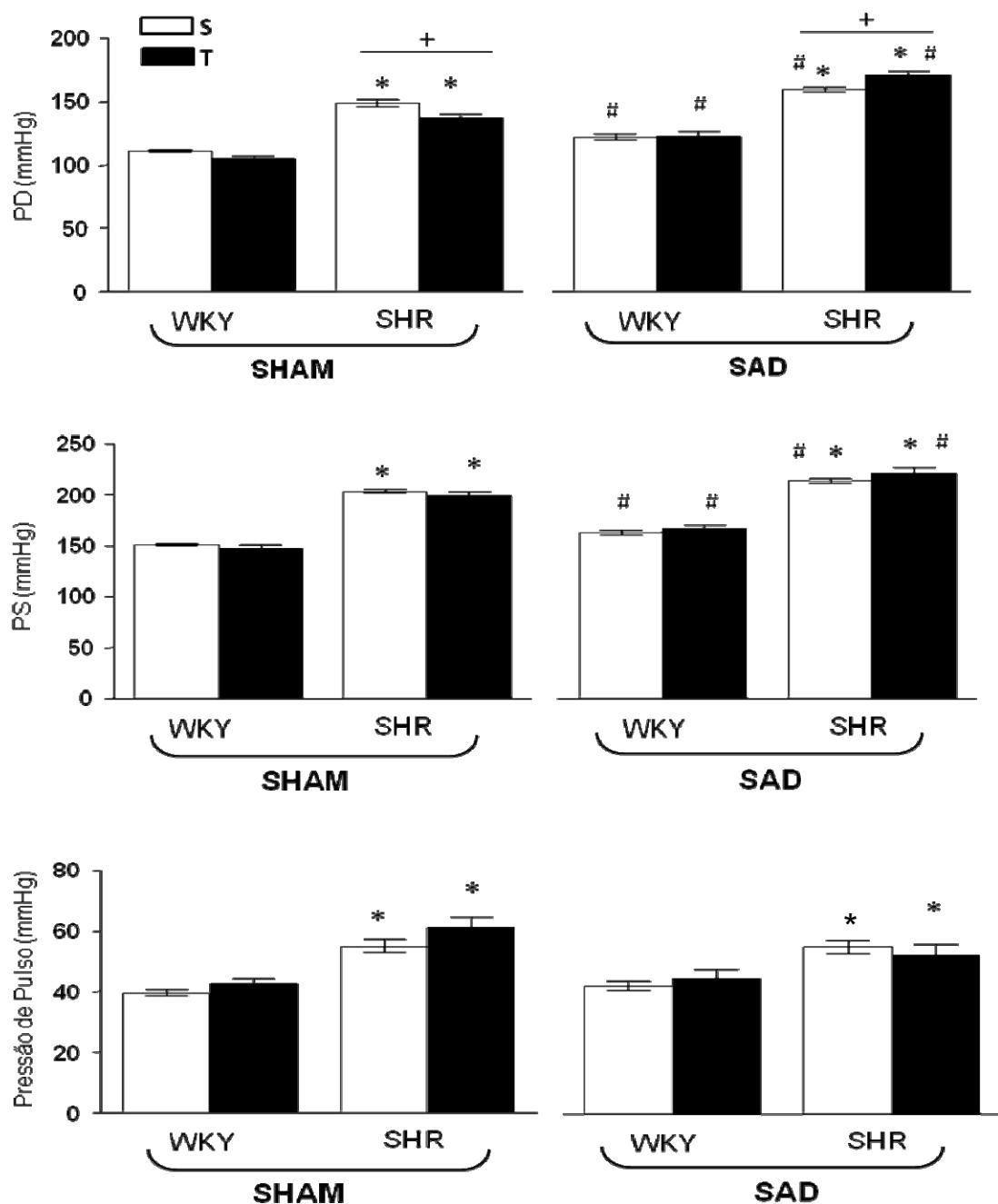
**Tabela 4** - Valores absolutos de pressão arterial sistólica, diastólica e média, pressão de pulso e freqüência cardíaca basais nos oito grupos experimentais.

SHAM	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Pressão Sistólica (mmHg)	151±1	147± 3	204± 3*	199± 4*
Pressão Diastólica (mmHg)	111± 1	105±2	149± 3*	137± 3*+
Pressão Arterial Média mmHg)	130± 2	126± 2	180± 2*	162± 5*+
Pressão de Pulso (mmHg)	39±1	43±2	55±3*	61±3*
Freqüência Cardíaca (b/min)	310±5	289± 5+	362± 6*	323± 3*+
SAD	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Pressão Sistólica (mmHg)	160± 3#	166±4 #	214± 2*#	222± 4*#
Pressão Diastólica (mmHg)	119± 2#	122±3#	159± 2*#	170± 3*#+
Pressão Arterial Média mmHg)	137± 2#	144± 3#	183± 2*	195± 4*+#+
Pressão de Pulso (mmHg)	41±2	44±3	55±2*	52±4*
Freqüência Cardíaca (b/min)	320± 7	348± 6+#+	347±8 *	375± 7+*#+

Valores são médias ± EPM. Foram obtidos em 12-15 ratos/grupo. Significâncias ( $p<0,05$ ) são  
\* vs. WKY, + vs. S, # SHAM.

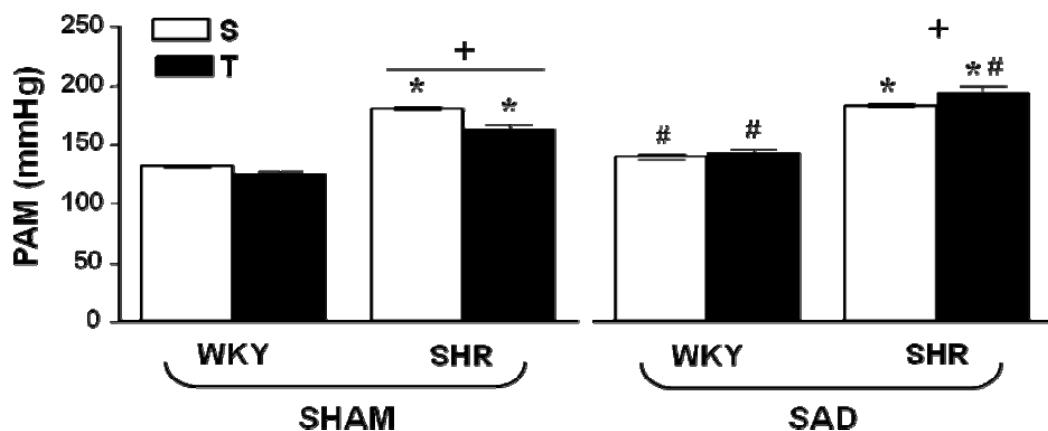
FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Figura 9** - Comparação dos efeitos da desnervação sino aórtica e do treinamento aeróbio sobre os valores basais de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD) e pressão de pulso.



Significância ( $p<0,05$ ) \* vs WKY; + vs S, # vs SHAM.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

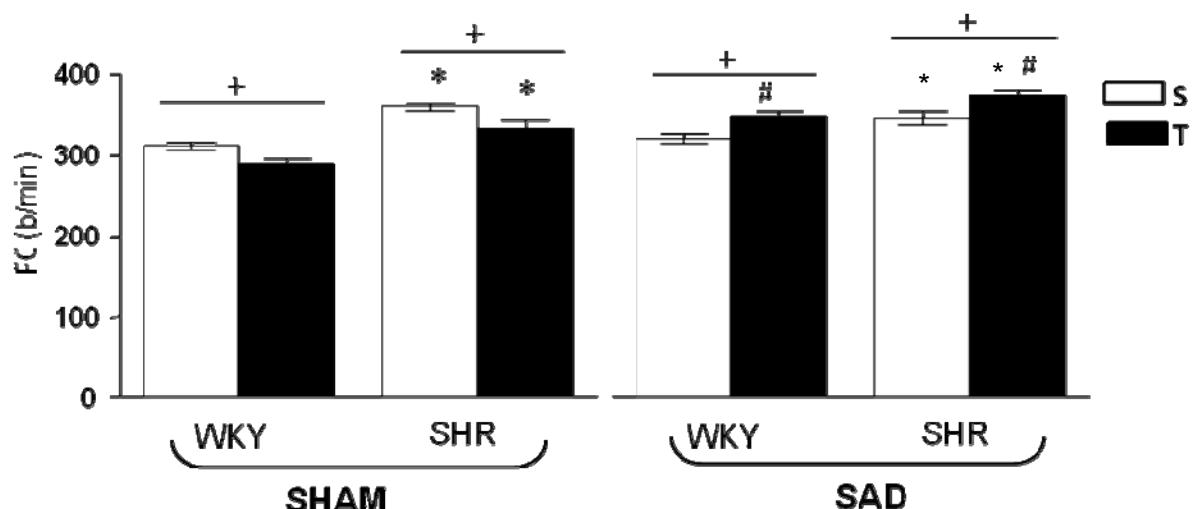
**Figura 10** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre os valores basais de pressão arterial media (PAM).



Significância\* vs WKY; + vs S, # vs SHAM ( $p<0,05$ ).

FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Figura 11** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores basais de freqüência cardíaca (FC).



Significância \* vs WKY; + vs S, # vs SHAM  $p<0,05$ .

FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Tabela 5** - Sensibilidade do reflexo barorreceptor, avaliadas à partir do cálculo do índice médio de bradicardia (IBR) e taquicardia (ITR) reflexas nos diferentes grupos experimentais

	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
<b>SHAM</b>				
IBR (bpm/mmhg)	-1,53±0,07	-2,21±0,10 †	-1,05±0,08 *	-1,43±0,07 *†
ITR (bpm/mmhg)	-2,28±0,09	-3,26±0,12 †	-1,67±0,11*	-2,09±0,10 *†
<b>SAD</b>				
IBR (bpm/mmhg)	-0,23±0,08 #	-0,41±0,10 #	-0,12±0,11 #	-0,20±0,07 #
ITR (bpm/mmhg)	-0,32±0,14 #	-0,53±0,09 #	-0,26±0,10 #	-0,23±0,09 #

Valores são médias ± EPM e foram obtidos em 6-9 ratos/grupo. Significância ( $P<0.05$ ): \* vs WKY; † vs S; # vs SHAM.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

#### 4.3 Efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento físico sobre o sistema OTérgico central

A Tabela 6 sumariza os valores relativos à expressão de mRNA de OT no PVN e de seu receptor no NTS e RVLM. A comparação de expressão de mRNA de OT no PVN dos diferentes grupos (Figura 12) mostrou não haver diferença entre WKY e SHR SHAM sedentários. Nos grupos SHAM, o T foi eficaz em aumentar significativamente a expressão relativa de mRNA de OT nos WKY (de  $1,32\pm0,51$  para  $5,16\pm1,26$ ) e SHR (de  $1,14\pm0,32$  para  $3,04\pm0,61$ ), correspondendo a acréscimos de 3,9 e 2,7 vezes, respectivamente.. A SAD provocou, nos dois grupos experimentais WKY e SHR, uma diminuição drástica de mRNA de OT ( $0,24\pm0,12$  e  $0,09\pm0,01$  respectivamente) e o T não foi eficaz em reverter esta situação (Figura 12, Tabela 6).

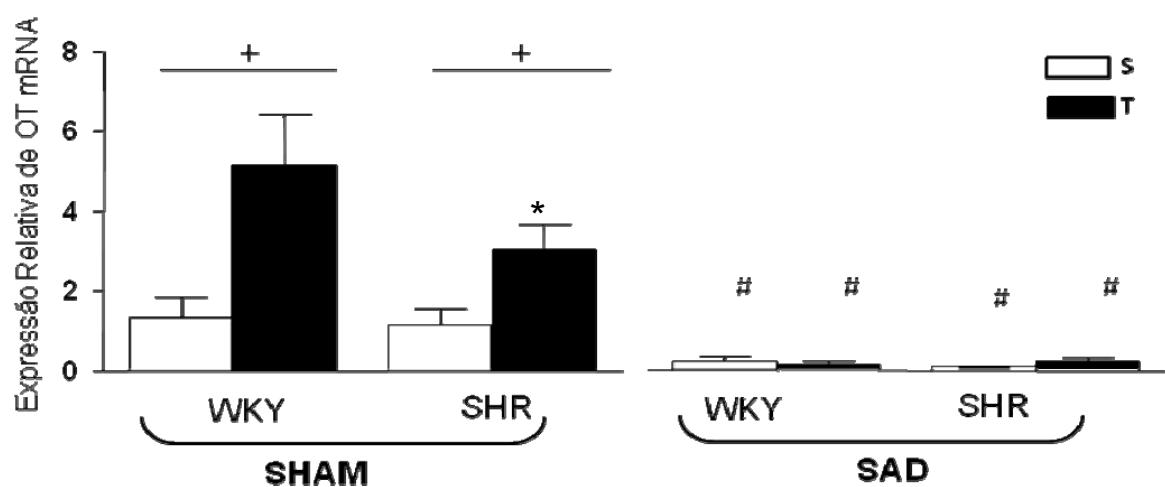
**Tabela 6** - Valores de expressão relativa de mRNA de OT no PVN e mRNA de OTr no DBS e RVLM nos oito grupos experimentais.

SHAM	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
OT mRNA PVN	1,32±0,51	5,16±1,26+	1,14±0,32	3,04±0,61+*
OTr mRNA NTS	1,07± 0,20	0,90 ± 0,16	1,40 ± 0,21	1,42 ± 0,50
OTr mRNA RVLM	0,67±0,19	1,56±0,30	2,70±0,70 *	1,15±0,46+
SAD	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
OT mRNA PVN	0,24±0,12#	0,16±0,06#	0,09±0,01#	0,22±0,10#
OTr mRNA NTS	1,20 ± 0,19	1,10 ± 0,08	0,80 ± 0,24	1,26 ± 0,23
OTr mRNA RVLM	1,75±0,25	1,46±0,22	1,00±0,39 #	0,56±0,18

Valores são médias ± EPM para 7-9 ratos/grupo. Significâncias ( $p<0,05$ ) são \* vs. WKY, + vs. S, # vs SHAM.

FONTE: (Cavallieri, 2012).

**Figura 12** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA de OT no PVN.

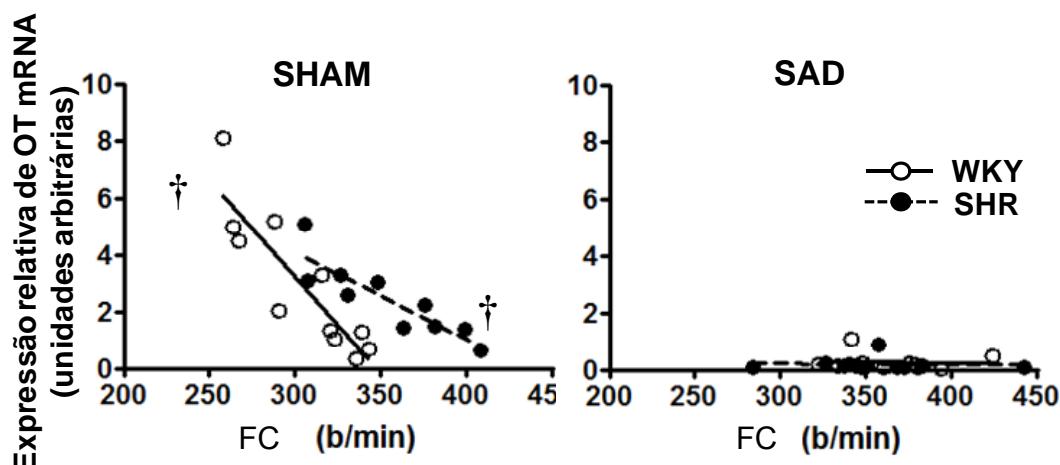


Significância  $p<0,05$ , \* vs WKY; + vs S, # vs SHAM.

FONTE: (Cavallieri, 2012).

Correlacionando para cada rato a expressão relativa de OT no PVN com o respectivo valor de FC basal (Figura 13) observamos para os WKY e SHR intactos, correlações negativas significativas entre estes parâmetros, ou seja, quanto maior a expressão de mRNA de OT no PVN menores os valores da FC basal, tanto no grupo WKY como no grupo SHR, com maior inclinação no grupo WKY (Figura 13). Em relação aos grupos SAD podemos observar que a desnervação sinoaórtica aboliu completamente estas correlações.

**Figura 13** - Correlação entre a expressão de mRNA de OT no PVN e a freqüência cardíaca (FC) basal em WKY e SHR sedentários e treinados submetidos à cirurgia SHAM ou a desnervação sino aórtica (SAD).



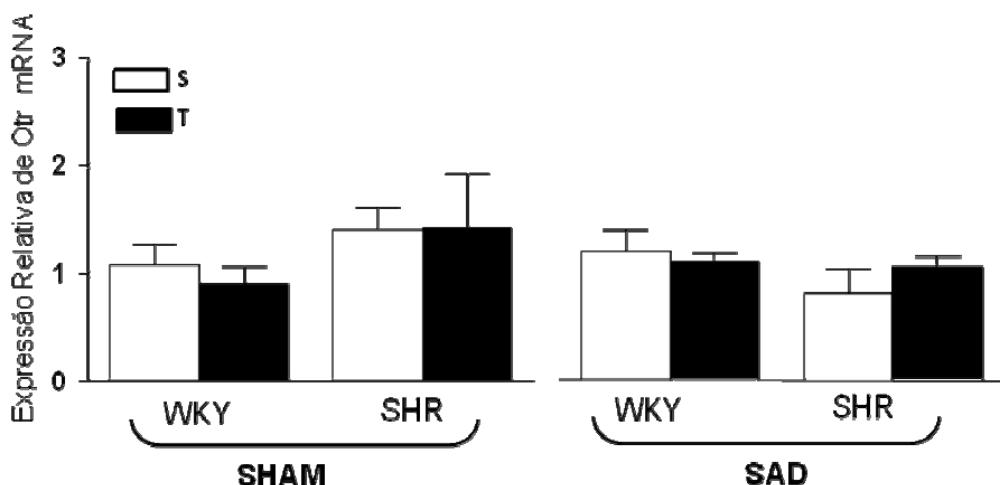
As equações de regressão foram  $Y_{WKY.SHAM} = -0.07x + 24$ ,  $r = -0.89$ ,  $P < 0.05$ ;  $Y_{SHR.SHAM} = -0.03x + 13$ ,  $r = -0.88$ ,  $P < 0.05$ ;  $Y_{WKY.SAD} = -0.003x + 0.37$ ,  $r = -0.04$ ,  $P > 0.05$ ;  $Y_{SHR.SAD} = -0.003x + 0.31$ ,  $r = -0.06$ ,  $P > 0.05$ . † indica correlação significativa.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

Em relação aos receptores de ocitocina (OTr) no NTS, como observamos na Tabela 5 e Figura 14, não houve nos grupos SHAM alteração na expressão relativa do mRNA nem pela hipertensão ( $1,40 \pm 0,21$  vs  $1,07 \pm 0,20$ , SHR vs WKYs) nem pelo T ( $1,42 \pm 0,50$  vs  $0,90 \pm 0,16$ ). Após SAD também não se observaram modificações na

expressão relativa de mRNA OTr nos grupos WKY e SHR quando comparados aos respectivos controles SHAM ou aos respectivos controles sedentários. Em suma, a hipertensão, a desnervação sinoaórtica e o T não modificaram a expressão relativa de mRNA para OTr no NTS.

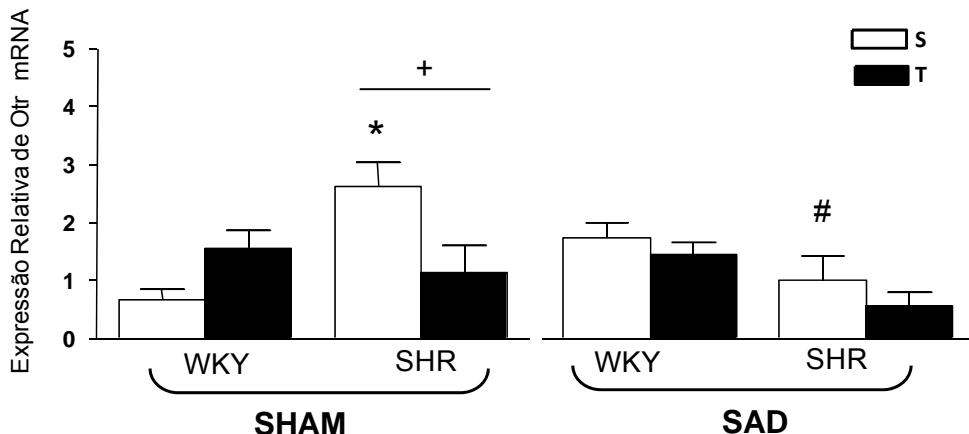
**Figura 14** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA OTr no NTS.



FONTE: (Cavalleri, 2012).

Em relação aos receptores de ocitocina (OTr) no RVLM, como observado na Tabela 5 e Figura 15, houve nos grupos SHAM aumento de expressão relativa do mRNA nos SHRs vs WKYs ( $2,70 \pm 0,70$  vs  $0,67 \pm 0,19$ ). O T reduziu a expressão de RNAm de OTr no RVLM de SHR intactos (de  $2,70 \pm 0,70$  para  $1,15 \pm 0,46$ ) mas não alterou nos WKY SHAM ( $1,56 \pm 0,30$  vs  $0,67 \pm 0,19$ , WKYt vs WKYs). A SAD bloqueou o aumento da expressão relativa de mRNA OTr induzida pela hipertensão, sem a modificar nos demais grupos (Tabela 6, Figura 15).

**Figura 15** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre valores relativos de mRNA OTr no RVLM.



Significâncias ( $p<0,05$ ) \* vs WKY; + vs S; # vs SHAM.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

A Figura 16 ilustra e compara a imunofluorescência de neurônios OTérgicos do PVN medial em WKY e SHR, sedentários e treinados. Observa-se densa marcação nos subnúcleos ventromedial, dorsal cap e magnocelular de WKYs e SHR e que o treinamento foi acompanhado de um grande aumento da fluorescência em ambos os grupos. Em contraste e à semelhança dos dados de mRNA, a imunorreatividade de neurônios OTérgicos foi bastante deprimida após a SAD e nesta situação não afetados pelo treinamento (Figura 17). De forma similar, as Figuras 18 e 19, comparam a imunofluorescência de neurônios OTérgicos no PVN caudal (subnúcleo posterior) de WKY e SHR sedentários e treinados nos grupos SHAM e SAD respectivamente. Há após TF aumento da imunofluorescência para OT nos grupos SHR e WKY SHAM; por outro lado que a SAD é acompanhada de redução da densidade de neurônios OTérgicos bem como pela ausência dos efeitos do T.

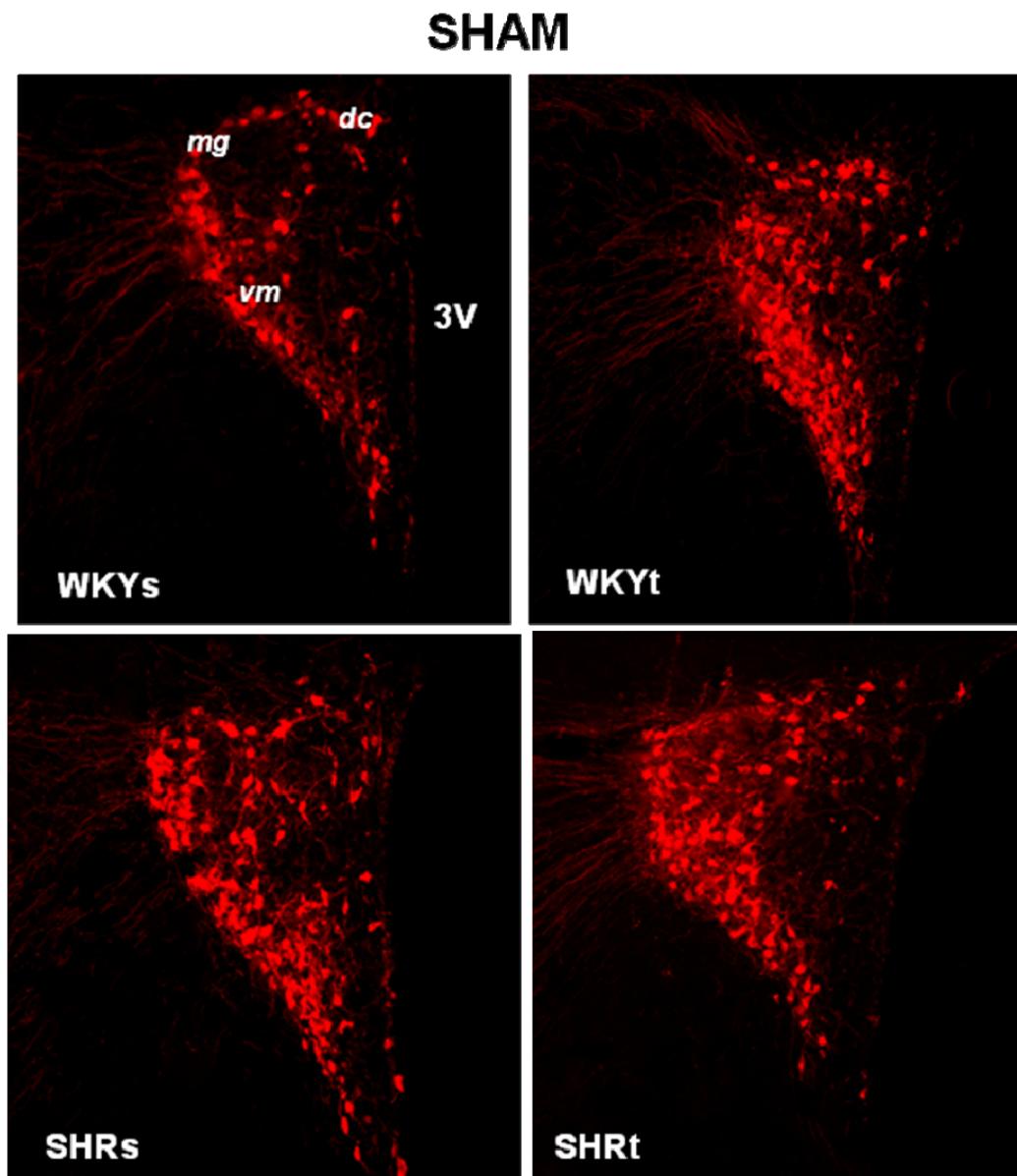
Os dados quantitativos dos 8 grupos experimentais são apresentados na Tabela 7 e comparados na Figura 20. Observa-se no grupo SHAM que os neurônios OTérgicos estão concentrados no subnúcleo ventromedial dos WKY ( $62\% \pm 3\%$  vs 20-30% nos outros subnúcleos,  $p<0,05$ ) e que a hipertensão reduziu o conteúdo de OT nesta área ( $47\% \pm 6\%$  nos SHR), aumentou o conteúdo de OT no subnúcleo magnocelular (de

31 $\pm$  3 nos WKYs para 46  $\pm$  8% nos SHRs) sem alterar seu conteúdo nos subnúcleos posterior e dorsal cap (médias de 29  $\pm$  1 e 20  $\pm$  2 %, respectivamente). Dados do grupo SHAM também confirmaram o intenso aumento na densidade de neurônios OTérgicos induzido pelo treinamento nos subnúcleos posterior (+ 2,9 vezes em ambos, WKY e SHR), dorsal cap (+ 3,3 e 2,9 vezes para WKY e SHR), ventromedial (+1,4 e 1,9 vezes para WKY e SHR) e magnocelular (+3,0 e +1,7 vezes para WKY e SHR, respectivamente, Tabela 7, Figura 20). A SAD deprimiu a densidade de neurônios OTérgicos em todos os subnúcleos de WKY e SHR (reduções de 66% a 77%) (Tabela 7, Figura 20, p< 0,05 para SAD vs SHAM em todas as comparações).

Da mesma forma que observado para a expressão de mRNA de OT no PVN, o conteúdo de OT nos diferentes subnúcleos do PVN correlacionava-se negativa e significativamente com os valores de FC basal exibidos pelos WKY e SHR intactos (Tabela 8). O aumento da densidade de neurônios OTérgicos no PVN posterior e no PVN medial (ventromedial, dorsal cap e magnocelular) após treinamento foi acompanhado de redução da FC basal nos grupos WKY e SHR. Em contraste não se observaram correlações significativas após a SAD (Tabela 8).

Analisamos também a imunofluorescência de neurônios OTérgicos antes e após a SAD no núcleo supraóptico, (SON, Figura 21): a densidade de OT foi similar para os grupos WKY SHAM sedentário e SHR SHAM sedentário (53 $\pm$ 2% e 54 $\pm$ 2%) e a desnervação sinoaórtica não provocou quaisquer mudanças neste padrão (56 $\pm$ 1% e 54 $\pm$ 1, após SAD, respectivamente, Figura 21).

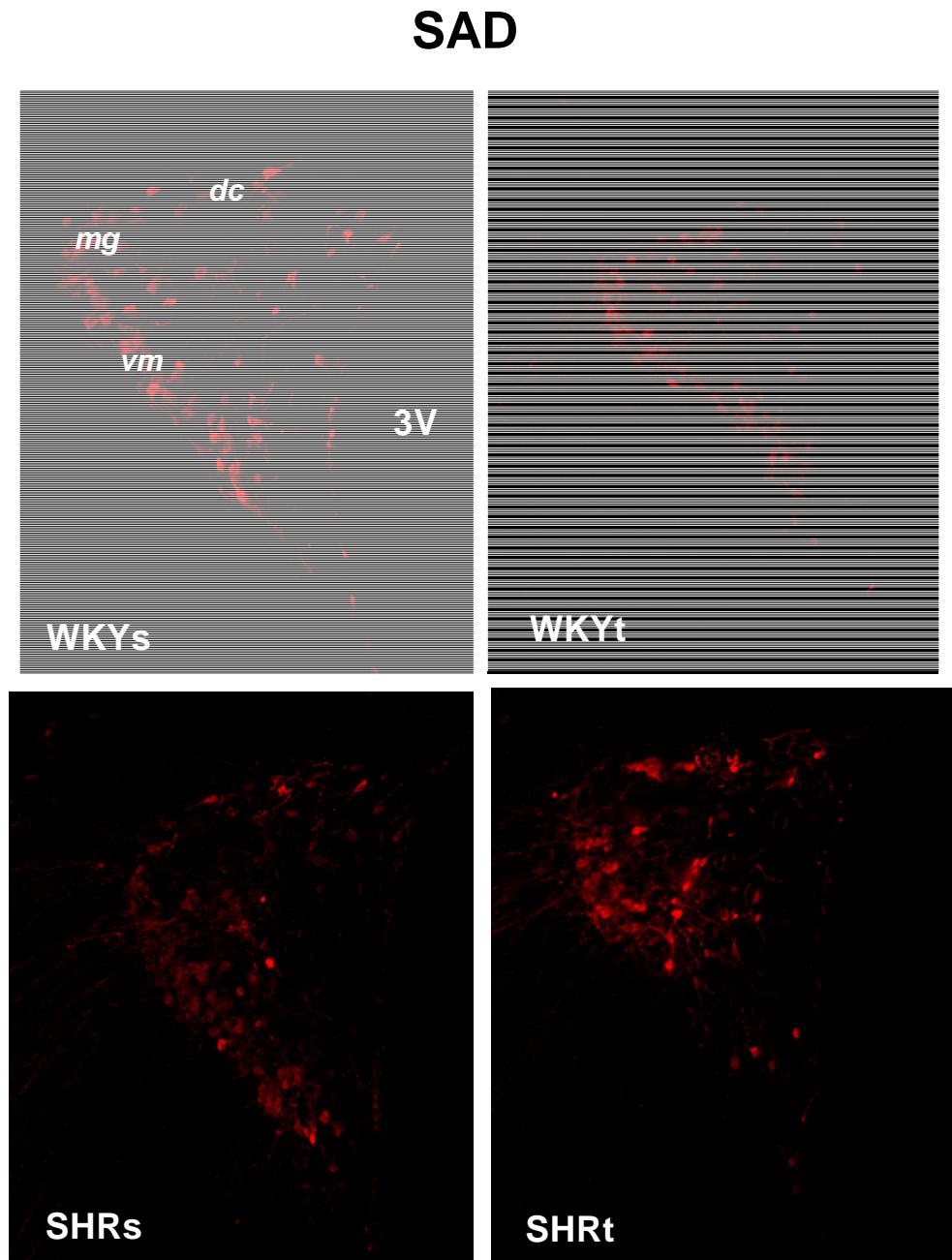
**Figura 16** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN medial de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) intactos (SHAM).



Os núcleos do PVN medial são o dorsal cap (dc), ventromedial (vm) e o magnocelular (mg); 3V indica o 3º ventrículo cerebral.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

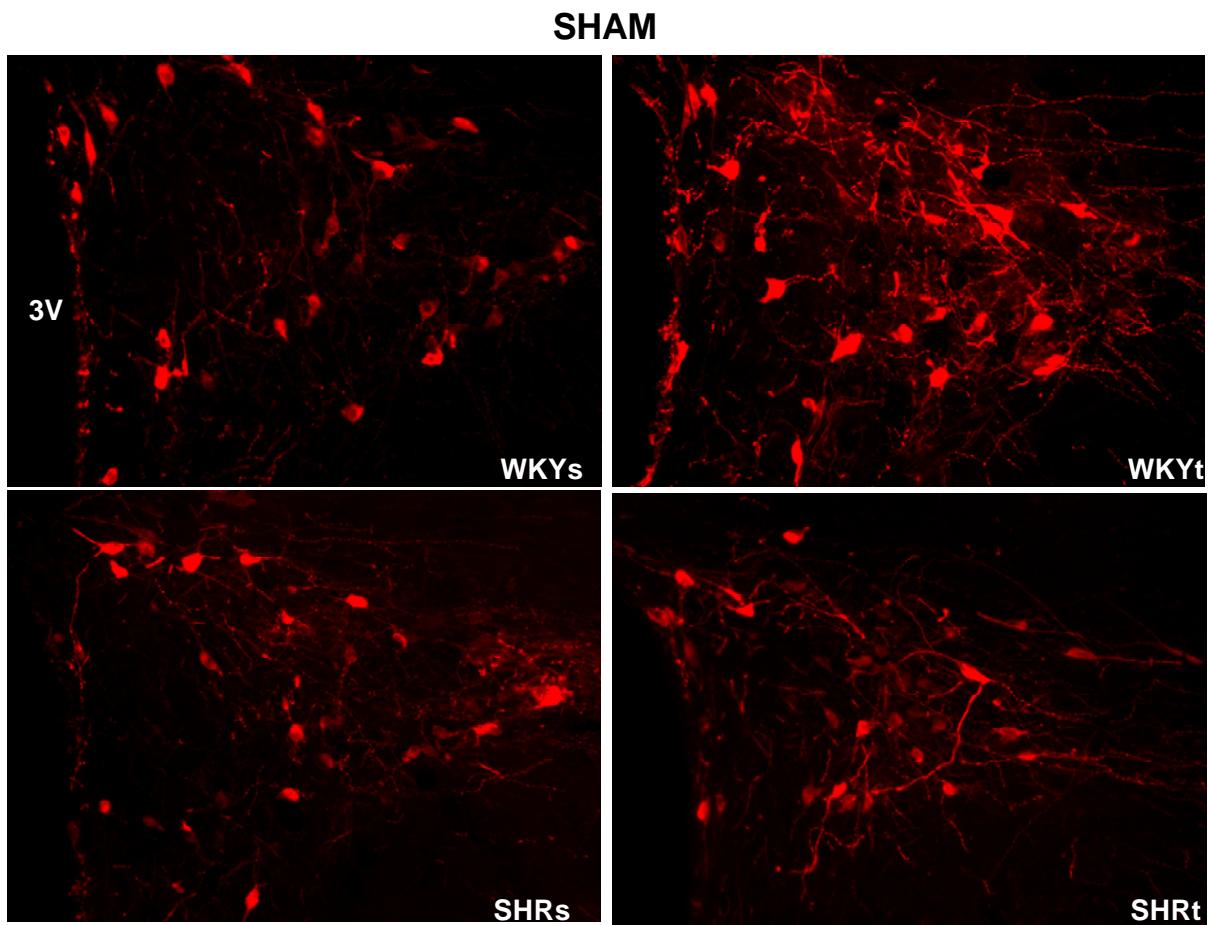
**Figura 17** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN medial de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) desnervados (SAD).



Os núcleos do PVN medial são o dorsal cap (dc), ventromedial (vm) e o magnocelular (mg); 3V indica o 3º ventrículo cerebral.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

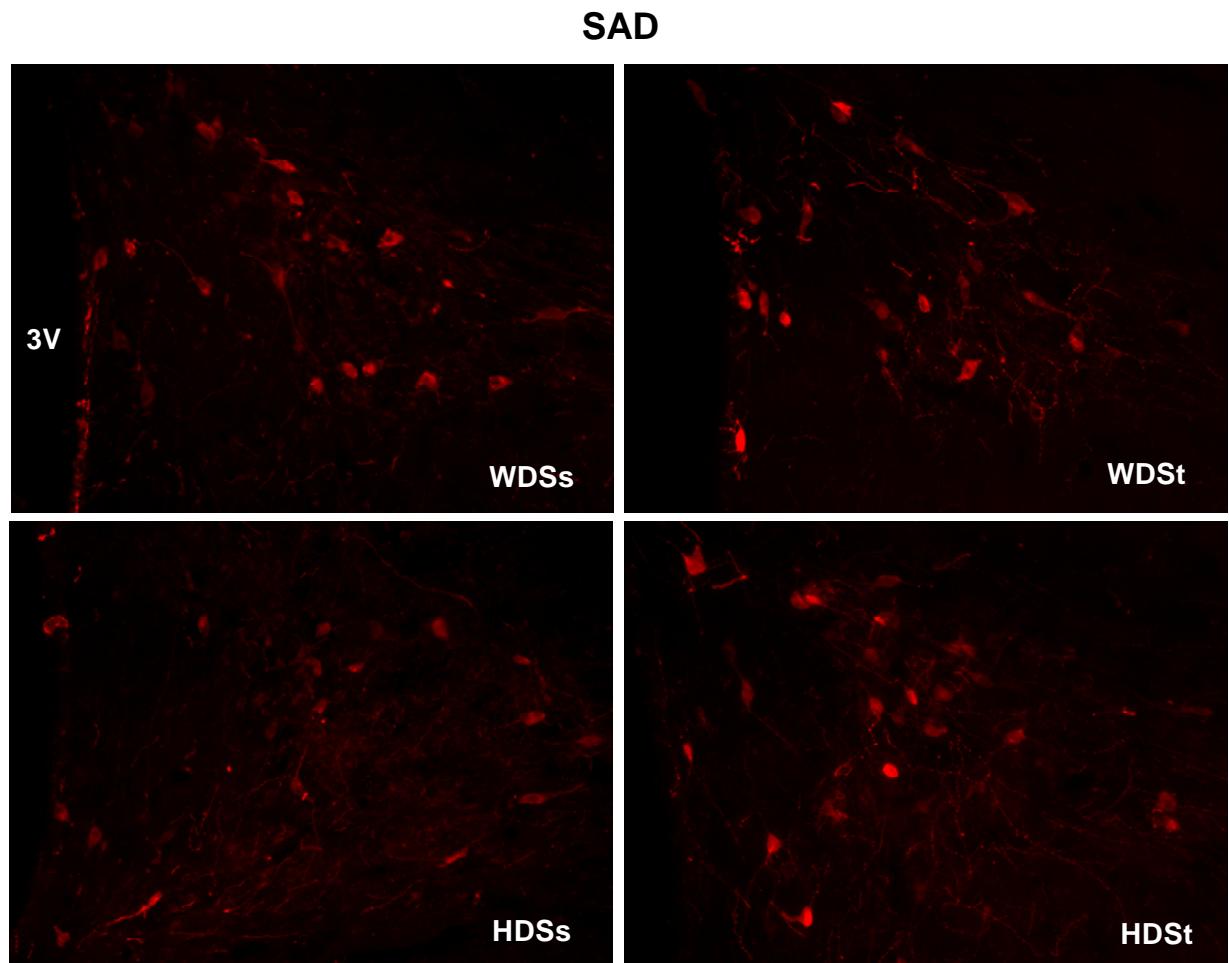
**Figura 18** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN posterior de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) nos grupos intactos (SHAM).



3V indica o 3º ventrículo cerebral.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Figura 19** - Fotomicrografias comparando a imunofluorescência para OT no PVN posterior de WKY (painéis superiores) e SHR (painéis inferiores), sedentários (painéis à esquerda) e treinados (painéis à direita) nos grupos desnervados (SAD).



3V indica o 3º ventrículo cerebral.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

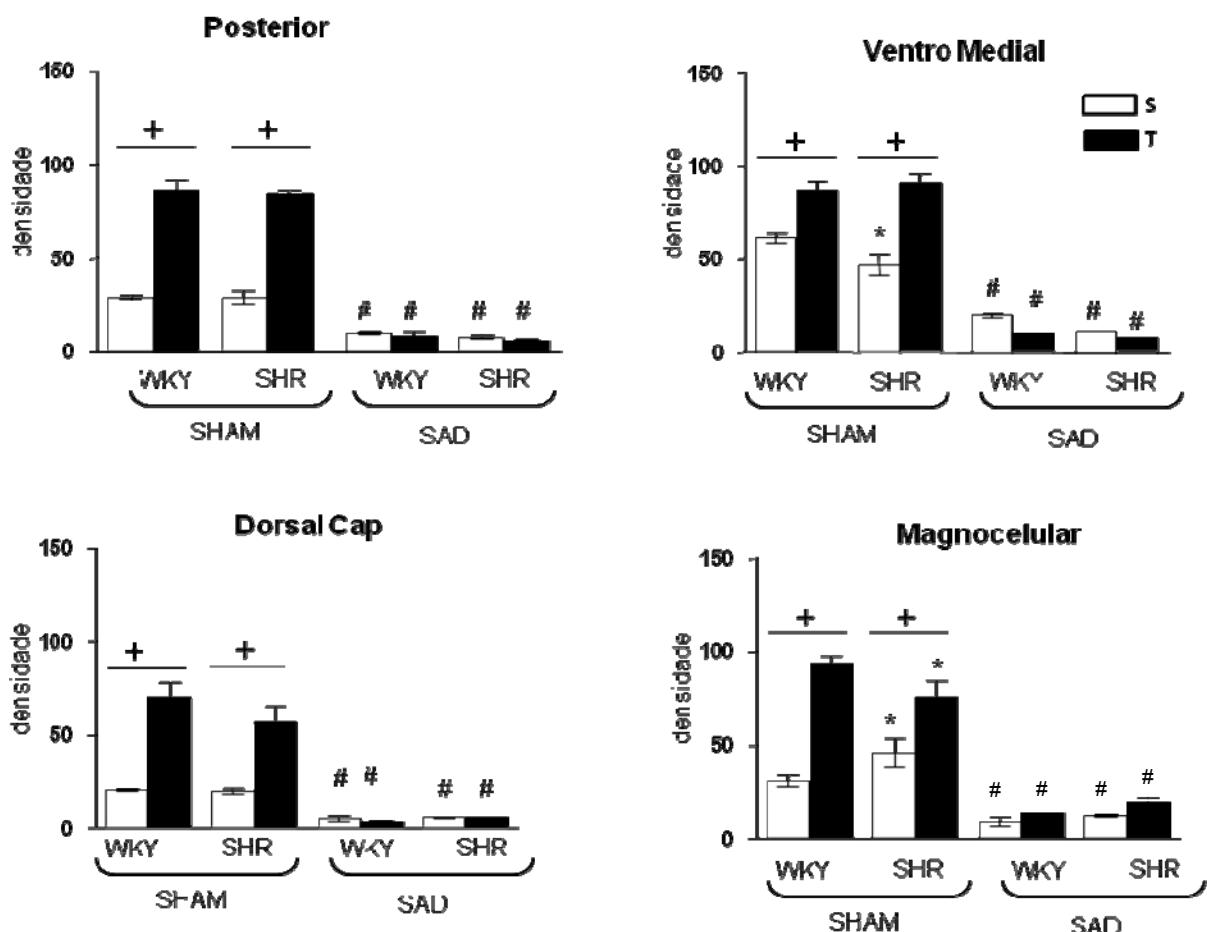
**Tabela 7** - Valores da densidade de OT no PVN posterior e diferentes subnúcleos do PVN medial (ventromedial, dorsal cap e magnocelular) nos oito grupos experimentais.

SHAM	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
PVN Posterior %	29±1	86±6+	29±4	85±1+
PVN Ventromedial %	62±2	87±5+	47±6*	91±5+
PVN Dorsal Cap %	21±1	70±8+	20±2	57±9+
PVN Magnocelular %	31±3	94±3+	46±8*	76±8*+
SAD	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
PVN Posterior %	10±1#	9,±2#	8±1#	6±1#
PVN Ventro Medial %	20±1#	10±1#	11±0,1#	8±1#
PVN Dorsal Cap %	5±2#	4±1#	5±0,1#	5±1#
PVN Magnocelular %	9±2#	13±0,2#	12±1#	20±2#

Valores são médias ± EPM e foram obtidos em 4-6 cortes/rato, 3-4 ratos/grupo.  
Significâncias ( $p<0,05$ ) são \* vs. WKY, + vs. S, # SHAM.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Figura 20** - Comparação dos efeitos da desnervação sinoaórtica e do treinamento aeróbio sobre a densidade de OT em diferentes subnúcleos do PVN: posterior, ventromedial, dorsal cap e magnocelular.



Significâncias ( $p<0,05$ ) \* vs WKY; + vs S; # vs SHAM.  
FONTE: (Cavalleri, 2012).

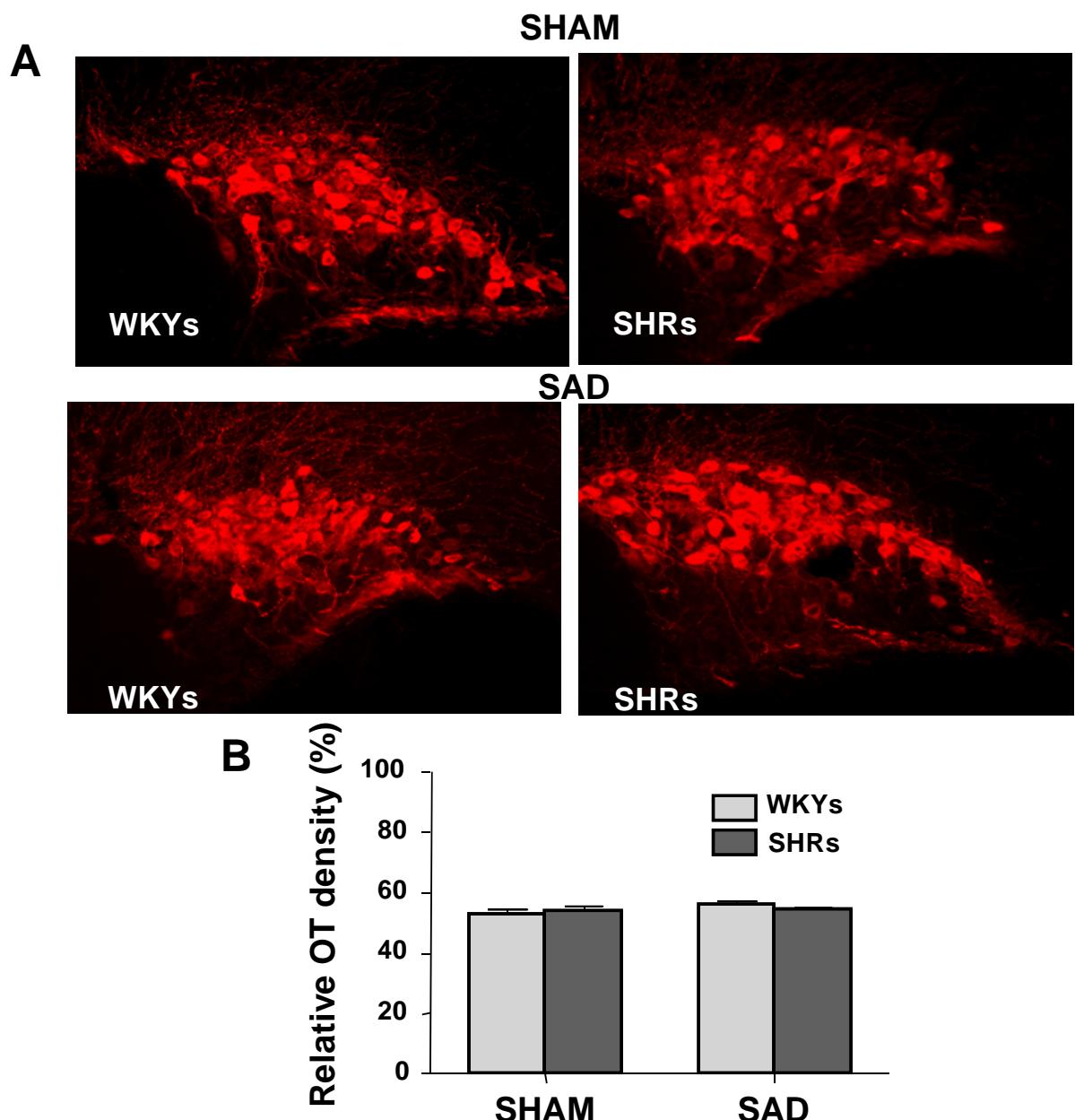
**Tabela 8** - Equações de regressão linear correlacionando alterações na imunorreatividade de OT com alterações na frequencia cardíaca basal induzidas pelo treinamento nos diferentes subnúcleos do PVN de WKY e SHR submetidos a SAD ou SHAM.

	<b>SHAM</b>		<b>SAD</b>	
	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>
<b>PVN post</b>	$Y = -0,82x + 305 *$ ( $r = -0,98$ )	$Y = -0,57x + 258 *$ ( $r = -0,94$ )	$Y = 0,03x - 2$ ( $r = 0,51$ )	$Y = 0,03x - 4$ ( $r = 0,69$ )
<b>PVN vm</b>	$Y = -0,34x + 177 *$ ( $r = -0,88$ )	$Y = -0,48x + 237 *$ ( $r = -0,96$ )	$Y = -0,08x + 44$ ( $r = -0,50$ )	$Y = 0,02x + 2$ ( $r = 0,53$ )
<b>PVN dc</b>	$Y = -0,68x + 251 *$ ( $r = -0,92$ )	$Y = -0,40x + 179 *$ ( $r = -0,92$ )	$Y = 0,02x - 3$ ( $r = 0,37$ )	$Y = -0,01x + 8$ ( $r = -0,56$ )
<b>PVN mg</b>	$Y = -0,88x + 327 *$ ( $r = -0,96$ )	$Y = -0,31x + 171 *$ ( $r = -0,81$ )	$Y = 0,06x - 9$ ( $r = 0,56$ )	$Y = -0,07x + 39$ ( $r = -0,63$ )

PVN post, posterior PVN; PVN vm, subnúcleo ventromedial do PVN medial; PVN dc, subnúcleo dorsal cap do PVN medial; PVN mg, subnúcleo magnocelular do PVN medial. \* Indica correlação significativa ( $P < 0,05$ ).

FONTE: (Cavalleri, 2012).

**Figura 21** - A. Fotomicrografias comparando a densidade de neurônios OTérgicos no SON de WKY e SHR sedentários submetidos à desnervação sinoaórtica (SAD) ou a cirurgia fictícia (SHAM).



No painel inferior (B) comparação da densidade relativa de OT no SON dos grupos WKY e SHR sedentários submetidos à SAD ou SHAM. Valores correspondem a medidas em 4-6 cortes/rato, 3-4 ratos/grupo.

FONTE: (Cavalleri, 2012).

## 5 DISCUSSÃO

Através deste estudo varias observações originais sobre o papel dos barorreceptores em mediar os efeitos do treinamento aeróbio sobre o sistema cardiovascular puderam ser identificadas:

- a) os ajustes cardiovasculares induzidos pelo treinamento são dependentes da atividade dos barorreceptores e envolvem ajustes do sistema OTérgico central;
- b) o treinamento físico não é capaz de reverter os prejuízos cardiovasculares induzidos pela retirada dos barorreceptores;
- c) a desnervação sinoaórtica prejudica drasticamente a expressão/funcionamento do sistema OTérgico central anulando consequentemente os efeitos benéficos do exercício sobre o sistema cardiovascular.

### 5.1 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre o desempenho físico

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam observação anterior de nosso laboratório (Ceroni et al., 2009) de que a SAD reduz agudamente o desempenho dos animais na esteira ergométrica, mas não atrapalha o ganho final de desempenho induzido pelo treinamento aeróbio de baixa intensidade, uma vez que ao final dos protocolos, a velocidade máxima atingida pelos SHR e WKY submetidos ou não à remoção seletiva dos barorreceptores foi equivalente.

Sabe-se que durante o exercício físico as respostas cardiovasculares são comandadas por dois mecanismos neurais (Figura 1): o comando central um mecanismo tipo "feed forward" que determina o padrão de atividade da musculatura esquelética e o controle reflexo da circulação, um mecanismo de "feedback" que ajusta reflexamente as respostas cardiovasculares durante o exercício (Michelini e Morris, 1999; Michelini, 2001; Mitchell, 1990; Rowell, 1992;). Com a SAD os animais perdem a

informação aferente que desencadeia o controle reflexo da PA, resultando em uma grande variabilidade na PA, o que pode contribuir para reduzir o desempenho durante corrida em esteira. No entanto a queda no desempenho foi observada apenas agudamente (2 semanas após as cirurgias) não atrapalhando o desenvolvimento dos protocolos de treinamento; quando houve aumento similar e paralelo no desempenho dos grupos SHR e WKY submetidos a SAD ou cirurgia fictícia. Observou-se após as doze semanas ganho de capacidade física similar entre WKY SHAM e SAD e SHR SHAM e SAD (maior nestes últimos), confirmando dados anteriores do nosso grupo de que a SAD prejudica agudamente o desempenho físico dos rato como indicado pela redução da velocidade atingida 2 semanas após mas não atrapalha o desempenho durante o protocolo de treinamento (Amaral et al., 2000; 2001; Ceroni et al., 2009; Melo et al., 2003). É possível que a preservação do simpático cervical durante a cirurgia SAD tenha contribuído para o ganho de desempenho observado neste grupo. O ganho de capacidade física dos WKY e SHR submetidos à SAD ou cirurgia SHAM pode ser também parcialmente explicado pelo aumento da capilarização da musculatura esquelética observada nestes animais durante o treinamento (Chaar et al., 2010), o que se repercute em melhor oxigenação celular e ganho de capacidade física ao longo do protocolo. Aumento do desempenho subsequente ao treinamento em SHR submetidos à SAD também foi observado por Moraes-Silva et al. (2009).

Nossos dados também confirmaram achados anteriores de nosso e outros laboratórios relativos à eficácia do treinamento físico de baixa intensidade em aumentar igualmente o desempenho de normotensos e hipertensos intactos (Amaral et al. 2000; 2001; Ceroni et al., 2009; Melo et al., 2003; Véras-Silva et al., 1997), mostrando adicionalmente que os grupos submetidos à SAD também apresentam desempenho similar em esteira.

## 5.2 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre os parâmetros hemodinâmicos basais

Demonstramos também que o treinamento aeróbio de baixa intensidade foi eficaz em induzir bradicardia de repouso em normotensos e hipertensos íntegros (submetidos à cirurgia fictícia). A redução da freqüência cardíaca basal é uma característica marcante do treinamento físico e um indicativo de sua eficácia. Trabalhos anteriores da literatura e de nosso próprio laboratório têm sistematicamente mostrado redução da freqüência cardíaca basal em normotensos e hipertensos treinados vs seus controles sedentários (Amaral et al., 2000; 2001; Ceroni et al., 2009; Clausen, 1977; Higa-Taniguchi et al., 2007; 2009; Martins et al., 2005; Melo et al., 2003; Scheuer e Tipton, 1977; Meredith et al., 1990; Veras-Silva et al., 1997), o que foi confirmado pelos dados do presente trabalho. Estudos anteriores já haviam demonstrado um importante papel desempenhado pelas projeções OTérgicas ao tronco cerebral na modulação do controle da FC: a OT age no complexo solitário vagal para facilitar o tônus vagal ao coração e a bradicardia reflexa durante elevações transitórias da PA (Dreifuss et al., 1988; Higa et al., 2002; Russ e Walker, 1994). Trabalhos do nosso laboratório também indicaram que o bloqueio de receptores de OT no NTS reduz a bradicardia reflexa (Higa et al., 2002) e aumenta a resposta taquicárdica ao exercício dinâmico (Braga et al., 2000; Michelini, 2001, 2007a).

Estudos anteriores já haviam também demonstrado outro efeito benéfico do treinamento aeróbio de baixa intensidade, a redução da PA em indivíduos hipertensos e em modelos animais de hipertensão (Amaral et al., 2000, 2001; Ceroni et al., 2009; Higa-Taniguchi et al., 2007, 2009; Martins et al., 2005; Melo et al., 2003). Nossos dados do grupo SHAM, mostrando queda da PA nos SHR<sub>T</sub>, confirmaram estas observações, demonstrando mais uma vez a eficácia do treinamento aeróbio como conduta terapêutica em hipertensos. Em trabalhos anteriores nosso grupo já havia demonstrado que a redução da PA em SHRT era acompanhada de redução significativa da resistência vascular da musculatura esquelética (Amaral et al., 2000) a qual se correlacionava diretamente com a redução da razão parede/luz de arteríolas

musculares esqueléticas (Amaral et al., 2000; Melo et al., 2003). Havia após treinamento completa normalização da estrutura de arteríolas musculares esqueléticas dos SHR (remodelamento eutrófico para fora) a qual contribuía para redução parcial da resistência vascular periférica e consequentemente da PA (Amaral e Michelini, 2011; Ceroni et al., 2009).

Interessante notar que ratos SAD submetidos ao treinamento aeróbio mostram alterações hemodinâmicas opostas: houve após treinamento aumento significativo da FC basal em ambos os grupos (WKY e SHR), bem como aumento da PAM nos SHR. Estes resultados indicam que os efeitos hemodinâmicos benéficos do treinamento são dependentes da integridade dos barorreceptores arteriais. Sabe-se que os barorreceptores arteriais codificam continuamente os níveis de PA e os sinalizam ao NTS, e a outros núcleos bulbares de integração (Michelini, 2008). A informação aferente carreada pelos barorreceptores ascende continuamente a núcleos pré-autonômicos do hipotálamo, que integram estas informações e modulam, via projeções descendentes ao bulbo dorsal e ventral, o tônus autonômico ao coração e vasos. (Dampney et al., 1994; Michelini, 2008; Michelini e Stern, 2009). Desta forma, a ausência de informações aferentes provenientes da periferia prejudica a integração central a níveis bulbar e suprabulbar, prejudicando consequentemente, os ajustes funcionais ao treinamento aeróbio. Trabalho anterior de nosso laboratório já havia mostrado que a desnervação sino-aórtica abole em hipertensos a redução da variabilidade do tônus simpático induzida pelo treinamento aeróbio (Ceroni et al., 2009). Neste trabalho utilizando a análise espectral sobre séries temporais da PA descreveu-se haver nos SHR SHAM redução significativa do componente LF (indicativo da atividade simpática) o qual se correlacionava com a queda da PA subsequente ao treinamento. Interessante foi à observação de que a correlação positiva entre níveis de PA e LF nos SHR foi abolida após desnervação sinoaórtica (Ceroni et al., 2009), indicando que a ausência da sinalização aferente pelos barorreceptores prejudica a redução do tônus simpático pelo treinamento aeróbio. Da mesma forma que observado por Ceroni et al (2009) nos grupos WKY (que não apresentam hipertonia simpática) não houve alteração da PA e do LF após treinamento, reforçando mais uma vez a

potencialidade desta conduta terapêutica em reverter apenas os efeitos deletérios da hipertensão.

No presente estudo pudemos também observar que a desnervação dos barorreceptores promoveu em ambos os grupos um expressivo aumento da labilidade intrínseca da PA, a qual foi parcialmente reduzida após o treinamento em ambos os grupos experimentais mesmo na ausência dos barorreceptores arteriais. Estes dados sugerem que o treinamento possa também ativar outros mecanismos de ajuste central e/ou periférico, os quais atuariam no sentido de minimizar o efeito da ausência dos barorreceptores, corrigindo parcialmente as oscilações de PA. Desconhecemos, no entanto, a identidade deste(s) mecanismo(s).

### **5.3 Influência do treinamento aeróbio e da desnervação sinoaórtica sobre o sistema OTérgico central**

Durante muitos anos acreditou-se que as únicas funções da ocitocina relacionavam-se à contração uterina durante o parto e à ejeção do leite na amamentação (Du Vigneaud et al., 1953). Estudos recentes têm, porém demonstrado seu envolvimento do controle cardiovascular (Michelini, 2001; Braga et al., 2000; Michelini, 2007; Michelini e Stern, 2009; Richard et al., 1991). Frente a esses novos e interessantes achados estudar o papel da ocitocina no controle cardiovascular tornou-se um dos principais focos do nosso grupo de pesquisa.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório já haviam sugerido a importância das projeções OTérgicas do PVN ao NTS/DMV em modular o controle reflexo da freqüência cardíaca, facilitando o tônus vagal ao coração. Observou-se em ratos normotensos aumento da resposta bradicárdica durante elevações transitórias da PA (Higa et al., 2002), a qual era bloqueada pela administração de antagonista de OT no complexo NTS/DMV. Observou-se também na presença de bloqueio dos receptores de OT, aumento da resposta taquicárdica ao exercício agudo (Braga et al., 2000; Michelini, 2001; Michelini, 2007). Interessante foi a observação de que esta resposta ocorria apenas nos indivíduos treinados, sugerindo que o treinamento ativava as projeções

OTérgicas do PVN ao NTS/DMV as quais eram responsáveis pela menor resposta taquicárdica ao exercício dinâmico apresentada por normotensos e hipertensos treinados (Braga et al., 2000; Higa-Tanaguchi et al., 2009; Michelini, 2001, 2007).

Os dados do presente trabalho além de confirmar a importância da sinalização aferente em desencadear os efeitos benéficos do treinamento sobre a bradicardia de repouso em normotensos e hipertensos e sobre a redução da PA em hipertensos trouxeram também observações originais sobre o funcionamento das projeções OTérgicas do PVN ao tronco cerebral.

Demonstramos que:

- a) o treinamento aumentou a expressão de mRNA de OT no PVN, o qual foi acompanhado de intenso aumento da densidade de neurônios OTérgicos em ambos os grupos normotensos e hipertensos;
- b) o aumento da expressão de mRNA de OT e do conteúdo de OT no PVN de indivíduos treinados correlacionou-se com a redução da freqüência cardíaca basal observada nos WKY e SHR em repouso;
- c) a desnervação sinoaórtica bloqueou completamente a expressão de mRNA de OT no PVN, causando, em ambos os grupos, redução marcante da densidade de neurônios pré-autonômicos positivos para OT no PVN;
- d) a remoção dos barorreceptores também bloqueou a instalação da bradicardia de repouso anulando a correlação negativa entre conteúdo de OT no hipotálamo e valores de freqüência cardíaca basal nos WKY e SHR;
- e) este efeito foi específico para os neurônios OTérgicos pré-autonômicos do PVN uma vez que a SAD não interferiu com a imunorreatividade para OT nos neurônios magnocelulares do SON.

Em conjunto, estes achados sugerem que a sinalização aferente carreada pelos barorreceptores e quimiorreceptores é crucial para o funcionamento normal dos neurônios pré-autonômicos OTérgicos do hipotálamo e que os efeitos benéficos do treinamento sobre a instalação da bradicardia de repouso envolvem a ativação destes neurônios e são desencadeadas pela sinalização aferente.

Os dados do presente trabalho vieram, portanto confirmar observações funcionais anteriores do nosso laboratório e nossa hipótese de trabalho. Demonstramos que o treinamento foi eficaz em aumentar, nos grupos SHAM, tanto a expressão gênica como protéica de OT no PVN de WKY e SHR. Importante notar que este aumento correlacionava-se com a bradicardia de repouso confirmado serem as projeções OTérgicas ao NTS/DMV responsáveis em aumentar o tônus vagal para o coração na situação basal e que estas respostas bradicardizantes estavam presentes em normotensos e hipertensos, mas apenas nos grupos treinados como já o haviam sugerido Higa-Tanaguchi et al (2009) ao estudar a modulação da taquicardia do exercício. O PVN do hipotálamo contém vários grupamentos celulares que sintetizam OT e se projetam a neurohipófise (neurônios magnocelulares, agrupados no subnúcleo magnocelular – partes bilateral e medial) ou à núcleos autonômicos (neurônios parvocelulares agrupados nos subnúcleos dorsal cap e ventromedial do PVN medial e no subnúcleo posterior do PVN caudal). Realmente experimentos *in vivo* demonstraram haver liberação de OT no NTS após estimulação elétrica do PVN (Landgraf et al., 1990). Interessante notar que o treinamento aeróbio e a desnervação sinoártica determinaram efeitos mais ou menos similares na imunorreatividade para OT em todos os subnúcleos do PVN. De particular interesse para nossos estudos são os subnúcleos posterior e o ventromedial que se projetam a áreas de integração autonômica bulbares (NTS/DMV, VLM, área postrema e raphe dorsal), além da coluna intermédia lateral da medula, como o faz o dorsal cap (Buijis, 1978; Sawchenko e Swanson, 1982; Sofroniew e Schrell, 1981). Além disto demonstrou-se que a administração de fluorogold no NTs medial é acompanhada de densa marcação no subnúcleo posterior e menor densidade de marcação nos demais subnúcleos (Higa-Taniguchi et al., 2007) indicando ser o PVN posterior a principal fonte de projeções de neurônios pré-autonômicos ao NTS. Observou-se também que muitos destes neurônios eram imunorreativos para OT (Higa-Taniguchi et al., 2007), o que sugere a importância do PVN posterior na determinação das respostas funcionais ao treinamento e à desnervação sinoártica. Trabalhos do nosso grupo já haviam demonstrado que as projeções OTérgicas descendentes do PVN para o NTS possuíam efeito tônico sobre o controle da freqüência cardíaca,

facilitando o tônus parassimpático e a bradicardia reflexa durante a ativação dos barorreceptores (Braga et al., 2000; Higa et al., 2002; Higa-Taniguchi et al., 2009 Michelini, 2001, 2007).

De forma similar ao observado para os dados funcionais a ativação dos neurônios pré-autonômicos OTérgicos do PVN só foi observada nos grupos SHAM treinados (normotensos e hipertensos). Em ambos os grupos WKY e SHR o treinamento não alterou a expressão de receptores no NTS (dados do presente trabalho) embora aumentasse a densidade de projeções OTérgicas a esta área (Higa-Taniguchi et al., 2009; Martins et al., 2005; Michelini e Stern, 2009) facilitando portanto a redução da FC durante exercício. Em adição a estes efeitos, os dados do presente trabalho mostraram que o treinamento aumenta tanto a expressão de RNAm para OT como a imunorreatividade para OT em normotensos e hipertensos. Importante ressaltar que estas alterações se correlacionaram com as reduções na FC basal induzidas pelo treinamento. Uma longa cascata de eventos desencadeou estas respostas desencadeadas pelo aumento da PA durante o exercício repetitivo (treinamento):

- a) aumento da sinalização aferente ao NTS (Brum et al., 2000) aumento do drive NORérgico do NTS a neurônios pré-autonômicos do PVN (Higa-Taniguchi et al., 2007);
- b) remodelamento estrutural de neurônios pré-autonômicos do PVN induzidos pelo treinamento (aumento da ramificação dendrítica e maior área de superfície (Michelini e Stern, 2009);
- c) aumento da expressão de RNAm para OT e aumento substancial de sua densidade protéica em sub-núcleos autonômicos do PVN (dados do presente trabalho nos grupos SHAM);
- d) aumento da excitabilidade intrínseca de neurônios do PVN que se projetam ao NTS (com diminuição da função “input/output” em neurônios magnocelulares que se projetam a neurohipófise (Jackson et al., 2005);
- e) aumento das projeções OTérgicas do PVN ao NTS/DMV em indivíduos treinados (Martins et al., 2005; Michelini, 2007a);

- f) facilitação do tônus vagal ao coração durante estimulação de receptores de OT no NTS/DMV (Higa et al., 2002; Michelini, 2007a);
- g) bradicardia de repouso em WKY e SHR treinados do grupo SHAM a qual se correlacionava com o conteúdo de OT em neurônios pré-autonômicos do PVN (dados do presente trabalho).

O mecanismo celular através do qual a OT age no complexo NTS/DMV não é totalmente conhecido. Terminações OTérgicas encontram-se densamente distribuídas no NTS (Martins et al., 2005; Peters et al., 2008) e axônios imunorreativos para OT encontram-se apostos com neurônios de 2<sup>a</sup> ordem do NTS, sugerindo contatos sinápticos (Peters et al., 2008). Peters et al. (2008) demonstraram através de técnicas de eletrofisiologia que a OT liberada por axônios do PVN, agia em neurônios de 2<sup>a</sup> ordem do NTS aumentando a transmissão visceral aferente e a excitabilidade neuronal via mecanismos pré (aumento da probabilidade liberação de glutamato) e pós-sinápticos (aumento da corrente de entrada por fechamento de canais de K<sup>+</sup>). Portanto a ativação de projeções OTérgicas do PVN NTS causa redução da freqüência cardíaca por 2 diferentes mecanismos: aumento da sinalização aferente e maior excitabilidade dos neurônios de 2<sup>a</sup> ordem do NTS (Peters et al., 2008).

Um achado extremamente interessante deste trabalho foi que após a SAD a expressão gênica e protéica de OT no PVN foi bastante reduzida e o treinamento não foi capaz de reverter esta situação, sugerindo, portanto que as adaptações do sistema OTérgico ao treinamento são dependentes da sinalização aferente pelos barorreceptores. Nossos dados confirmam também o papel do sistema OTérgico central em provocar bradicardia nos animais treinados uma vez que a resposta bradicardizante induzida pelo treinamento desaparecia simultaneamente à depressão do sistema OTérgico no PVN de SAD treinados.

Em relação aos receptores de OT (OTr) nem o treinamento nem a SAD modificaram sua expressão gênica no NTS. Estes resultados são concordantes com dados de Martins et al (2005), que também não observaram mudanças nos níveis de OTr após treinamento. Por outro lado a expressão relativa de mRNA para receptores de OT no RVLM encontrava-se elevada nos SHRs vs WKYs intactos e foi

significativamente reduzida pelo treinamento e desnervação sinoaórtica (Tabela 6). A redução induzida pelo treinamento que poderia estar envolvida com a redução nos níveis pressóricos observada nos SHR treinados. A ativação de receptores de OT no RVLM promove formação de inositol trifosfato com consequente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no espaço intracelular, o que determina aumento na excitabilidade celular e despolarização neuronal aumentando o tônus simpático (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Trabalhos atuais têm demonstrado que o PVN exerce um papel importante na modulação do tônus vasomotor e na determinação da PA, sendo o RVLM uma área-alvo na mediação destes efeitos (Allen, 2002; Badoer, 2001). Demonstrou-se também que projeções OTérgicas do PVN ao RVLM estão envolvidas no controle da ventilação e contribuem com o aumento da PA, uma vez que a microinjeção de OT exógena no RVLM de animais normotensos foi acompanhada de aumento de 35% nos valores de PA (Mack et al., 2002). A redução da expressão de receptores de OT induzida pelo treinamento nos SHR poderia, portanto contribuir para a queda de PA subsequente ao treinamento observada neste grupo experimental.

Deve-se observar que o treinamento também aumentou a densidade de OT no subnúcleo magnocelular do PVN medial que contém neurônios neurosecretóres que se projetam para neurohipófise. Quantificação de OT no plasma e regiões cerebrais de WKY treinados e sedentários (radioimunoensaio), já havia mostrado que o treinamento era acompanhado de aumento de OT no PVN sem alterações no SON e dos níveis plasmáticos (Braga et al., 2000). Não se conhecem os mecanismos responsáveis por estes efeitos. É possível que a redução da excitabilidade intrínseca exibida por neurônios magnocelulares do PVN após treinamento (Jackson et al., 2005) possa contribuir para redução da liberação de OT e aumento no seu conteúdo nos neurônios magnocelulares.

Uma observação original deste trabalho foi que a SAD foi acompanhada por redução marcante na densidade de OT nos subnúcleos autonômicos e neuroendócrinos do PVN, sugerindo uma redução na sua atividade. Deve-se notar entretanto, que a SAD não alterou a intensa imunorreatividade para OT nos neurônios magnocelulares do SON em WKY e SHR sedentários, indicando assim que este núcleo pode fornecer,

frente estimulação específica, níveis plasmáticos elevados de OT. Estudos prévios já haviam demonstrado que a SAD não alterava a expressão de mRNA para OT e VP no SON e não modifica os níveis plasmáticos destes hormônios (Rocha et al., 1993). A SAD também não impede a secreção hormonal neurohipofisária, mas mantém sua habilidade em prover liberação modesta ou intensa de OT e VP frente a estímulos isotônicos ou hipovolêmicos, respectivamente (Morris et al., 1989; Rocha et al., 1993; Schreihofe et al., 1992, 1994). Os efeitos diferenciais da SAD sobre o conteúdo de OT nos neurônios do PVN (redução marcante) e do SON (sem alteração) indicam a especificidade dos barorreceptores (e quimiorreceptores) em modular o controle autonômico e não interferem na regulação do SON cuja função principal é regular o balanço hidroeletrolítico. Além disto, a estrita dependência da integridade de barorreceptores (e quimiorreceptores) na determinação dos níveis de OT no PVN sugere que neurônios OTérgicos no PVN encontram-se associados com a função autonômica. Realmente trabalhos anteriores do nosso laboratório já haviam demonstrado que um grande numero de neurônios OTérgico (especialmente do PVN posterior) projetam-se ao complexo solitário-vagal (Higa-Taniguchi et al., 2007; Jackson et al., 2005) e que o bloqueio de receptores de OT nesta área altera o controle parassimpático do coração (Braga et al., 2000; Higa et al., 2002; Higa-Taniguchi et al., 2009). A depressão do sistema OTérgico no PVN associada ao bloqueio dos efeitos bradicardizantes induzidos pelo treinamento após a SAD reforça nossa proposição de que o treinamento exerce seus efeitos benéficos no sistema cardiovascular por melhorar o controle de vias OTérgicas pré-autonômicas.

Embora nossos dados com a desnervação sinoaórtica não permitiram esclarecer se a ativação de vias pré-autonômicas centrais é dependente da ativação dos barorreceptores e/ou dos quimiorreceptores arteriais, experimentos em andamento em nosso laboratório com a remoção seletiva dos quimiorreceptores arteriais têm mostrado que a informação carreada pelos quimiorreceptores carotídeos não interfere com a expressão basal de neurônios OTérgicos nos subnúcleos autonômicos do PVN, ou seja não há redução gênica e protéica após remoção dos corpúsculos carotídeos (Cruz et al., 2010). No entanto, embora os quimiorreceptores periféricos não sejam tônicos em

manter a patênciados neurônios OTérgicos pré-autonômicos, sua remoção seletiva reduz significativamente o aumento da densidade de neurônios OTérgicos pré-autonômicos induzida pelo treinamento (Cruz et al., 2010). Em conjunto nossos resultados sugerem que os barorreceptores, não os quimiorreceptores, são tônicos para manter a expressão/funcionabilidade dos neurônios Otérgicos do PVN que se projetam e modulam áreas bulbares de integração autonômica, mas que ambos, barorreceptores e quimiorreceptores arteriais, mediam a potencialização do controle OTérgico central e os ajustes benéficos do sistema cardiovascular induzidos pelo treinamento aeróbio.

## 6 CONCLUSÕES

A ausência crônica de informação aferentes carreadas pelos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais revelou o papel crucial desempenhado pela sinalização aferente em desencadear a atividade basal dos neurônios pré-autonômicos OTérgicos do PVN. Nossos dados revelaram ainda que os efeitos benéficos do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre o controle da freqüência cardíaca em normotensos e hipertensos são também desencadeados pela sinalização aferente (barorreceptores e quimiorreceptores) e mediados por neurônios OTérgicos pré-autonômicos do PVN, os quais apresentam alterações plásticas (intenso aumento da densidade relativa) indicativas de maior funcionalidade.

## REFERÊNCIAS\*

- Adair TH, Hang J; Weels ML; Magee FM; Montani JP. Long-term electrical stimulation of rabbit skeletal muscle increases growth of paired arteries and veins. *Am J Physiol.* 1995;38:H717-H724.
- Allen AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension.* 2002;39:275-280.
- Amaral SL, Michelini LC. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:814-826.
- Amaral SL, Silveira NP, Zorn TMT, Michelini LC. Exercise training cause skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2001;19:931-940.
- Amaral SL, Zorn TMT, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000;18:1563-1572.
- Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardio vascular regulation. *Clin Exp Pharmacol.* 2001;28:95-99.
- Badoer E, Merolli J. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage. *Brain Res.* 1998;791:317-320.
- Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC, Aicher SA. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. *J Neurosci.* 2006;26:11893-11902.
- Bezerra SMMS, Santos CM, Moreira ED, Krieger EM, Michelini LC. Chronic at1 receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. *Hypertension.* 2001;38:569-575.
- Bishop VS, Hay M. Involvement of area postrema in the regulation of sympathetic outflow to the cardiovascular system. In: Ganong WF, Martini L. *Frontiers in Neuroendocrinology.* New York: Raven Press Publishers. 1993. vol. 14, p. 57-75.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Braga DC, Mori E, Liga KT, Morris M, Michelini LC. Central oxytocin modulates exercise induced tachycardia. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;6:1474:1482.

Brum PC, Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertens* 2000;36:1018-1022.

Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, Van Liewwen FW. intra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* 1978;186:423-433.

Cavalleri MT. Efeitos do treinamento aeróbio e da remoção dos barorreceptores arteriais sobre a modulação ocitocinérgica do controle cardiovascular em normotensos e hipertensos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol Jun.* 2009;94:630-640.

Chaar LJ, Ceroni A, Michelini LC. Barorreceptores arteriais medeiam ajustes induzidos pela hipertensão e pelo treinamento físico na microcirculação muscular esquelética. Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. 2010; 20 [XIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular; 2010; Araraquara].

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. J. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003;42:1206-52.

Chockalingan A. Word hypertension day and global awareness. *Can J Cardiol.* 2008;24:441-444.

Clausen JP. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiol Rev.* 1977;57:779-815.

Cleroux J, Feidman RD, Petreila RJ. Life style modifications to prevent and control hypertension. 4. Recommendations on physical exercise training. canadian hypertension society, canadian coalition for high blood pressure prevention and control, laboratory centre for disease control at health canada, heart and stroke foundation of canada. *civil4j4;160(9 suppl):s21-8,* 1999.

Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertensio.* 2008;52:514–521.

Cruz JC, Cavalleri MT, Michelini LC. Training (T) Prevents Effects Carotid Body Artery (CBA) Removal in the Synthase of Oxytocin (OT) Cells in the PVN Preautonomic Subnuclei. *Experimental Biology*, 2010.

Dampney RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74:323-364.

Dreifuss JJ, Raggenbass M, Charpak S, Dbois-Dauphin M, Tribollet E. A role of central oxytocin in autonomic functions: its action in the motor nucleus of the vagus nerve. *Brain Res Bull*. 1988. 20:765-770.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem*. 1953;205:949-957

Dufloch DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1997;273: R1271-R1282.

Felix JVC, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension*. 2007;50:780–785.

Ferrario CM, Ueno Y, Diz DI, Bames KL. The renin angiotensin system. In: Zanchetti A, Tarazi C. *Pathophysiology of hypertension: handbook of hypertension*. Amsterdam: Elsevier; 1986. vol.8, p.431-454.

Franca TR, Michelini LC. Alterações da reatividade do trem posterior durante e após exercício dinâmico: efeitos da hipertensão e do treinamento físico. *J Hipertens*. 2001;37:1009.

Franchini KG, Krieger EM, Cestari IA. Restoration of arterial blood oxygen tension increases arterial pressure in sinoaortic-denervated rats. *Am J Physiol*. 1994;266:H1055-H1061.

Gava NS, Veras-silva AS, Negrao CE., Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;26:1129-1133.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001;81:629–683.

Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Mancia G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension*. 1994;23:294-301.

Greene AS, Tonellato P, Zhang Z, Lombard JH, Cowley Jr, AW. Effect of microvascular rarefaction on tissue delivery in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1992;262:H1486-H1453.

Guo GB, Abboud FM. Impaired central mediation of the arterial baroreflex in chronic renal hypertension. *Am J Physiol.* 1984;246:H720-H727.

Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R537-R545.

Higa-Taniguchi KT, Silva FC, Silva HM, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:1717-1727.

Higa-Taniguchi KT, Felix JV, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Exp Physiol.* 2009;94:1103-1113.

Irigoyen MC, Krieger EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:1213-1220.

Jackson K, Silva HM, Zhang W, Michelini LC, Stern JE. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol.* 2005;94:3211-3220.

Kalia MKT, Fuxe K, Goldstein M. Rat medulla oblongata ii. dopaminergic, noradrenergic (a1 and a2) and adrenergic neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol.* 1985;223:308-322.

Kannan H, Yamashita H. Connections of neurons in the region of the nucleus tractus solitarius with the hypothalamic paraventricular nucleus: their possible involvement in neural control of the cardiovascular system in rats. *Brain Res.* 1985;329:205-212.

Kaplan NM. Long-term effectiveness of nonpharmacological treatment of hypertension. *Hypertension.* 1991;18:I153-I160.

Kenney MJ, Seals DR. Postexercise hypotension. *Hypertension.* 1993;22:653-664.

Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. *Circ Res.* 1995;76:544-550.

Krieger EM. Neurogenic hypertension in rat. *Circ Res.* 1964;15:511-521.

Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC. Resetting of the baroreceptors. In: Guyton AC, Hall JE. *Cardiovascular physiology: international review of physiology*. Baltimore: University park press; 1982. vol. 26, p. 119-145.

Landgraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, Pittman QJ. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol*. 1990;258:R155-R159.

Loutzenhiser R, Bidani A, Chilton L. Renal myogenic response kinetic attributes and physiological role. *Circ Res*. 2002; 90:1316-1324.

Ludbrook J. Reflex control of blood pressure during exercise. *Annu Rev Physiol*. 1983;45:155-168.

Mack SO, Kc p, Wu m, Coleman BR, Tolentino-silva FP, Haxhiu MA. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *Journal of Applied Physiology*. 2002;92:826-834.

Mancia G, Grassi G. Antihypertensive treatment: past, present and future. *J Hypertens*. 1998;16:1-7.

Mancia G, Grassi G. European society of hypertension; european society of cardiology, joint national committee vii and european society of hypertension/european society of cardiology guidelines for evaluating and treating hypertension: a two way road. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:74-77.

Martins AS, Crescenzi A, Estern JE, Bordin S, Michelini LC. Hypertension and exercise differentially affect oxytocin an oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension*. 2005;46:1-6.

Melo RM, Martinho E, Michelini LC. Training- induced, pressure-lowering effect in shr. *Hypertension*. 2003;42:851-857.

Meredith IT, Jennings GL, Esler MD, Dewar EM, Bruce AM, Fazio VA. Time course of the antihypertensive and autonomic effects of regular endurance exercise in human subjects. *J Hypertens*. 1990;8:859-866.

Michelini LC. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007a;34:369–376.

Michelini LC. *Fisiologia cardiovascular*. In: Aires MM. *Fisiologia*. São Paulo:Editora Guanabara Koogan; 2008. 3<sup>a</sup> ed., p.375-604.

- Michelini LC. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. *Curr Hypertens*; 2007b;9:214–221.
- Michelini LC. Oxytocin into the NTS: a new modulator of cardiovascular control during exercise. *Annals N Y Acad Sci*. 2001;940:206-220.
- Michelini LC. Regulação neuroendócrina do sistema cardiovascular. In: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M. Neuroendocrinologia básica e aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 162-170.
- Michelini LC. Endogenous vasopressin and the central control of heart rate during dynamic exercise. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:1185-1195.
- Michelini LC. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:1017-1032.
- Michelini LC, Bonagamba LG. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension*. 1990;15:I45-I50.
- Michelini LC, Bonagamba LGH. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*. 1988;11:I75-I79.
- Michelini LC, Franchini KG. Regulação a longo prazo da pressão arterial. In: Aires MM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. 2<sup>a</sup> ed, p. 489-495.
- Michelini LC, Morris M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular response to exercise. *Annals New York Acad Sci*. 1999;897:198-211.
- Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*. 2009;94: 947–960.
- Mikines KJ, Sonne B, Farrell PA, Tronier B, Galbo H. Effect of training on the dose-response relationship for insulin action in men. *J Appl Physiol*. 1989;66:695-703.
- Mitchell JH. Neural control of the circulation during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22:141-154.
- Miura M, Reis DJ. Termination and secondary projections of carotid nerve in the cat brain stem. *Am J Physiol*. 1969;217:142-153.
- Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, De Angelis K, Krieger EM, Irigoyen MC. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37:114-120.

Moreira ED, Ida F, Oliveira VL, Krieger EM. Early depression of the baroreceptor sensitivity during onset of hypertension. *Hypertension*. 1992;19:198-201.

Moreira ED, Oliveira M, Krieger EM. Impaired barorreflex control of heart rate in high-renin renal hypertension. *J Hypertension*. 1988;6:619-625.

Morris M, Alexander N. Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension*. 1989;13:110-114.

Muntner P, Roccella HEJ, Whelton PK. The impact of jnc-vi guidelines on treatments recommendations in the us population. *Hypertension*. 2002;30:897-902.

Negrão CE, Irigoyen MC, Moreira ED, Brum PC, Freire PM, Krieger EM. Effect of exercise training on rsna, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *Am J Physiol*. 1993;265: R365-R370.

Nelson I, Jenning GL, Esler MD, Korner PI. Effect of changing levels of physical activity on blood pressure and hemodynamics in essential hypertension. *Lancet*. 1986;2:474-476.

Nilaver G, Zimmerman EA, Watkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman AJ. Magnocellular hypothalamic projection to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology*. 1980;30:150-158.

Palkovits M. The anatomy of central cardiovascular neurons. In: Fuxe K, Goldstein M, Hökfelt B, Hökfelt T. Central adrenalin neurons. basic aspects and their role in cardiovascular functions. Oxford: Pergamon press; 1980, p. 3-17.

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. American college of sports medicine position stand exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36:533-553.

Peters JH, McDougall SJ, Kellett DO, Jordan D, Llewellyn-smith IJ, Andresen MC. Oxytocin enhances cranial visceral afferent synaptic transmission to the solitary tract nucleus. *J Neurosci*. 2008;28:11731-11740.

Pyner S, Coote JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience*. 2000;100:549-556.

Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.* 1978;153:1-26.

Richard P, Moos F, Freund-mercier MJ. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev.* 1991;71:331-370.

Rocha MJA, Callahan MF, Sundberg DK, Morris M. Sinoaortic denervation alters the molecular and endocrine responses to salt loading. *Neuroendocrinology.* 1993;57:729-737.

Rowell LB, O' Leary DS. Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. *J Appl Physiol.* 1990;69:407-418.

Rowell LB. Reflex control of the circulation during exercise. *Int J Sports Med.* 1992;13:S25-S27.

Russ RD, Walker BR. Oxytocin augments baroreflex bradycardia in conscious rats. *Peptides.* 1994;15:907-912.

Santos CM, Moreira ED, Krieger EM, Michelini LC. Chronic  $\alpha_1$  receptor blockade improves aortic nerve activity in hypertension. *Hypertension.* 1998;31:973-977.

Santos CM, Pontieri V, Leomil NM, Michelini LC. Losartan improves baroreflex control of heart rate of coarcted hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1995;38:H812-H818.

Sawchenko P, Swanson LW. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science.* 1981;214:685-687.

Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that projects to the medulla or to the spinal cord in rat. *J Comp Neurol.* 1982;205:260-272.

Scheuer J, Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol.* 1977;39:221-51.

Schreihof AM, Stricker EM, Sved AF. Chronic nucleus tractus solitarius lesions do not prevent hypovolemia-induced vasopressin secretion in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1994;267:R965-R973.

Schreihof AM, Sved AF. Nucleus tractus solitarius and control of blood pressure in chronic sinoaortic denervated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1992;263:R258-R266.

Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res.* 1998;801:239-243.

Sofroniew MV, 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.* 1981;22:211-217.

Souza CGGT, Michelini LC, Fior-chadi DR. Receptor changes in the nucleus tractus solitarius of the rat following exercise training. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:1471-1476.

Struijker-boudier HJ, Le Noble JLML, Messing MWJ, Huijberts MSP, Le Noble FAC, Essen HV. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens.* 1992;10:S147-S156.

Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *News Physiol Sci.* 1994;9:243-246.

Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology.* 1980;31:410-417.

Trindade AS Jr, Krieger EM. Long-term analysis of the hypertension produced by sinoaortic denervation in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 1984;17:209-217.

Van Der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol.* 1984;224:1-24.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens.* 1996;14:S83-S93.

Véras-silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low- intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997;42:H2627-H2631.

**Anexo A- Artigo publicado relacionado à tese.**

# Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity

Marina T. Cavalleri, Katia Burgi, Josiane C. Cruz, Maria T. Jordão, Alexandre Ceroni and Lisete C. Michelini

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:R958-R966, 2011. First published 27 July 2011;  
doi:10.1152/ajpregu.00104.2011

## You might find this additional info useful...

---

This article cites 43 articles, 22 of which can be accessed free at:

<http://ajpregu.physiology.org/content/301/4/R958.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajpregu.physiology.org/content/301/4/R958.full.html>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpregu>

---

This information is current as of October 28, 2011.

## Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity

Marina T. Cavalleri, Katia Burgi, Josiane C. Cruz, Maria T. Jordão, Alexandre Ceroni, and Lisete C. Michelini

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 25 February 2011; accepted in final form 26 July 2011

**Cavalleri MT, Burgi K, Cruz JC, Jordão MT, Ceroni A, Michelini LC.** Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R958–R966, 2011. First published July 27, 2011; doi:10.1152/ajpregu.00104.2011.—We showed previously that oxytocinergic (OTergic) projections from the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) to the dorsal brain stem mediate training-induced heart rate (HR) adjustments and that beneficial effects of training are blocked by sinoaortic denervation (SAD; *Exp Physiol* 94: 630–640; 1103–1113, 2009). We sought now to determine the combined effect of training and SAD on PVN OTergic neurons in spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats. Rats underwent SAD or sham surgery and were trained (55% of maximal capacity) or kept sedentary for 3 mo. After hemodynamic measurements were taken at rest, rats were deeply anesthetized. Fresh brains were frozen and sliced to isolate the PVN; samples were processed for OT expression (real-time PCR) and fixed brains were processed for OT immunofluorescence. In sham rats, training improved treadmill performance and increased the gain of baroreflex control of HR. Training reduced resting HR (−8%) in both groups, with a fall in blood pressure (−10%) only in SHR rats. These changes were accompanied by marked increases in PVN OT mRNA expression (3.9- and 2.2-fold in WKY and SHR rats, respectively) and peptide density in PVN OTergic neurons (2.6-fold in both groups), with significant correlations between OT content and training-induced resting bradycardia. SAD abolished PVN OT mRNA expression and markedly reduced PVN OT density in WKY and SHR. Training had no effect on HR, PVN OT mRNA, or OT content following SAD. The chronic absence of inputs from baroreceptors and chemoreceptors uncovers the pivotal role of afferent signaling in driving both the plasticity and activity of PVN OTergic neurons, as well as the beneficial effects of training on cardiovascular control.

sinoaortic denervation; exercise training; hypothalamus; paraventricular nucleus; supraoptic nucleus; oxytocin; spontaneous hypertension

ACCUMULATING EXPERIMENTAL evidence from our and other laboratories has shown that aerobic training promotes several beneficial cardiovascular effects in normotensive and hypertensive individuals. Training causes remodeling of the heart with a simultaneous stroke volume increase and heart rate (HR) decrease (5, 34, 40), outward eutrophic remodeling of arterioles, capillary angiogenesis, and venule neoformation in the exercised muscles (1–3, 10, 24). Exercise training is also accompanied by a predominance of relaxation over contractile endothelium-derived factors (15, 44). These adaptive mechanisms by improving blood flow and tissue conductance, by reducing vascular resistance, and restoring normal endothelial

Address for reprint requests and other correspondence: L. C. Michelini, Dept. of Physiology & Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, Univ. of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil (e-mail: michelin@usp.br).

function favor the amelioration of impaired functions in cardiovascular disease.

Training reduces both the activity of the renin-angiotensin system and oxidative stress (13, 22, 38) and effectively induces neuronal plasticity in brain areas involved in autonomic control (29). A series of studies indicated that low-intensity aerobic training in normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats improved afferent signaling by aortic baroreceptors (7) and increased noradrenergic drive from the brain stem to hypothalamic preautonomic neurons (18). Training also caused structural remodeling and increased the intrinsic excitability of oxytocinergic (OTergic) and vasopressinergic (VPergic) neurons within the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus that project to the brain stem (20, 29), thus activating OTergic and VPergic drive to dorsal brain stem areas (23, 26, 29). Oxytocinergic input is involved in the modulation of vagal outflow to the heart, causing resting bradycardia and smaller exercise tachycardia in trained WKY and SHR rats (6, 16, 17, 25). It was also shown that central OTergic pathways are depressed in SHR (23), but a significant, although smaller, oxytocin-induced restraint of exercise tachycardia is still observed in the trained SHR (17). In contrast, activation of VPergic projections to the nucleus tractus solitarius (NTS) blunted pressure-induced activity of aortic afferents (4), contributing to the upward resetting of baroreflex during exercise that facilitated the tachycardic response (12, 27–29).

A recent study by Ceroni et al. (8) showed that the chronic absence of baroreceptor inputs blocked the training-induced reduction in vasomotor sympathetic tonus, the pressure fall in SHR rats, and training-induced resting bradycardia in SHR and WKY rats, suggesting that baroreceptor afferent signaling is an important stimulus that orchestrates training-induced plasticity within central autonomic pathways. The effects of training on HR responses were attributable to activation of OTergic pathways from the hypothalamus to dorsal brain stem (6, 17, 23, 25, 27), and OT has been shown to be involved in the baroreceptor reflex control of HR (11, 16, 37, 39, 43) and heart protection (14, 19, 21). We hypothesized that sinoaortic denervation (SAD) would affect the central OTergic drive that modulates the autonomic control of the heart in normotensive and hypertensive rats. Therefore, the present study investigated the effects of SAD on PVN OTergic neurons in SHR and WKY controls subjected to exercise training or kept sedentary. The combined effect of chronic afferent removal and training on resting HR and brain OT content were analyzed by hemodynamic recordings in conscious rats, followed by measurements of OT mRNA expression and OT immunoreactivity within PVN neurons. To distinguish between the effects of SAD on OTergic autonomic circuitry and the effects on plasma OT

release, we also analyzed OT immunoreactivity within supraoptic neurons (SONs).

## MATERIALS AND METHODS

**Animal surgery and experimental protocols.** All surgical procedures and experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo, in compliance with the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Male WKY and SHR rats, aged 2 mo, were housed in Plexiglas cages in the Animal Facilities of the Department of Physiology and Biophysics under controlled temperature and a 12:12-h light-dark cycle, with free access to tap water and food. After an acclimatization period, active rats were preselected for their ability to walk/run on a treadmill (KT-300, Inbramed, Porto Alegre, Brazil; 5–10 sessions from 0.3 to 0.7 km/h, 0% grade, 10 min/day). The rats were then subjected to a progressive maximal exercise test on the treadmill (beginning at 0.3 km/h and increasing by increments of 0.3 km/h every 3 min until exhaustion). Sinoaortic denervation was performed according to Cerone et al. (8) in half of the animals in both the WKY and SHR groups. Briefly, the rats were anesthetized [80 mg/kg ip ketamine (Fort Dodge, IA) plus 12 mg/kg ip xylazine (Fort Worth, TX)] to expose the neurovascular trunk bilaterally in the neck. The common carotid artery and vagus and sympathetic nerves were dissected to allow the identification and specific sectioning of aortic depressor nerves (traveling together as sympathetic nerves or as a separate branch, with preservation of the sympathetic trunk). The third contingent of aortic afferent fibers was interrupted by resection of the superior laryngeal nerve. The carotid bifurcation was exposed for resection of the sinus and carotid body nerves. The other half of the rats in the WKY and SHR groups was subjected to sham surgery without nerve sectioning. The rats were treated subcutaneously with ketoprofen (1% Biofen, 2 mg/kg sc; Biofarm, Jaboticabal, Brazil) and penicillin (24,000 IU/kg sc; Pentabiotico Veterinario, Fontoura Wyeth, Brazil) and allowed to recover for 1 wk. The rats were then readapted to the treadmill for 1 wk. Before beginning the experimental protocols, the Sham and SAD WKY and SHR groups were subjected to a second maximal exercise test (*week 0*) to identify the effects of surgery on treadmill performance and to determine the intensity of training to assign the rats equal performance to the training and sedentary groups.

Low-intensity aerobic training ( $T = 50\text{--}60\%$  of maximal exercise capacity, performed 5 days/wk, 1 h/day for 3 mo) was similar to that used previously in age-matched SHR and WKY rats (6, 8, 17, 23). The maximal exercise tests were repeated for all groups at weeks 6 and 12 to adjust the training intensity and compare the efficacy of the training and sedentary protocols, respectively. The rats allocated to the sedentary protocols (S) were handled every day and subjected once per week to a short period of mild exercise (5–10 min, 0.4–0.8 km/h, 0% gradient) to keep the sedentary rats in conditions that approximated those experienced by the training groups. At the end of the experimental protocols, the rats were anesthetized intraperitoneally (ketamine plus xylazine) for chronic implantation of arterial and venous catheters in the left femoral artery and vein, as previously reported (8). The rats were treated again with analgesic plus antibiotic and allowed to recover for 1 day.

**Hemodynamic measurements and baroreflex testing.** Arterial pressure (AP) was measured on the next day in conscious freely moving rats. The arterial catheter was connected to the recording system (Gould Statham P23XL transducer connected to a carrier amplifier and 5900 Gould Recorder; Valley View, OH). A variable period of time (15–30 min) was allowed for the stabilization of cardiovascular parameters before beginning the simultaneous measurement of AP and HR [determined from pulse interval; Biotach Gould (Valley View, OH) for 30–40 min (resting values)]. The baroreceptor reflex control of HR [loading/unloading of baroreceptors with phenylephrine

and sodium nitroprusside, intravenously, as described previously (16)] was then tested to determine baroreflex sensitivity and confirm the SAD procedure.

**Tissue sampling.** After the functional measurements, the rats were deeply anesthetized with 60 mg/kg ip pentobarbital sodium, leading to respiratory arrest. The rats assigned to the PCR experiments were immediately subjected to transcardiac perfusion with 0.01 M PBS, pH 7.4 [Dagger pump, Vernon Hills, IL; 20–30 ml/min, ~5 min, with the perfusion pressure maintained in the same range as the mean AP (MAP) recorded in the conscious animal] and decapitated to remove the brain, which was quickly transferred to a dry-ice box. A slice (800–1,000  $\mu\text{m}$ ) was taken at the hypothalamic level and immediately frozen for bilateral PVN punches that contained the medial and caudal parts of the nucleus plus surrounding structures. The samples (~1.5 mg each) were collected in 0.5 ml TRIzol and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . After respiratory arrest and transcardiac perfusion with 0.01 M PBS (~5 min), the rats allocated to immunofluorescence processing received an infusion of 4% paraformaldehyde in 0.01 M PBS (pH 7.2, 400–500 ml, 10 ml/min). The rats were decapitated for brain removal. The brain was postfixed in 4% paraformaldehyde for 4 h at  $4^\circ\text{C}$  and cryoprotected in 0.01 M PBS that contained 30% sucrose at  $4^\circ\text{C}$  for 3–4 days. The brain was blocked and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until processing.

**Real-time PCR studies.** mRNA expression was estimated by real-time PCR in 7–9 samples per group obtained from the SHAM<sub>WKY</sub>, SHAM<sub>WKYt</sub>, SHAM<sub>SHR</sub>, SHAM<sub>SHRt</sub>, SAD<sub>WKY</sub>, SAD<sub>WKYt</sub>, SAD<sub>SHR</sub>, and SAD<sub>SHRt</sub> groups. Total RNA was extracted using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions. Total RNA was dissolved in 10  $\mu\text{l}$  of DEPC water and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . DNase I was used to digest DNA and obtain pure RNA prior to the RT reaction. The integrity of the RNA was verified by agarose gel electrophoresis. Total RNA (2  $\mu\text{g}/\text{reaction}$ ) was used for first-strand cDNA synthesis using SuperScript II, according to the manufacturer's protocol. RNaseOUT was also added to protect the RNA during this process. Three pooled RNA aliquots were routinely sham reverse-transcribed (i.e., reverse transcriptase was omitted) to ensure the absence of DNA contaminants. cDNA was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until processing. The samples were subjected to real-time PCR amplification using Platinum SYBR QPCR Supermix-UDG and specific oligonucleotides for OT (sense primer, TAGACCTGGATATGCAGCAAG; antisense primer, CTCGGAGAAGGCAGACTCAG). The real-time PCR reactions were performed and analyzed using the Corbett Research System (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). The PCR conditions were the following: 99°C for 2 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 60 s, and 72°C for 20 s. The specificity of the SYBR Green assay was confirmed by melting point analysis. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), continually expressed in all cells, was used as the reporter gene. In a pilot experiment, HPRT was not altered by hypertension, exercise training, or SAD. The mRNA expression data were calculated by cycle threshold (Ct) values using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (33), and the results are expressed as fold increases. All reagents and oligonucleotides were purchased from Invitrogen (San Diego, CA).

**Immunohistochemical studies.** Sequential hypothalamic coronal sections [25  $\mu\text{m}$ ,  $-1.80$  to  $-2.12$  caudal to bregma (32)] were cut with a cryostat (Leica CM 1850; Nussloch, Germany) and were collected in tissue culture wells with 0.01 M PBS. Free-floating sections were incubated with 0.01% Triton X-100 and 10% normal horse serum for 1 h. For the immunofluorescence reaction, the sections were incubated overnight with primary antibody (polyclonal guinea pig anti-OT, 1:200,000 dilution; Bachem, Bubendorf, Switzerland), followed by a 2-h incubation with secondary antibody (donkey anti-guinea pig Cy3-labeled, 1:400 dilution; Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA), diluted in PBS containing 0.01% Triton X-100. Four to eight slices were placed in each slide and mounted with a coverslip and Vectashield. Control experiments were performed by omitting the primary or secondary antibody.

**Table 1.** Changes on treadmill performance induced by sedentary and training protocols in WKY and SHR groups submitted to sinoaortic denervation or sham surgery

	Treadmill Performance, km/h			
	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Sham groups during S and T	(n = 15)	(n = 14)	(n = 14)	(n = 15)
Week 0	0.74 ± 0.04	0.76 ± 0.04	1.38 ± 0.06 *	1.38 ± 0.04 *
Week 6	0.71 ± 0.03	1.34 ± 0.05 †#	1.19 ± 0.05 *	1.77 ± 0.06 *†#
Week 12	0.69 ± 0.03	1.39 ± 0.03 †#	1.23 ± 0.05 *	1.97 ± 0.05 *†#
Gain	-0.05 ± 0.03	+0.64 ± 0.04 †	-0.15 ± 0.08	+0.59 ± 0.05 †
SAD groups during S and T	(n = 14)	(n = 13)	(n = 13)	(n = 12)
Week 0	0.65 ± 0.03	0.72 ± 0.04	1.21 ± 0.04 *	1.31 ± 0.07 *
Week 6	0.68 ± 0.03	1.24 ± 0.04 †#	0.89 ± 0.03 **#	1.80 ± 0.06 *†#
Week 12	0.64 ± 0.03	1.34 ± 0.04 †#	0.86 ± 0.03 **#	1.95 ± 0.05 *†#
Gain	-0.01 ± 0.04	+0.62 ± 0.05 †	-0.35 ± 0.05	+0.64 ± 0.06 †

Values, measured during maximal exercise tests on treadmill, are expressed as means ± SE. "S" denotes sedentary, while "T" denotes training. WKY<sub>s</sub> and WKY<sub>t</sub>, Wistar-Kyoto, sedentary and training, respectively. SHRs and SHR<sub>t</sub>, spontaneously hypertensive rats, sedentary and training, respectively. SAD, sinoaortic denervation. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are \* vs. WKY; † vs. S; # vs. week 0.

The histological sections were carefully examined (Leica DMLB, Wetzlar, Germany) to localize the regions of interest (ROIs). An EBQ 100 mc-L system (Leistungselektronik, Jena, Germany) was used to excite the Cy3 fluorochrome at 543 nm. The images from the medial and posterior PVN and SON from all experimental groups were digitized with identical acquisition settings and analyzed. Immunoreactive signals were acquired and quantified as previously described (18). Imaging analysis was performed with Image ProPlus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). An automated tracing procedure that incorporated a threshold paradigm was applied to the OT immunoreactivity observations. Background intensity was calculated from random adjacent areas in the neuropil. The threshold was set to pass intensities 1.5-fold above background immunofluorescence. The ROIs of predetermined sizes were drawn within PVN subnuclei (posterior, post; ventromedial, vm; dorsal cap, dc; magnocellular, mg) and SON, and the density of the OT threshold signal within each ROI (expressed as a percentage of threshold area; i.e., area occupied by threshold signal/total ROI area × 100) was calculated to obtain the mean value for each area per rat. Average density values were then obtained for each experimental condition in each group (18).

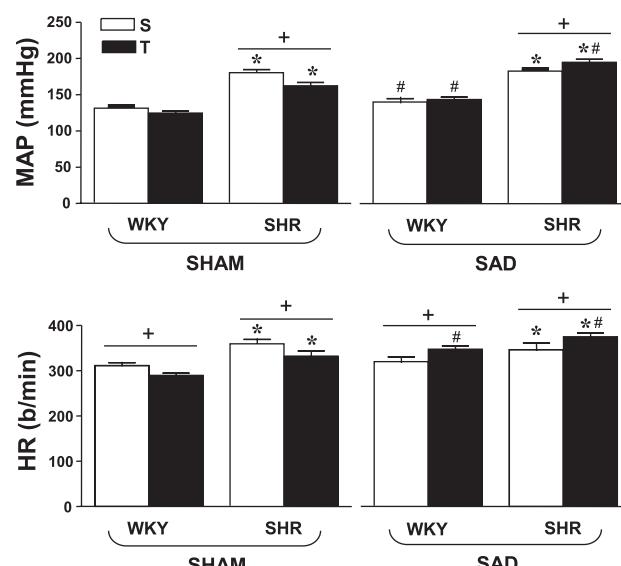
**Statistical analysis.** The results are expressed as means ± SE. Treadmill performance in the Sham and SAD groups for both strains during the sedentary and training protocols was analyzed by three-way ANOVA with repeated measurements (time). The comparisons of the hemodynamic parameter, baroreceptor reflex control of HR, and OT content data between strains (SHR and WKY), conditions (sedentary and trained), and the presence or absence of surgery (sham and SAD) were performed with three-way ANOVA, followed by Fisher's post hoc test. Correlation analyses were performed using Pearson statistics. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

**Treadmill performance: effects of SAD and training.** At the beginning of the experiments, the SHR rats exhibited better performance on the treadmill compared with the WKY group (1.40 ± 0.03 vs. 0.83 ± 0.02 km/h, respectively). Sinoaortic denervation induced a small but significant decrease in treadmill performance in both groups (-0.18 ± 0.04 and -0.21 ± 0.02 km/h for SHR and WKY rats, respectively) with modest, nonsignificant changes in the Sham groups (-0.02 ± 0.03 and -0.06 ± 0.02 km/h for SHR and WKY rats, respectively). SAD, however, did not interfere with the training or sedentary protocols, which began 2 wk later. As shown in Table 1, marked increases in attained velocity were already observed in

all trained groups at week 6, with a further small increase from week 6 to week 12 of training. At the end of the protocols, the trained groups attained similar velocities (SHR, 1.96 ± 0.05 km/h; WKY, 1.37 ± 0.03 km/h), with a similar performance gain in the WKY and SHR groups subjected to sham and SAD surgery (Table 1). The sedentary groups showed no significant changes or a small decrease (SHR rats subjected to SAD; Table 1) in treadmill performance.

**Effects of SAD and training on hemodynamic parameters.** The average basal values of MAP and HR are depicted on Fig. 1. As expected, sedentary SHR rats exhibited higher MAP and HR [180 ± 2 mmHg and 359 ± 6 beats per min (bpm)] than WKY controls. In the Sham groups, training caused significant resting bradycardia (from 311 ± 5 to 289 ± 5 bpm and 359 ± 6 to 332 ± 11 bpm in WKY and SHR rats, respectively;  $P < 0.05$ , corresponding to a 7–8% reduction), accompanied by a pressure decrease only in the SHR group (from 180 ± 2 to 162 ±



**Fig. 1.** Absolute values of mean arterial pressure (MAP; top) and heart rate (HR; bottom) at rest in sedentary (S) and trained (T) Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rat (SHR) groups subjected to sham (left) or SAD (right) surgery. The data are expressed as the mean from 12–15 rats per group. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are \* vs. WKY; + vs. S; # vs. Sham.

**Table 2.** Baroreceptor reflex control of heart rate in sedentary and trained WKY and SHR groups submitted to SAD or sham surgery

	Baroreflex Index, bpm/mmHg			
	WKYs	WKYt	SHRs	SHRt
Sham groups				
Reflex bradycardia	-1.53 ± 0.07	-2.21 ± 0.10†	-1.05 ± 0.08*	-1.43 ± 0.07*†
Reflex tachycardia	-2.28 ± 0.09	-3.26 ± 0.12†	-1.67 ± 0.11*	-2.09 ± 0.10*†
SAD groups				
Reflex bradycardia	-0.23 ± 0.08#	-0.41 ± 0.10#	-0.12 ± 0.11#	-0.20 ± 0.07#
Reflex tachycardia	-0.32 ± 0.14#	-0.53 ± 0.09#	-0.26 ± 0.10#	-0.23 ± 0.09#

Values are expressed as means ± SE and were obtained in 6–9 rats/group. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are \* vs. WKY; † vs. S; # vs. SHAM.

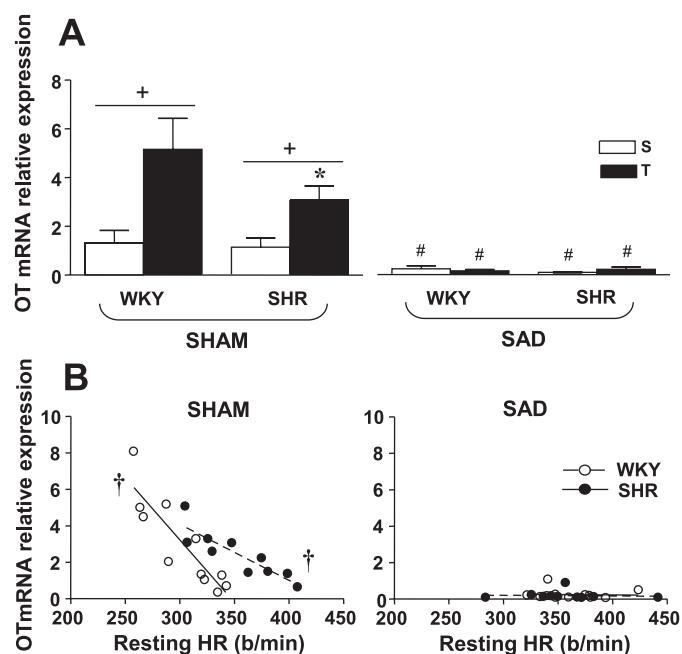
5 mmHg;  $P < 0.05$ , corresponding to a 10% decrease). In contrast, SAD completely abolished these beneficial effects of training, which were replaced by resting tachycardia (from  $320 \pm 6$  to  $343 \pm 7$  bpm in WKY rats and from  $347 \pm 8$  to  $375 \pm 7$  bpm in SHR rats;  $P < 0.05$ ; Fig. 1) and a further pressure increase in the trained SHR rats (from  $183 \pm 2$  to  $195 \pm 4$  mmHg;  $P < 0.05$ ). WKY rats subjected to SAD exhibited higher MAP (140 ± 2 vs.  $131 \pm 2$  mmHg in Sham controls;  $P < 0.05$ ). No training-induced pressure change was observed in SAD and Sham normotensive controls.

Training also improved the baroreceptor reflex control of HR in the Sham groups, reflected by the calculation of the reflex bradycardia and reflex tachycardia indices (Table 2). Bradycardic and tachycardic responses to loading and unloading of baroreceptors were absent after SAD, confirming the efficacy of sinoaortic afferent removal (Table 2).

**Effects of SAD and training on PVN OTergic neurons.** Oxytocin mRNA content in the PVN was greatly affected by SAD and training ( $F_{1,41} = 34.96$ ,  $P < 0.001$  and  $F_{1,41} = 11.77$ ,  $P = 0.001$ , respectively) with a significant interaction between both ( $F_{1,41} = 11.41$ ,  $P = 0.002$ ). No effect of strain was observed ( $F_{1,41} = 1.98$ ,  $P = 0.167$ ). In the Sham groups, training was accompanied by a marked increase in OT expression [from  $1.32 \pm 0.51$  to  $5.16 \pm 1.26$  arbitrary units (AU) and from  $1.42 \pm 0.32$  to  $3.05 \pm 0.61$  AU in trained WKY and SHR rats, respectively, corresponding to 3.9- and 2.2-fold increases;  $P < 0.001$  and  $P = 0.042$ , respectively; Fig. 2A]. Oxytocin mRNA content in the PVN was significantly correlated with resting HR in intact WKY and SHR rats. Negative relationships showed that the training-induced increase in OT mRNA content was accompanied by a training-induced decrease in HR (Fig. 2B). Surprisingly, SAD blocked OT mRNA expression within the PVN and abolished its correlation with HR values (Fig. 2, A and B). After SAD, training did not change OT mRNA expression.

To confirm the effects of training and SAD on central OTergic control, we analyzed OT immunofluorescence within the PVN. Fig. 3 shows dense OTergic innervations in the posterior PVN in Sham rats. Training was accompanied by an increased density of OTergic neurons in both the WKY and SHR groups. In contrast, OTergic neuron density was markedly depressed after SAD and not affected by training (Fig. 4). Similar to the mRNA data, the density of OTergic neurons within the PVN was not altered by hypertension ( $F_{1,16} = 0.617$ ,  $P = 0.054$  for the strain factor) but was significantly increased by training and markedly decreased by SAD ( $F_{1,16} = 68.89$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{1,16} = 230.97$ ,  $P < 0.001$  for condition and surgery factors, respectively), with interaction between factors

( $F_{1,16} = 69.76$ ,  $P < 0.001$ ). The quantitative data from specific PVN subnuclei (Fig. 5) showed that the OTergic neurons were largely concentrated within the ventromedial subnucleus in WKY rats ( $62 \pm 3\%$  vs. 20–30% in the other subnuclei;  $P < 0.05$ ). Hypertension reduced OT density within this area ( $47 \pm 6\%$ ), increased OT density in the magnocellular subnucleus (from  $31 \pm 3\%$  to  $46 \pm 8\%$ ), and did not change OT density in the posterior and dorsal cap subnuclei ( $29 \pm 1\%$  and  $21 \pm 2\%$ , respectively). The data from the Sham groups in Fig. 5 also confirmed a robust training-induced increase in OT density in posterior nuclei (+2.9-fold for both WKY and SHR), dorsal cap nuclei (+3.3- and +2.9-fold for WKY and SHR, respectively), ventromedial nuclei (+1.4- and 1.9-fold for WKY and SHR, respectively), and magnocellular nuclei (+3.0- and +1.7-fold for WKY and SHR, respectively). Sinoaortic denervation decreased OT density in all PVN subnuclei



**Fig. 2.** A: relative expression of oxytocin (OT) mRNA within the paraventricular nucleus (PVN) in sedentary (S) and trained (T) WKY and SHR groups subjected to Sham (left) or SAD (right) surgery. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are \* vs. WKY; + vs. S; # vs. Sham. B: correlation between PVN OT mRNA expression and resting heart rate (HR) in sedentary/trained WKY and SHR rats in the Sham (left) and SAD (right) groups. The regression equations were the following:  $Y_{WKY, SHAM} = -0.07x + 24$ ,  $r = -0.89$ ,  $P < 0.05$ ;  $Y_{SHR, SHAM} = -0.03x + 13$ ,  $r = -0.88$ ,  $P < 0.05$ ;  $Y_{WKY, SAD} = -0.003x + 0.37$ ,  $r = -0.04$ ,  $P > 0.05$ ;  $Y_{SHR, SAD} = -0.003x + 0.31$ ,  $r = -0.06$ ,  $P > 0.05$ . †Significant correlation ( $P < 0.05$ ).

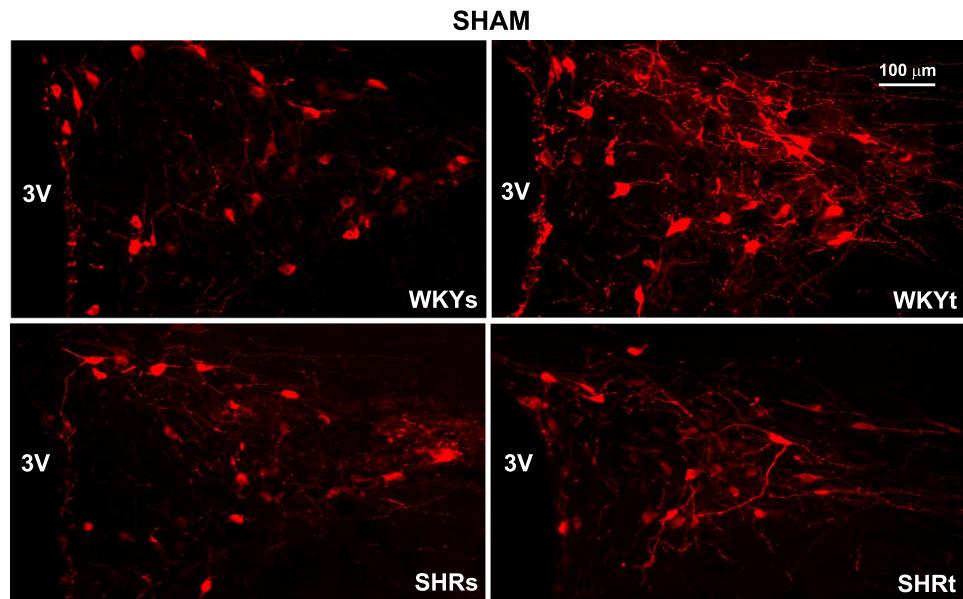


Fig. 3. Photomicrographs comparing OTergic staining within the posterior PVN in sedentary and trained WKY and SHR rats subjected to sham surgery. 3V, 3rd ventricle.

in WKY and SHR rats (average reduction of 66% to 77%;  $P < 0.05$  for SAD vs. Sham in all comparisons; Fig. 5). As shown in Table 3, in the posterior, ventromedial, dorsal cap, and magnocellular subnuclei, significant negative correlations were found between local OT density and resting HR in Sham sedentary/trained WKY and SHR rats. In contrast, no significant correlations were observed after SAD (see values in Table 3).

Notably, SAD had no effect on the density of OTergic neurons in the SON (Fig. 6). Within this nucleus, the relative OT density was similar for sedentary Sham WKY and SHR rats ( $53 \pm 2\%$  and  $54 \pm 2\%$ , respectively) and unchanged by SAD ( $56 \pm 1\%$  and  $54 \pm 1\%$ , respectively).

## DISCUSSION

The present study confirmed the importance of afferent signaling for driving the beneficial effects of exercise training

on resting bradycardia and pressure fall (8). Additionally, the present study revealed several new observations: 1) training caused a marked increase in OT mRNA expression in the PVN in the hypothalamus, accompanied by augmented PVN OT density in the normotensive and hypertensive groups, 2) increased OT mRNA expression and increased OT content in trained individuals were significantly correlated with reduced HR recorded in conscious rats at rest, 3) SAD blocked PVN OT mRNA expression, causing a marked decrease in the density of OT-positive neurons within the PVN in both groups, 4) removal of afferent signaling impaired training-induced resting bradycardia, blocking the negative correlation between hypothalamic OT content and HR values in both normotensive and hypertensive rats, and 5) this effect was specific for PVN OTergic neurons because SAD did not interfere with the OT immunoreactivity observed in SON neurons. Altogether, these findings strongly suggest that afferent signaling conveyed by

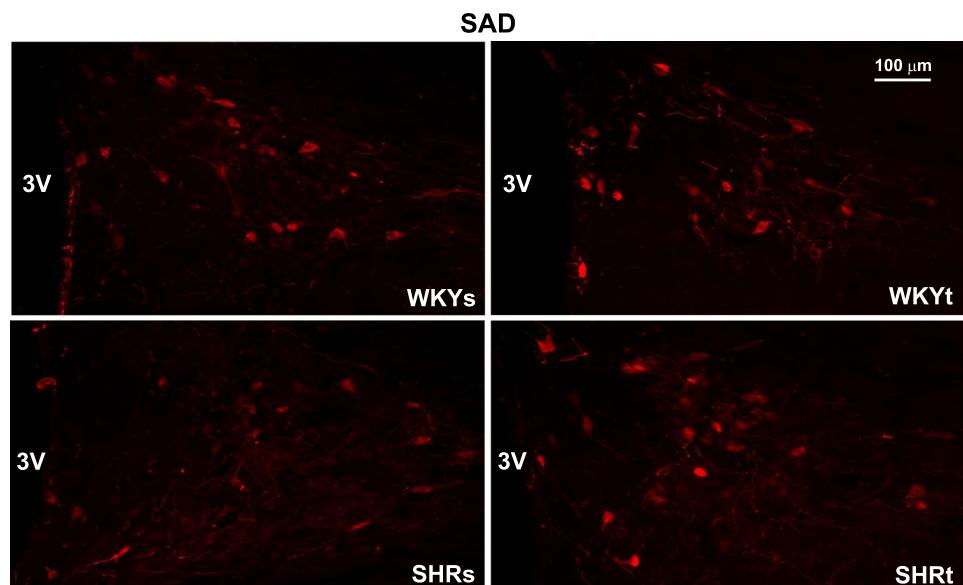


Fig. 4. Photomicrographs comparing OTergic staining in the posterior PVN in sedentary and trained WKY and SHR rats subjected to SAD surgery. 3V, 3rd ventricle.

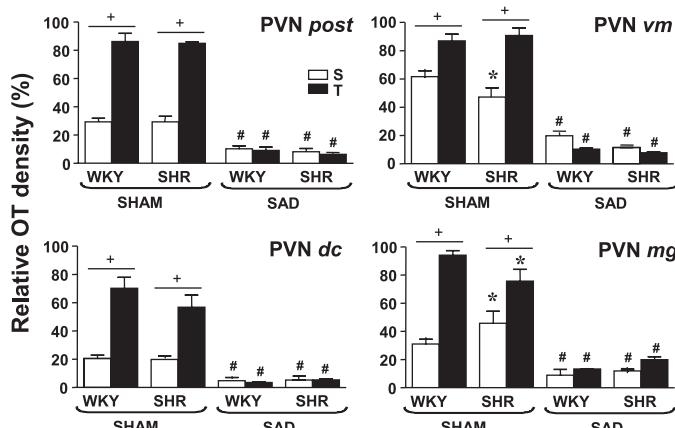


Fig. 5. Relative OT density within different PVN subnuclei in sedentary (S) and trained (T) WKY and SHR groups subjected to sham or SAD surgery. Measurements were made in the posterior PVN (*post*) and dorsal cap (*dc*), ventromedial (*vm*), and magnocellular (*mg*) subnuclei of the medial PVN. The values represent measurements made in 4–6 slices per rat, with 3–4 rats per group. Significance differences ( $P < 0.05$ ) are \* vs. WKY; + vs. S; # vs. Sham.

baroreceptors and chemoreceptors is crucial for driving the PVN OTergic neurons involved in HR control.

Accumulating experimental evidence in humans and animal models has demonstrated the efficacy of low-intensity aerobic training in reducing blood pressure in hypertension by decreasing HR and sympathetic activity and increasing vagal outflow to the heart in normotensive and hypertensive individuals (8, 9, 17, 27, 29, 34). Accordingly, hemodynamic recordings in the Sham groups in the present study confirmed both a decrease in pressure in trained SHR rats and training-induced resting bradycardia in both WKY and SHR rats. Previous data from our and other laboratories indicated an important role of OT within the dorsal brain stem and the involvement of PVN OTergic projections in the modulation of HR control. Oxytocin acted in the NTS/dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) complex to facilitate vagal outflow and reflex bradycardia during baroreceptor loading in normotensive rats (11, 16, 39). Oxytocin receptor blockade in the NTS reduced reflex bradycardia (16) and increased the tachycardic response to an acute bout of exercise (6, 25, 27).

Interestingly, exercise-induced activation of OTergic projections from the PVN to the NTS/DMV complex was only observed in trained rats (6, 25, 27). These observations were

then extended to hypertensive individuals (17, 23). In both WKY and SHR rats, training did not change the expression of OT receptors within the NTS but augmented the density of OTergic projections to this area (17, 23, 27, 29), thus facilitating the slowing of HR during exercise. In addition to the effects of training on PVN OTergic neurons that project to the dorsal brain stem, the present data showed that training increased both PVN OT mRNA expression and OT density in the WKY and SHR groups. These changes significantly correlated with training-induced reductions in resting HR. A long cascade of events elicits these effects, triggered by an increase in pressure during repetitive exercise: 1) increased afferent signaling to the NTS (7), 2) increased noradrenergic drive from NTS to PVN preautonomic neurons (18), 3) structural remodeling of trained PVN preautonomic neurons that exhibit stronger dendritic branching and a larger surface area compared with sedentary controls (29), 4) increased OT mRNA expression in the PVN and substantial augmentation of peptide density within parvocellular PVN OTergic neurons (present data in trained intact controls), 5) increased intrinsic excitability, specifically in PVN-NTS-projecting neurons, with diminished input-output function in PVN magnocellular neurons that project to the neurohypophysis (20), 6) augmented OTergic projections from the PVN to the NTS/DMV complex in trained individuals (23, 26), 7) facilitated vagal outflow to the heart during OTergic stimulation (16, 27), and 8) resting bradycardia in both trained WKY and SHR rats, which correlated with peptide content within OTergic preautonomic neurons (present study).

The cellular mechanisms through which OT acts in the NTS/DMV complex are presently poorly understood. Oxytocinergic terminals are evenly distributed throughout the NTS (23, 35), and OT-immunoreactive axons are closely apposed, suggesting synaptic contacts, with second-order NTS neurons (35). Peters et al. (35) showed that OT released from OTergic axons acts on a subset of second-order NTS neurons to enhance afferent visceral transmission via presynaptic (i.e., increased probability for glutamate release) and postsynaptic (increased inward current by closure of  $K^+$  channels) mechanisms. Therefore, activation of PVN-NTS OTergic projections causes a slowing of HR via at least two different mechanisms: modulation of afferent signaling and a direct effect of depolarizing and exciting NTS neurons.

Notably, training also increased OT density within the magnocellular PVN subnucleus that contains neurosecretory neu-

Table 3. Regression equations correlating OT immunoreactivity changes with heart rate changes induced by training in different PVN subnuclei of WKY and SHR submitted to SAD or sham surgery

	Sham		SAD	
	WKY	SHR	WKY	SHR
PVN post	$Y = -0.82x + 305^*$ ( $r = -0.98$ )	$Y = -0.57x + 258^*$ ( $r = -0.94$ )	$Y = 0.03x - 2$ ( $r = 0.51$ )	$Y = 0.03x - 4$ ( $r = 0.69$ )
PVN vm	$Y = -0.34x + 177^*$ ( $r = -0.88$ )	$Y = -0.48x + 237^*$ ( $r = -0.96$ )	$Y = -0.08x + 44$ ( $r = -0.50$ )	$Y = 0.02x + 2$ ( $r = 0.53$ )
PVN dc	$Y = -0.68x + 251^*$ ( $r = -0.92$ )	$Y = -0.40x + 179^*$ ( $r = -0.92$ )	$Y = 0.02x - 3$ ( $r = 0.37$ )	$Y = -0.01x + 8$ ( $r = -0.56$ )
PVN mg	$Y = -0.88x + 327^*$ ( $r = -0.96$ )	$Y = -0.31x + 171^*$ ( $r = -0.81$ )	$Y = 0.06x - 9$ ( $r = 0.56$ )	$Y = -0.07x + 39$ ( $r = -0.63$ )

PVN *post*, posterior PVN; PVN *vm*, ventromedial subnucleus of medial PVN; PVN *dc*, dorsal cap subnucleus of medial PVN; PVN *mg*, magnocellular subnucleus of medial PVN. \*Significant correlation ( $P < 0.05$ ).

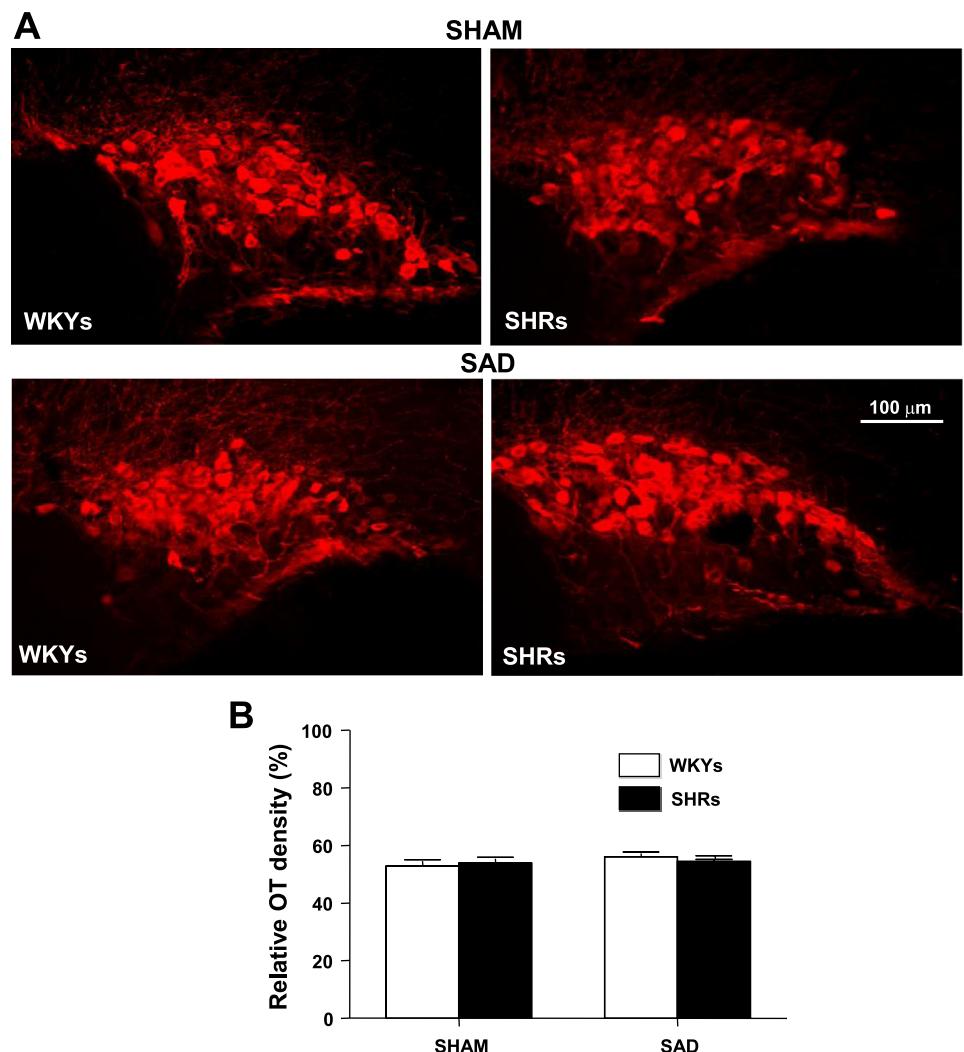


Fig. 6. A: photomicrographs comparing OTergic staining in the supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus in sedentary WKY and SHR rats subjected to sham or SAD surgery. B: relative OT density within the SON in sedentary WKY and SHR groups subjected to sham or SAD surgery. The values represent measurements made in 4–6 slices per rat, with 3 or 4 rats per group.

rons that project to the posterior pituitary. Radioimmunoassay measurements of OT in plasma and discrete brain areas obtained from trained and sedentary WKY rats revealed that training was accompanied by an increase in PVN OT content, but no change was observed in either SON or plasma levels (6). The determinants of these effects are currently unknown. The reduced intrinsic excitability exhibited by PVN magnocellular neurons after training (20) could contribute to reduced release and increased OT content within magnocellular neurons.

In the present study, the data obtained from the WKY and SHR groups subjected to SAD (lack of training-induced decrease in pressure and HR) confirmed the importance of baroreceptor signaling for driving the beneficial effects of training on cardiovascular control (8, 30). An original observation that arose from this study was that SAD was accompanied by an absence of OT mRNA expression in the PVN and a marked reduction in OT density within autonomic and neuroendocrine PVN subnuclei, suggesting reduced activity. Importantly, SAD did not change the robust OT immunoreactivity within magnocellular SON neurons in sedentary WKY and SHR rats, indicating that this nucleus could provide elevated plasma OT levels upon specific stimulation. Indeed, a previous study demonstrated that SAD did not change OT and VP mRNA

expression within the SON and did not change the plasma levels of these hormones in rats maintained under tap water drinking (36), a condition similar to that of the present study. Sinoaortic denervation also did not prevent neurohypophyseal secretion but maintained its ability to cause modest or strong OT and VP release after isotonic or osmotic and hypovolemic stimuli, respectively (31, 36, 41, 42). The differential effects of SAD on OT content within PVN neurons (i.e., a marked reduction) and SON neurons (i.e., no change) indicated the specificity of baroreceptors and chemoreceptors in driving the PVN OTergic neurons that modulate autonomic control and not the regulation of fluid balance by the SON OTergic pathway. Furthermore, the strict dependence of PVN OT levels on the integrity of baroreceptor and chemoreceptor inputs strongly suggests that their targets in the PVN are associated with autonomic functions. In this regard, we showed previously that a large number of PVN OTergic neurons projects to the solitary-vagal complex (18, 20) and that OT receptor blockade within the solitary-vagal complex does alter the parasympathetic control of the heart (6, 16, 17). The depression of the PVN OTergic system associated with complete blockade of training-induced effects on HR after SAD supports our hypothesis that training exerts its beneficial effects on the

cardiovascular system by facilitating hypothalamic OTergic modulation. Our data also indicate the pivotal role of baroreceptors and chemoreceptors in driving central autonomic pathways. The relative participation of baroreceptors and chemoreceptors in driving OTergic control of HR must be evaluated in future experiments with selective carotid body removal.

Similar effects of training on PVN OT content and resting bradycardia in intact WKY and SHR rats indicate the ability of training to improve the activity of the hypothalamic preautonomic neurons that control vagal outflow in both normotensive and hypertensive individuals. In a previous study, we found similar training-induced resting bradycardia in the WKY and SHR groups but larger exercise-induced tachycardia during an acute bout of exercise in WKY rats after OT receptor blockade within the NTS (17). Oxytocin receptor density in the NTS was significantly reduced by hypertension and not affected by training (17, 23). Therefore, the smaller training-induced reduction in HR exhibited by hypertensive rats during stimulated conditions was mainly attributable to reduced OT receptor density in the target area because training-induced plasticity in PVN OTergic preautonomic neurons was nearly similar in WKY and SHR rats.

In summary, the chronic absence of baroreceptor and chemoreceptor inputs reveals the pivotal role of afferent signaling in driving the plasticity and functionality of OTergic preautonomic neurons. The beneficial effects of training on HR control in normotensive and hypertensive individuals are also triggered by afferent signaling and mediated by PVN OTergic preautonomic neurons that undergo marked augmentation in their relative density.

### Perspectives and Significance

The association between hemodynamic recordings and techniques that quantify the expression and content of brain peptidergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons offers a new approach to simultaneously study the plasticity and functionality of central pathways that integrate vegetative, neuroendocrine, and behavioral function. This approach, associated with exercise training, enabled us to uncover the important role of afferent signaling (conveyed by arterial receptors) in facilitating the OTergic control of the heart, thus determining resting bradycardia in normotensive and hypertensive individuals. The addition of SAD to these techniques allowed us to uncover the decisive role of arterial baroreceptors and chemoreceptors in driving autonomic and neuroendocrine responses. This is the first demonstration that afferent signaling is crucial for maintaining the normal activity of preautonomic PVN OTergic neurons. Procedures such as these may become more frequent in studies designed to understand integrative brain mechanisms.

### GRANTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Research Grants 09/54299-1, 08/53961-0, and 07/53320-1 (fellowship to K. Burgi) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) Grant 142658/2007-3 (fellowship to M. T. Cavalleri). L. C. Michelini is a research fellow from CNPq.

### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

### REFERENCES

- Amaral SL, Sanchez LS, Chang AJBA, Rossoni LV, Michelini LC. Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res* 41: 424–431, 2008.
- Amaral SL, Silveira NP, Zorn TMT, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 931–940, 2001.
- Amaral SL, Zorn TMT, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18: 1563–1572, 2000.
- Bailey TW, Jin YH, Doyle MW, Smith SM, Andresen MC. Vasopressin inhibits glutamate release via two distinct modes in the brainstem. *J Neurosci* 26: 6131–6142, 2006.
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. A molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Therap* 128: 191–227, 2010.
- Braga DC, Mori E, Higa KT, Morris M, Michelini LC. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1474–R1482, 2000.
- Brum PC, Silva GJJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension* 36: 1018–1022, 2000.
- Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* 94: 630–640, 2009.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Opárl S, Wright JT Jr, Roccella EJ, The 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* 42: 1206–1252, 2003.
- Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 52: 514–521, 2008.
- Dreifuss JJ, Ragganbass M, Charpak S, Dubois-Dauphin M, Tribollet E. A role of central oxytocin in autonomic functions: its action in the motor nucleus of the vagus nerve. *Brain Res Bull* 20: 765–770, 1988.
- Dufloth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1271–R1282, 1997.
- Felix JVC, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 50: 780–785, 2007.
- Grippo AJ, Trahanas DM, Zimmerman 2nd RR, Porges SW, Carter CS. Oxytocin protects against negative behavioral and autonomic consequences of long-term social isolation. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1542–1553, 2009.
- Haram PM, Kemi OJ, Wisloff U. Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies. *Front Biosci* 13: 336–346, 2008.
- Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R537–R545, 2002.
- Higa-Taniguchi KT, Felix JV, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Exp Physiol* 94: 1103–1113, 2009.
- Higa-Taniguchi KT, Silva FCP, Silva HMV, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1717–R1727, 2007.
- Houshmand F, Faghihi M, Zahediasl S. Biphasic protective effect of oxytocin on cardiac ischemia/reperfusion injury in anaesthetized rats. *Peptides* 30: 2301–2308, 2009.
- Jackson K, Silva HMV, Wenfeng Z, Michelini LC, Stern JE. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol* 94: 3211–3220, 2005.

21. Jankowski M, Wang D, Danalache B, Gangal M, Gutkowska J. Cardiac oxytocin receptor blockade stimulates adverse cardiac remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H265–H274, 2010.
22. Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67: 187–197, 2005.
23. Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S, Michelini LC. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* 46: 1004–1009, 2005.
24. Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced pressure lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 42: 851–857, 2003.
25. Michelini LC. Oxytocin in the NTS. A new modulator of cardiovascular control during exercise. *Ann N Y Acad Sci* 940: 206–220, 2001.
26. Michelini LC. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. *Curr Hypertens Rep* 9: 214–221, 2007a.
27. Michelini LC. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 369–376, 2007.
28. Michelini LC, Morris M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. *Ann N Y Acad Sci* 897: 198–211, 1999.
29. Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol* 94: 947–960, 2009.
30. Moraes-Silva IC, La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damasceno-Rodrigues NR, Caldini EG, De Angelis K, Krieger EM, Irigoyen MC. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37: 114–120, 2009.
31. Morris M, Alexander N. Baroreceptor influences on oxytocin and vasoressin secretion. *Hypertension* 13: 110–114, 1989.
32. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed., San Diego, CA: Academic, 1986.
33. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 29: 2002–2007, 2001.
34. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 36: 533–553, 2004.
35. Peters JH, McDougall SJ, Kellett DO, Jordan D, Llewellyn-Smith IJ, Andresen MC. Oxytocin enhances cranial visceral afferent synaptic transmission to the solitary tract nucleus. *J Neurosci* 28: 11731–11740, 2008.
36. Rocha MJA, Callahan MF, Sundberg DK, Morris M. Sinoaortic denervation alters the molecular and endocrine responses to salt loading. *Neuroendocrinology* 57: 729–737, 1993.
37. Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev* 71: 331–370, 1991.
38. Rush JW, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 162–172, 2008.
39. Russ RD, Walter BR. Oxytocin augments baroreflex bradycardia in conscious rats. *Peptides* 15: 907–912, 1994.
40. Scheuer J, Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol Rev* 39: 221–251, 1977.
41. Schreihofner AM, Stricker EM, Sved AF. Chronic nucleus tractus solitarius lesions do not prevent hypovolemia-induced vasopressin secretion in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: R965–R973, 1994.
42. Schreihofner AM, Sved AF. Nucleus tractus solitarius and control of blood pressure in chronic sinoaortic denervated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: R258–R266, 1992.
43. Vela C, Diaz-Cabiale Z, Parrado C, Narvaez M, Covenas R, Narvaez JA. Involvement of oxytocin in the nucleus tractus solitarius on central cardiovascular control: interactions with glutamate. *J Physiol Pharmacol* 61: 59–65, 2010.
44. Whyte JJ, Laughlin MH. The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 441–450, 2010.



**Anexos B - Artigo publicado não relacionado à tese**

# Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats

Katia Burgi, Marina T. Cavalleri, Adilson S. Alves, Luiz R. G. Britto, Vagner R. Antunes and Lisete C. Michelini

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R264-R271, 2011. First published 9 December 2010; doi:10.1152/ajpregu.00687.2009

You might find this additional info useful...

This article cites 37 articles, 18 of which can be accessed free at:

<http://ajpregu.physiology.org/content/300/2/R264.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajpregu.physiology.org/content/300/2/R264.full.html>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpregu>

---

This information is current as of May 3, 2011.

# Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats

**Katia Burgi,\* Marina T. Cavalleri,\* Adilson S. Alves, Luiz R. G. Britto, Wagner R. Antunes, and Lisete C. Michelini**

*Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

Submitted 19 October 2009; accepted in final form 6 December 2010

**Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC.** Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R264–R271, 2011. First published December 9, 2010; doi:10.1152/ajpregu.00687.2009.—Vasomotor control by the sympathetic nervous system presents substantial heterogeneity within different tissues, providing appropriate homeostatic responses to maintain basal/stimulated cardiovascular function both at normal and pathological conditions. The availability of a reproducible technique for simultaneous measurement of sympathetic drive to different tissues is of great interest to uncover regional patterns of sympathetic nerve activity (SNA). We propose the association of tyrosine hydroxylase immunoreactivity (THir) with image analysis to quantify norepinephrine (NE) content within nerve terminals in arteries/arterioles as a good index for regional sympathetic outflow. THir was measured in fixed arterioles of kidney, heart, and skeletal muscle of Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) ( $123 \pm 2$  and  $181 \pm 4$  mmHg,  $300 \pm 8$  and  $352 \pm 8$  beats/min, respectively). There was a differential THir distribution in both groups: higher THir was observed in the kidney and skeletal muscle (~3–4-fold vs. heart arterioles) of WKY; in SHR, THir was increased in the kidney and heart (2.4- and 5.3-fold vs. WKY, respectively) with no change in the skeletal muscle arterioles. Observed THir changes were confirmed by either: 1) determination of NE content (high-performance liquid chromatography) in fresh tissues (SHR vs. WKY): +34% and +17% in kidney and heart, respectively, with no change in the skeletal muscle; 2) direct recording of renal (RSNA) and lumbar SNA (LSNA) in anesthetized rats, showing increased RSNA but unchanged LSNA in SHR vs. WKY. THir in skeletal muscle arterioles, NE content in femoral artery, and LSNA were simultaneously reduced by exercise training in the WKY group. Results indicate that THir is a valuable technique to simultaneously evaluate regional patterns of sympathetic activity.

hemodynamic measurements; norepinephrine content; sympathetic nerve activity; heart; kidney; skeletal muscles; exercise training

SYMPATHETIC NERVE ACTIVITY (SNA) has long been regarded as an important regulator of blood pressure and regional blood flow (5, 9, 17). In addition, the sympathetic nervous system has moved toward center stage in cardiovascular medicine with the recognition of the importance of sympathetic nerve activation in the pathogenesis of hypertension and other diseases (7–9, 13). Although once controversial, it is now widely accepted that elevated SNA is a major etiologic factor in human essential hypertension (7, 13, 15, 17). In fact, experimental evidence

had confirmed that essential hypertension is accompanied by sympathetic hyperactivity that impairs renal excretory function, augments the vasoconstriction of resistance vessels, and stimulates local trophic responses, thus causing vessel hypertrophy and maintenance of hypertension. Recent evidence, however, has shown specific mechanisms in different models of hypertension and that SNA is not uniformly increased, presenting substantial heterogeneity in the heart, kidneys, gastrointestinal tract, and muscles of hypertensive patients and animals (7, 28, 38). In other words, the intensity of SNA discharge to different regions may be different, depending on a variety of inputs to the autonomic centers regulating SNA. These observations have led to the concept of sympathetic signature that characterizes specific patterns [intensity, timing, impact on arterial pressure (AP)] of sympathetic activation to different vascular beds (28). However, the quantification of sympathetic nerve discharge to target organs in different forms of hypertension is not easy, requiring simultaneous direct assessment of regional pattern of SNA (28).

Several techniques used for sympathetic quantification [sympathectomy, ganglionic blockade, norepinephrine (NE) spillover, spectral analysis of blood pressure, and heart rate (HR) variabilities (1, 8, 9, 13, 29, 34, 37)] provide valid indices for overall SNA. The traditional microneurography technique measures it directly, but acutely in one tissue (13, 14, 31). A recent improvement of this technique permits SNA measurement in conscious animals for longer periods of time, but only up to 2 different tissues (15, 16, 31). Measurement of SNA indexes in three or more territories can be provided by NE spillover, but this technique is not usually employed in animal experimentation.

Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme involved in catecholamines synthesis within the postganglionic nerve terminals; therefore TH immunoreactivity (THir) changes have been used as a marker of sympathetic innervation (6, 22, 32, 36). We hypothesized that the combination of THir technique with the recent advances in the quantification of immunohistochemical signal (18) would allow the simultaneous measurement of NE synthesis within sympathetic nerve terminals of arteries/arterioles. This will be a useful index to quantify differential adrenergic activation in several territories at physiological states and during sympathetic overactivation occurring in the development and/or progression of pathological process. Here, we propose the simultaneous measurement of THir in different vascular beds of spontaneously hypertensive rats (SHR; the best-known model of essential hypertension) as a valid index to determine regional SNA in hypertension. To confirm our data, we compare THir results with both the NE content in different territories, as measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) and direct records of

\* K. Burgi and M. T. Cavalleri contributed equally to this study.

Address for reprint requests and other correspondence: L. C. Michelini, Dept. of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, Univ. of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil (e-mail: michelin@usp.br).

lumbar and renal SNA (LSNA and RSNA, respectively) in hypertensive and normotensive rats. To validate THir as an index of sympathetic activity we also measured skeletal muscle changes (THir, NE content, and LSNA) induced by exercise training in normotensive rats.

## MATERIALS AND METHODS

**Animal protocols and hemodynamic measurements.** Male SHR and normotensive controls [Wistar-Kyoto rats (WKY)] aged 5–6 mo were used in this study. Rats bred in the Animal Facilities at the Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo were housed in Plexiglas cages (4 rats/cage) in the Animal Facilities of the Department of Physiology and Biophysics (controlled temperature, 12:12-h light-dark cycle, with free access to food and water) for 1-wk acclimatization.

All procedures and experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo, in compliance with the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College on Animal Experimentation.

Younger WKY rats (2–3 mo at the beginning of protocols) were used for the low-intensity aerobic training protocol (18, 24). To this end, after the acclimatization to Animal Facilities, active rats were preselected according to their ability to walk/run on a treadmill (Inbramed model KT-300; 5–10 sessions, 0.3 up to 0.7 km/h, 0% grade, 10–15 min/day). At week 0, before starting the protocols, rats were submitted to a maximal exercise test on the treadmill (increments of 0.3 km/h every 3 min, starting with 0.3 km/h up to the exhaustion of the rat) to determine maximal individual aerobic capacities and to allocate rats with similar capability to trained (T) and sedentary (S, control) groups. Low-intensity training (~55% of maximal exercise capacity) was performed 1 h/day, 5 days/week over 3 mo, as previously described (10, 18, 24); the S group was kept sedentary for a similar period of time. Maximal exercise tests were repeated in the middle and at the end of protocols to adjust T group intensity and to quantify aerobic performance in both groups, respectively.

One to two days before the functional experiments, rats were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine ip (80 and 12 mg/kg, respectively) for chronic catheterization of the right carotid artery, as previously reported (10, 24). After surgery, rats were treated with analgesic plus antibiotic (ketoprofen 1%, 2 mg/kg; and penicillin, 24,000 IU/kg sc) and allowed to recover. AP and HR recordings were made 24–48 h after the arterial catheterization in conscious, freely moving rats resting in the experimental cage. The arterial catheter was connected to the recording system (model P23Db transducer, preamplifier, and 3400 Recorder Gould) and a variable period of time (20–45 min) was allowed for stabilization of cardiovascular parameters before starting the simultaneous measurement of AP and HR (determined from AP pulse interval by the Gould 5900 Recorder; Biotach, Valley View, OH) for 30–40 min (basal values).

**Monitoring of LSNA and RSNA.** After hemodynamic measurements, some rats of each group were anesthetized (1.2 g/kg ip urethane) for LSNA or RSNA recording. The level of anesthesia was checked frequently by assessing limb withdrawal reflexes to noxious pinching. Rectal temperature was measured by a thermometer and maintained between 36.5 and 37°C by using a heating blanket. A saline-filled catheter was inserted into the left femoral vein and used for hexamethonium injection (30 mg/kg) to block the sympathetic ganglion activity and to determine the background noise of SNA at the end of the experiment. A middle incision on the ventral surface of the neck was performed to insert a polyethylene catheter (PE-250) into the trachea to facilitate respiration. During the experimental procedure, animals were allowed to breathe spontaneously. Afterward, a midline laparotomy was made in the supine position and the intestines

were reflected to expose the abdominal aorta for identification of the paravertebral sympathetic chain. In addition, the left side of the lumbar sympathetic branch was carefully dissected by using a stereomicroscope (MC-M1232; DFV, São Paulo, Brazil), and a pair of thin, stainless steel bipolar electrodes was placed around the nerve at L2–L3 level for subsequent LSNA monitoring. Although it has been reported that the lumbar sympathetic trunk contains some preganglionic fibers (2) we, as well as other investigators, did not distinguish the quantification between pre- and postganglionic activity when recording the LSNA. For RSNA recording, a left lateral incision was made to expose the kidney and the sympathetic nerves. A small bundle of postganglionic nerves was separated from the nerve plexus adjacent to the renal artery by using the stereomicroscope. The connective tissue coverings were removed and the nerve was placed across the stainless steel bipolar electrode. The nerve bundle (lumbar or renal) and electrodes were bathed in a pool of 37°C mineral oil to prevent tissue drying. The original SNA was amplified (10 k of gain; model AN502 Differential Amplifier; Tektronix, Beaverton, OR), filtered (band-pass filter, 0.1–3.0 kHz) and acquired simultaneously with a blood pressure signal. Further processing was performed using a data acquisition system assembled on a computer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 10 kHz sampling rate; Dataq Instruments). Resting values of SNA and arterial blood pressure were recorded for 30 min. Data were analyzed in a computer running Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) with custom-written scripts for off-line analyses. LSNA and RSNA basal values were rectified and displayed as a moving average (100-ms time constant). For spike counting, we determined the upper margin of the nerve activity after ganglionic blockade (threshold value) by means of a cursor. Action potentials exceeding the threshold were counted and averaged every 60 s in each animal. Group means were averaged and displayed in histogram as  $\text{spike} \cdot \text{s}^{-1}$ . Since hexamethonium was used at equivalent dose for each animal, possible additional increases in LSNA due to preganglionic SNA induced by baroreceptor unloading would occur in every animal of any group. Therefore, it did not interfere in the comparison between groups.

**Tissue sampling.** After functional measurements, rats were deeply anesthetized (60 mg/kg ip pentobarbital sodium), allowing the respiratory arrest. Rats allocated to immunofluorescence processing were immediately submitted to transcardiac perfusion with 0.01 M PBS (100 ml) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l PBS, pH 7.2, 400–500 ml (Daigger Pump, 10 ml/min). The perfusion pressure was kept in the same range as the MAP recorded in the conscious animal. The soleus, red gastrocnemius, gracilis (locomotor muscles), and temporalis (nonlocomotor muscle) muscles, left kidney, and heart were removed, postfixed (4% paraformaldehyde, 12 h at 4°C), and cryoprotected (0.1 M PBS containing 30% sucrose at 4°C) for a minimum of 72 h and stored until processing. Rats assigned to HPLC studies were submitted to transcardiac perfusion with 0.01 M PBS only (~5 min) for fresh tissue collection. Skeletal muscles (soleus, temporalis), left kidney, heart, and femoral artery were immediately removed, wrapped in aluminum foil, and stored at –80°C until processing.

**Immunohistochemical studies.** Transverse sections of the locomotor and nonlocomotor muscles, renal cortex, and left ventricle (16 µm, Leica Cryostat CM3050) were collected directly in glass slides (4–8 slides/tissue, 2–4 slices/slide). Sections were incubated with 0.01% Triton X-100 and 10% normal horse serum for 1 h. Slides were processed for THir. Primary mouse monoclonal antibody anti-TH (Chemicon, 1:100 dilution, ~150 µl) diluted in PBS (0.01 M/l) was applied directly on the slices. Slides were incubated for 12 h at room temperature in a humid box. Slides were washed in PBS (3 times, 10 min each) and incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibody (FITC-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG, Jackson Immuno Research Laboratories; 1:100 diluted in 0.01 M/l PBS). After three washes in PBS, the slides were mounted with

Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA). Control experiments (with no fluorescence) were performed by omitting the primary or the secondary antibodies. All slices were inspected for localization of transverse arterioles sections. Images of arterioles from the skeletal muscles, left ventricle, and renal cortex were captured in a Nikon microscope (Eclipse model 1000; magnification,  $\times 200$ ). THir, expressed as percentage of area or area occupied by threshold signal/total area of interest, was analyzed in the adventitia and adventitia-medial border in the upper, lower, right, and left quadrants of each transverse arteriole section, within standard rectangular windows of  $250 \mu\text{m}^2$  for heart and kidney and of  $75 \mu\text{m}^2$  for the skeletal muscle arterioles (Image J software); 7–12 arterioles/tissue were measured. Background intensity was calculated from a similar window placed in the lumen of each arteriole and subtracted from the absolute THir intensity to give the net THir value/arteriole.

**HPLC analyses.** Tissue NE content was determined by HPLC, according to Garofalo et al. (12). Briefly, fresh tissue samples (kidney, heart, skeletal muscles, and femoral artery) were homogenized in 0.2 N perchloric acid with EDTA and sodium metabisulfite as antioxidants. After protein removal (Tris-HCl, pH 8.9), extracts were activated with acid-washed alumina and catecholamines eluted with 0.1 N perchloric acid. Catecholamines were assayed using HPLC (model LC-7A; Shimadzu Instruments) with a Spherisorb ODS-2 (5 mm; Sigma-Aldrich) reversed-phase column with a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase consisted of phosphate buffer with L-octanoic acid and 5% methanol. Dihydroxybenzylamine was used as the internal standard; results were corrected for

recovery, based on the recovery of the internal standard, which was, on average, 80%.

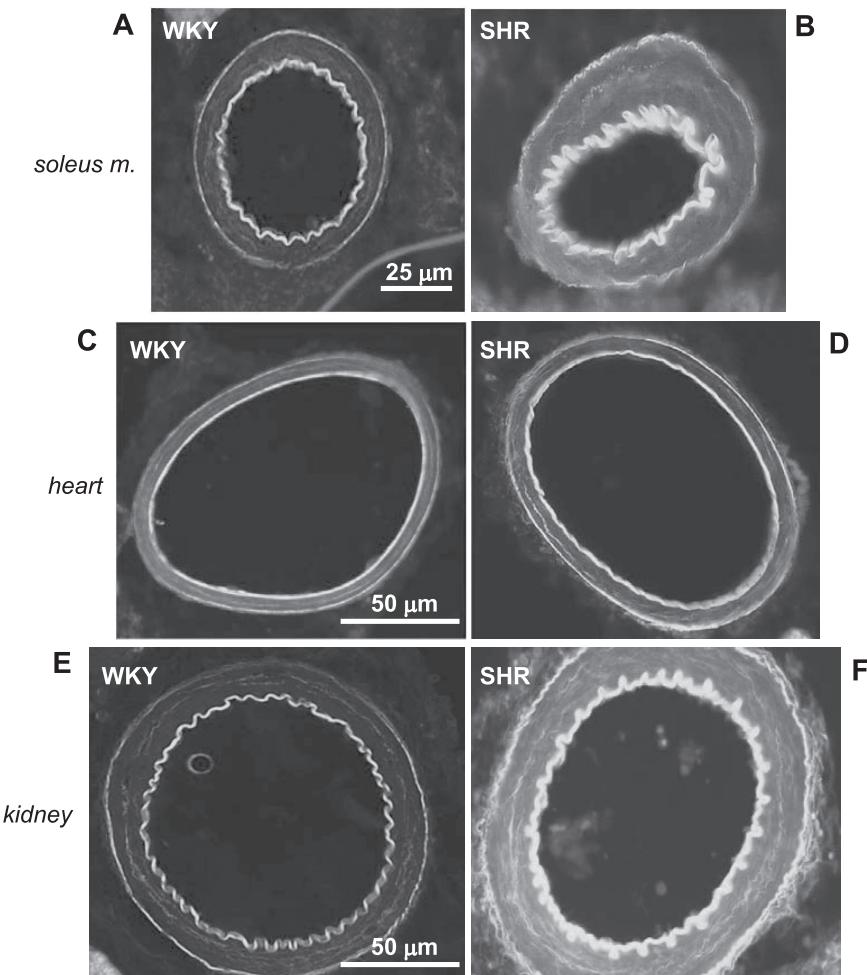
**Statistical analysis.** Results are presented as means  $\pm$  SE. Differences in THir, NE content, LSNA, and RSNA between groups were analyzed by Student's *t*-test, while differences between arteries and tissues in the WKY and SHR groups were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls as a post hoc test. The significance level was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Hemodynamic measurements in aged-matched SHR and WKY groups showed that hypertension was accompanied by high-pulsatile and mean AP ( $217 \pm 4/158 \pm 5$ ,  $181 \pm 4$  mmHg vs.  $145 \pm 2/108 \pm 3$ ,  $123 \pm 2$  mmHg, for systolic/diastolic, mean pressure,  $P < 0.05$ ) and elevated HR ( $352 \pm 8$  vs.  $300 \pm 8$  beats/min,  $P < 0.05$  for SHR vs. WKY groups, respectively).

Figure 1 shows the distribution/density of noradrenergic fibers within the skeletal muscle, heart, and kidney as measured by THir in transverse arterioles sections. THir was present in the adventitia and the adventitia-medial border (4, 11) where measurements were made. The internal elastic lamina of the vessels possessed a pronounced autofluorescence (11). One observes that THir was more evident in SHR arterioles taken from the heart and kidney ( $\sim 100 \mu\text{m}$  of internal diameter, Figs. 1, *D* and *F*) when compared with respective WKY

Fig. 1. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity (THir) in micrographs of the soleus muscle (*A* and *B*), heart (*C* and *D*), and kidney arterioles (*E* and *F*) in normotensive [Wistar-Kyoto rats (WKY); *A*, *C*, and *E*] and spontaneously hypertensive rats (SHR; *B*, *D*, and *F*). Perivascular sympathetic innervation is mainly observed in the adventitia and adventitia-medial border. Note the marked autofluorescence in internal elastic lamina.



controls (Fig. 1, C and E, respectively). In the soleus muscle arterioles ( $\sim 40 \mu\text{m}$  of internal diameter), THir was almost similar between SHR and WKY groups (Fig. 1, B and A, respectively).

Quantitative THir measurements in WKY group arterioles of locomotor and nonlocomotor muscles, heart, and kidney arterioles of the same rats confirmed a higher THir in the skeletal muscle and kidney than in the heart arterioles (average density of  $10.13 \pm 0.83\%$  in the skeletal muscles and  $12.71 \pm 1.02\%$  in kidney vs.  $3.08 \pm 0.51\%$  in heart arterioles, Fig. 2,  $P < 0.05$ ), confirming a dense noradrenergic innervation to skeletal muscle arterioles (4, 11). Interestingly, hypertension was accompanied by significant increases in THir in kidney and heart arterioles (average density of  $31.00 \pm 2.55\%$  and  $16.33 \pm 3.79\%$ , respectively, corresponding to increases of 2.4- and 5.3-fold vs. respective WKY controls, Fig. 2,  $P < 0.05$ ), but not in SHR arterioles taken from soleus, red gastrocnemius, gracilis, and temporalis muscles compared with respective WKY controls ( $P > 0.05$  for all comparisons; Fig. 2). Comparison of relative THir of arterioles in different tissues of the SHR also revealed a higher noradrenergic innervation in kid-

ney vs. heart and skeletal muscle arterioles (density values in Fig. 2).

To confirm the observations made with THir measurements, we determined the NE content in fresh SHR and WKY samples of kidney, heart, skeletal muscles, and femoral artery by HPLC (Fig. 3). In accordance with our previous results, quantitative measurements indicated that NE content in both skeletal muscles and femoral artery were not changed by hypertension ( $68 \pm 6$  vs.  $53 \pm 8$ ,  $40 \pm 4$  vs.  $45 \pm 5$ , and  $495 \pm 156$  vs.  $284 \pm 59$  ng/g of tissue in SHR vs. WKY for soleus, temporalis, and femoral artery, respectively  $P > 0.05$ , Fig. 3); in contrast, it was significantly increased in the kidney and heart (+34% and +17%, for SHR vs.  $123 \pm 3$  and  $446 \pm 37$  ng/g of tissue in the respective WKY groups,  $P < 0.05$ , Fig. 3). Comparison of tissue NE content showed that, contrary to that observed in arterioles, whole skeletal muscle content was smaller than kidney and heart, with the highest NE tissue content being observed in the heart (Fig. 3).

To further validate the efficacy of THir as a marker of SNA in the skeletal muscle and kidney arterioles, we recorded and compared the basal LSNA and RSNA in the SHR and WKY

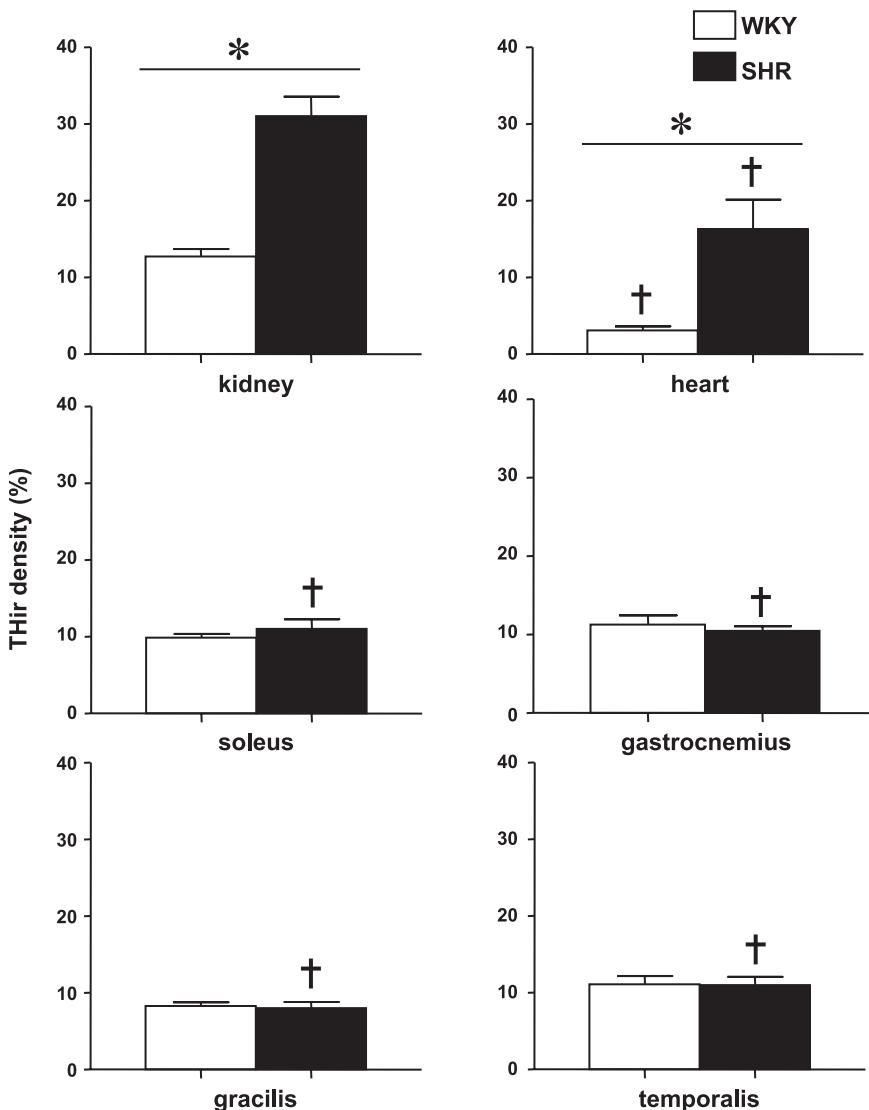


Fig. 2. THir density in the kidney, heart, and skeletal muscle (soleus, gastrocnemius, gracilis, temporalis) arterioles of WKY and SHR groups ( $n = 7$ –12 arterioles/tissue; 4–7 rats for each tissue in each group). Significances ( $P < 0.05$ ) are \*vs. WKY (Student's *t*-test); †vs. kidney (1-way ANOVA).

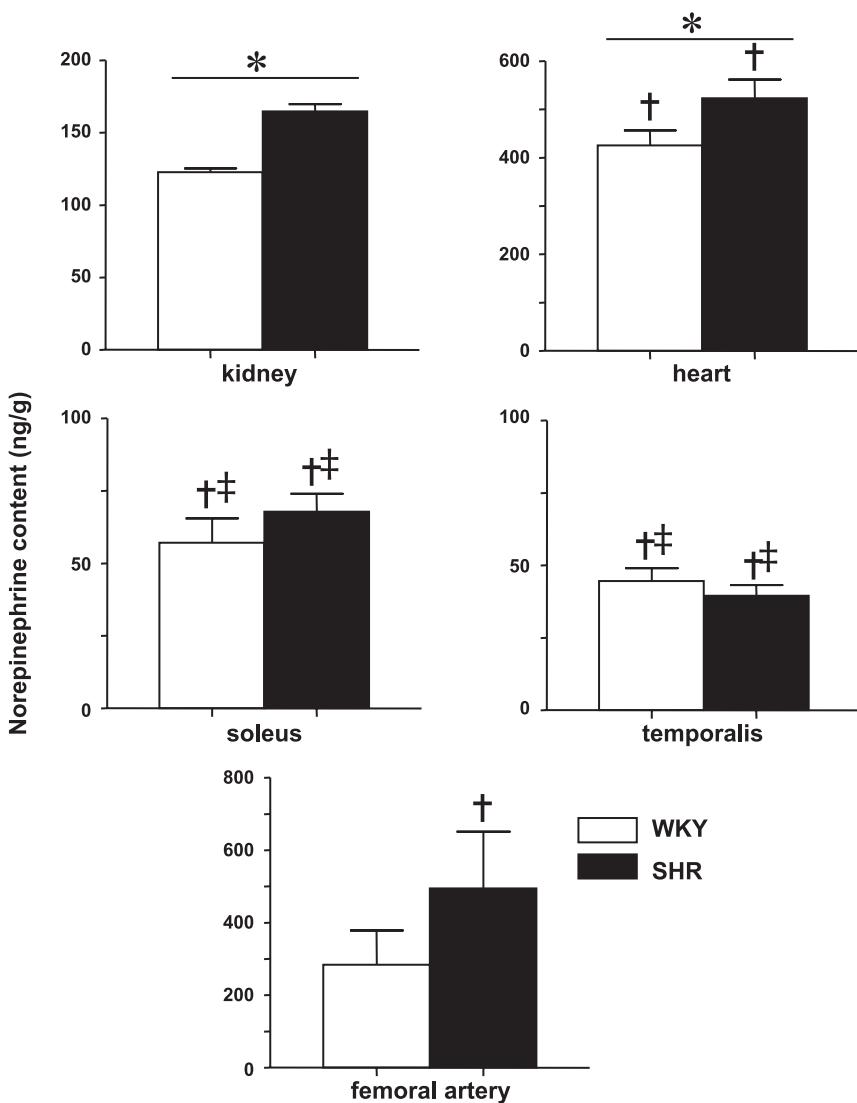


Fig. 3. Norepinephrine content measured by high-performance liquid chromatography in kidney, heart, and skeletal muscles (soleus, temporalis), and femoral artery of WKY and SHR groups ( $n = 5$ –9 rats for each tissue in each group). Significances ( $P < 0.05$ ) are \*vs. WKY (Student's  $t$ -test); †vs. kidney, ‡vs. heart (1-way ANOVA).

groups. Figure 4 shows that basal LSNA was similar between groups ( $22 \pm 5$  and  $26 \pm 5$  spikes·s $^{-1}$  in SHR and WKY,  $P > 0.05$ ), corroborating previous results obtained with both the THir in the arterioles and the NE content in the femoral artery and locomotor/nonlocomotor muscles of the SHR and WKY groups. However, RSNA was higher in the SHR compared with WKY group ( $45 \pm 9$  vs.  $15 \pm 7$  spikes·s $^{-1}$ , respectively, corresponding to a 188% increase,  $P < 0.05$ , Fig. 4), confirming again the THir results observed in renal arterioles and the kidney NE content.

To further examine regional differences on sympathetic activity within the same strain, we compared tissue THir, NE content in the femoral artery, and LSNA in trained and sedentary WKY. At the end of protocols, the trained group exhibited improved treadmill performance (attained velocity of  $1.45 \pm 0.11$  km/h, corresponding to an increase of  $0.75 \pm 0.07$  km/h), whereas sedentary WKY showed no improvement ( $0.70 \pm 0.08$  km/h). Training reduced HR ( $275 \pm 4$  vs.  $300 \pm 7$  beats/min,  $P < 0.05$ ), but pulsatile AP and mean AP were not changed ( $145 \pm 2$ / $107 \pm 2$ ;  $122 \pm 2$  mmHg for systolic/diastolic, mean pressure, respectively). As illustrated in Fig. 5 and quantified in Table 1, training caused significant reductions

of THir in locomotor and nonlocomotor muscles, which were accompanied by a proportional reduction on the femoral artery NE content and by a marked decrease in the LSNA. It should be noted that in normotensive rats, exercise training did not cause vascular remodeling in the skeletal muscle arterioles (24).

## DISCUSSION

New findings of the present study are 1) THir associated with semiquantitative measurement of the immunohistochemistry signal is a valuable technique to measure the synthesis of NE in the sympathetic nerve terminals; 2) THir could be measured simultaneously in several tissues of the same animal; 3) changes associated with hypertension are reproduced by other techniques as the quantitative measurement of NE content and the direct assessment of SNA; 4) in contrast to other techniques, measuring NE spillover or NE content in the whole tissue or a normalized (not absolute) regional SNA, THir is sensitive enough to show changes in sympathetic innervation associated with both hypertension and training and, therefore, differences in sympathetic tonus/activity within different tis-

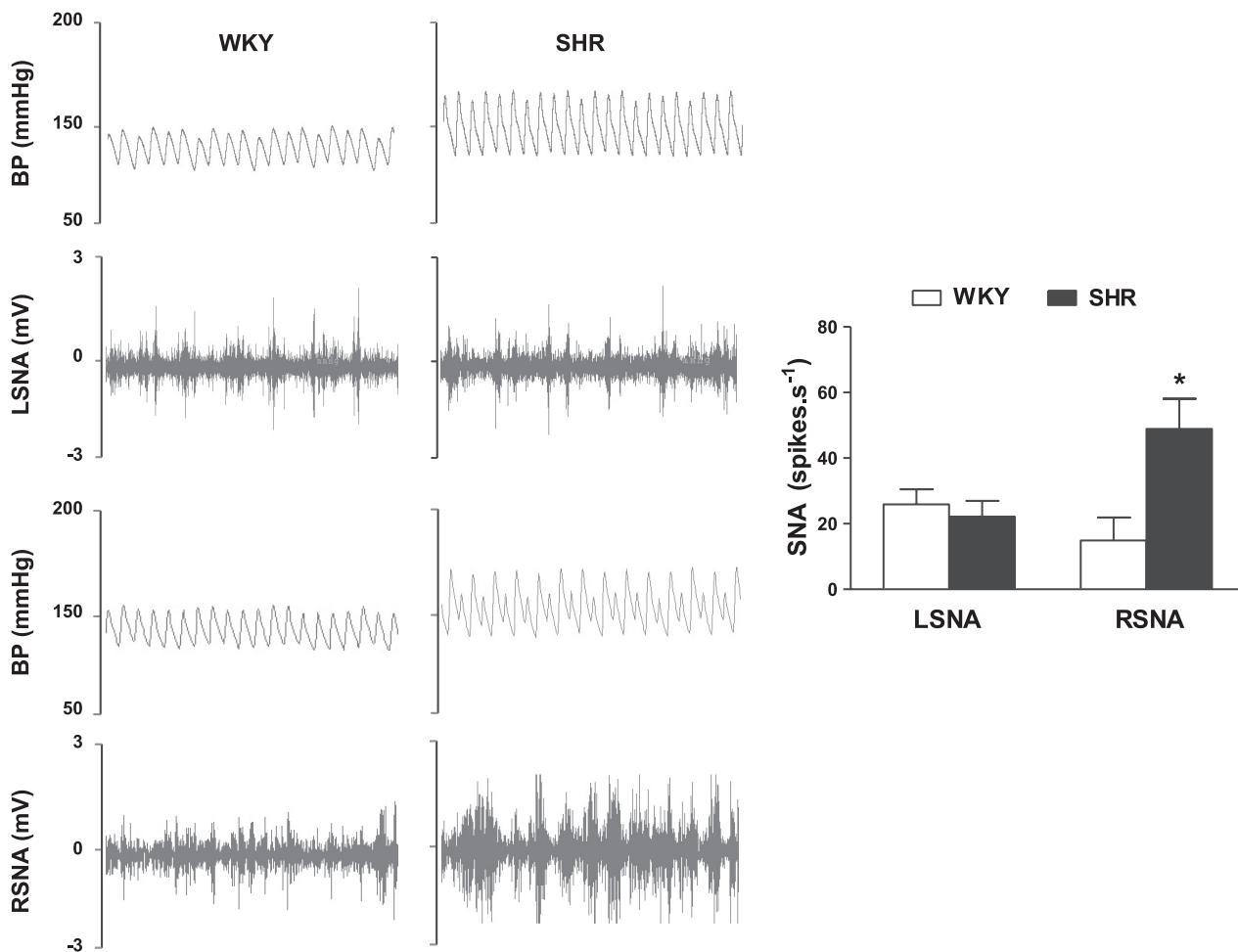


Fig. 4. *Left:* simultaneous recordings of blood pressure (BP) and neurogram of basal postganglionic lumbar (LSNA) and renal sympathetic nerve activity (RSNA) in anesthetized normotensive (WKY) and SHR. *Right:* comparison of basal values of LSNA and RSNA ( $\text{spikes} \cdot \text{s}^{-1}$ ) in WKY and SHR groups ( $n = 4$  rats in each group). Significance is ( $P < 0.05$ ) \*vs. WKY.

sues and between animals. Taken together, these observations indicate that THir is a good and appropriate index to evaluate regional patterns of sympathetic activation. Previous studies, by associating THir, TH protein content, NE synthesis, and NE content with sympathetic activity in different experimental conditions, do support the proposition that changes in TH activity may reflect changes in sympathetic activity (26, 30).

Antibodies to tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme involved in catecholamine synthesis, have been extensively used to mark postganglionic sympathetic terminals innervating vessels and tissues (6, 20, 22, 23, 32, 35, 36). Most of these studies, as usual for immunohistochemistry techniques, attempted only to localize sympathetic terminals and their relation to the surrounding structures. In a recent study, by asso-

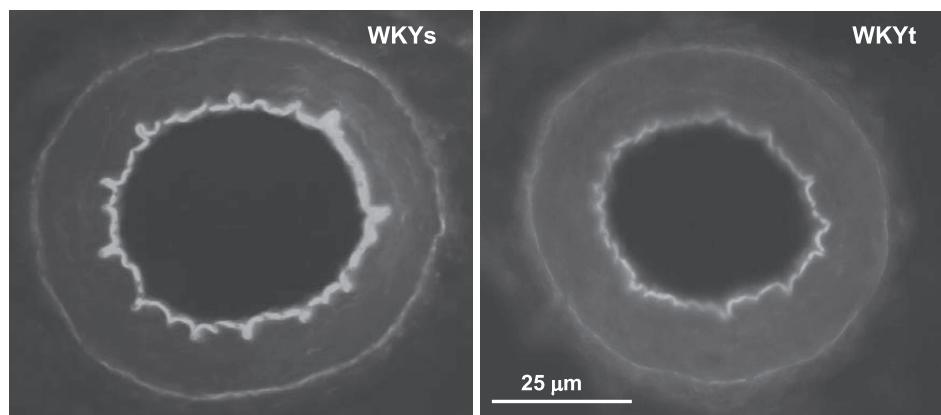


Fig. 5. Comparison of THir in gastrocnemius arterioles taken from sedentary (WKYs) and trained (WKYt) normotensive rats.

**Table 1.** Effects of low-intensity exercise training on tyrosine hydroxylase immunoreactivity (THir) in locomotor and nonlocomotor muscles on the norepinephrine (NE) content within the femoral artery and on the lumbar sympathetic nerve activity (LSNA) in sedentary and trained Wistar-Kyoto (WKY) rats

Measured Parameter	Sedentary WKY	Trained WKY	Training effect, %
THir, % area			
Soleus muscle	12.5 ± 1.3	6.8 ± 0.9*	-46%
Gastrocnemius muscle	11.3 ± 1.1	4.9 ± 0.5*	-57%
Temporalis muscle	10.9 ± 1.4	7.4 ± 0.7*	-32%
NE content in the			
femoral artery, ng/g	284 ± 59	149 ± 32*	-48%
LSNA, %	149 ± 32	42 ± 8*	-72%

Values are means ± SE. LSNA was measured in 5–6 rats/group; NE content was measured in 10 femoral arteries per group, and THir was quantified in 8–10 arterioles taken from 4–5 rats per group. Significance ( $P < 0.05$ ) is \*vs. sedentary group.

ciating the immunohistochemistry technique with semiquantitative methods to measure the signal intensity/density in specific areas (by means of Image analysis software) we were able to obtain arbitrary values that reflect the relative density of that particular signal, thus permitting the comparison of signal magnitude between animals and/or groups (18). Procedures like that have also been used with the *in situ* hybridization technique (10, 33). The association of THir with image analysis allowed us to quantify the relative expression of the sympathetic transmitter synthesis in the vasculature of several tissues, indicating both the differential expression between them and the specific changes induced by hypertension or training. In the sympathetic terminals of the normotensive group, we observed a high THir in the skeletal muscle and kidney arterioles, the lowest content being observed in heart arterioles (Fig. 2). This effect seems to be specific for the vasomotor innervation, because a different distribution of NE content was observed in the whole tissue of normotensive animals (highest in the heart, medium in the kidney, and lowest in the skeletal muscles, Fig. 3).

Interestingly, hypertension was associated with significant increases of THir in the kidney and heart, but not in the skeletal muscle arterioles, an effect that was confirmed by HPLC determination of the NE content in these tissues. Several authors outlined differential patterns of sympathetic activation in specific hypertensive models. For example angiotensin-induced hypertension was accompanied by decreased RSNA in dogs (21) and rabbits (3). Osborn and Fink and colleagues (28, 38) described that angiotensin II/salt-induced hypertension was also accompanied by decreased RSNA, unchanged muscle, and increased splanchnic SNA, characterizing according to these authors, a specific sympathetic signature. Our results, showing in the SHR group increased kidney and heart THir, increased RSNA, but unchanged arterioles THir in skeletal muscles accompanied by unchanged LSNA, also indicate differential regional patterns of NE synthesis and sympathetic activity, characterizing a different sympathetic signature in the SHR, the best animal model for essential hypertension. Interestingly, our data and previous observations (28, 38) indicate that basal vasomotor activity to skeletal muscles, as reflected by LSNA or THir, is preserved in different types of hypertension. In contrast, RSNA differs among hypertensive models: it is in-

creased in the SHR (present set of data), but decreased in angiotensin and angiotensin-salt hypertension (3, 21, 28, 38). In addition, THir data can detect territorial differences in NE synthesis within groups: kidney and skeletal muscle arterioles of the WKY exhibited similar magnitude of innervation, which is significantly higher than that of the heart. On the other hand, heart and skeletal muscle innervations were similar in the SHR and smaller than that of the kidney.

THir technique is also sensitive to detect differences on regional vascular NE content and on regional sympathetic activity in normotensive rats in which sympathetic vasomotor drive was reduced by exercise training. Previous studies have already indicated the potentiality of training to reduce LSNA (14, 27) and to modify central autonomic control in normotensive rats (25). It is important to note that exercise training in normotensive rats did not change blood pressure levels and was not accompanied by vascular remodeling (24) in such a way that the vascular THir changes observed were exclusively due to alterations in vasomotor sympathetic drive.

It should be stressed that the present set of data does not rule out the important contribution of continuous direct recording of SNA to evaluate the sympathetic drive. The technique presented here has the advantage of quantifying, at the same time, sympathetic changes in several tissues, but the limitation to provide a static picture at one time point. It is also important to stress that our THir results on vessel NE content reflect regional adrenergic activation of WKY and SHR groups at basal condition. It remains to be determined whether THir is also a valid SNA index during high sympathetic activation.

In summary, the present results show clearly that THir, by quantifying NE synthesis in sympathetic nerve terminals in the adventitia/adventitia-medial border of arteries/arterioles, is a valuable technique to quantify basal sympathetic activity in a specific tissue. In addition, by permitting the simultaneous measurements in different tissues of the same animal (as many as necessary), as well as comparisons between groups, it could be an easy method to evaluate the regional pattern of sympathetic activation.

#### Perspectives and Significance

To date, there is no ideal technique to measure continuously and simultaneously the sympathetic activity in three or more tissues. The simultaneous semiquantitative measurement of arteriole THir in several target organs, although giving just a static view, could be an alternative and/or additional method to uncover differences on regional SNA and/or vasomotor activation in normal and pathological conditions. In addition, the technique proposed here could contribute to identify mechanisms linking changes in SNA to the pathogenesis and maintenance of different types of hypertension.

#### GRANTS

This study was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Research Grants 06/50548-9, 08/53961-0, and 07/53320-1 (fellowship to K. Burgi) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq; fellowship to M. T. Cavalleri). L. C. Michelini is a research fellow from CNPq.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

## REFERENCES

- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213: 220–222, 1981.
- Bahr R, Bartel B, Blumberg H, Jänig W. Secondary functional properties of lumbar visceral preganglionic neurons. *J Auton Nerv Syst* 15: 141–152, 1986.
- Barrett CJ, Ramchandra R, Guild SJ, Lala A, Budgett DM, Malpas SC. What sets the long-term level of renal sympathetic nerve activity: a role for angiotensin II and baroreflexes? *Circ Res* 92: 1310–1336, 2003.
- Bevan JA, Bevan RD, Duckles SP. Adrenergic regulation of vascular smooth muscle. In: *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System, Vascular Smooth Muscle*, edited by Bohr DF, Somlyo AP, and Sparks VV, Jr. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980, vol. II, p. 515–566.
- Blessing WW. The lower brainstem and bodily homeostasis. New York: Oxford University Press, 1997.
- Damon DH. TH and NPY in sympathetic neurovascular cultures: role of LIF and NT-3. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C306–C312, 2008.
- Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens* 13: 99S–105S, 2000.
- Esler M, Kaye D. Sympathetic nervous system activity in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 1–7, 2000.
- Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G. Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate and functions. *Physiol Rev* 70: 963–985, 1990.
- Felix JVC, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 50: 780–785, 2007.
- Fleming BP, Gibbins IL, Morris JL, Gannon BJ. Noradrenergic and peptidergic innervation of the extrinsic vessels and microcirculation of the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 37: 255–268, 1989.
- Garofalo MA, Kettellhut IC, Roselino JE, Migliorini RH. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J Auton Nerv Syst* 60: 206–208, 1996.
- Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens* 17: 719–734, 1999.
- Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Mancia G. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension* 23: 294–301, 1994.
- Guild SJ, Barrett CJ, Malpas SC. Long-term recording of sympathetic nerve activity: the new frontier in understanding the development of hypertension? *Clin Exp Physiol Pharmacol* 32: 433–439, 2005.
- Guild SJ, Barrett CJ, McBryde FD, Van Vliet BN, Head GA, Burke SL, Malpas SC. Quantifying sympathetic nerve activity: problems and pitfalls, the need for standardization. *Exp Physiol* 95: 41–50, 2010.
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7: 335–346, 2006.
- Higa-Taniguchi KT, Silva FCP, Silva HMV, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1717–R1727, 2007.
- Julien C, Kandza P, Barres C, Lo M, Cerutti C, Sassard J. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 259: H1337–H1342, 1990.
- Lindsay TH, Halvorson KG, Peters CM, Ghilardi JR, Kuskowski MA, Wong GY, Mantyh PW. A quantitative analysis of the sensory sympathetic innervation of the mouse pancreas. *Neuroscience* 137: 1417–1426, 2006.
- Lohmeier TE, Lohmeier JR, Reckelhoff JF, Hildebrandt DA. Sustained influence of the renal nerves to attenuate sodium retention in angiotensin hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R434–R443, 2001.
- Long JB, Segal SS. Quantitative perivascular sympathetic innervation: regional differences in male C57BL/6 mice at 3 and 20 months. *J Neurosci Meth* 184: 124–128, 2009.
- Luff SE, Hengstberger SG, McLachlan EM, Anderson WP. Distribution of sympathetic neuroeffector junctions in the justaglomerular region of the rabbit kidney. *J Auton Nerv Syst* 40: 239–253, 1992.
- Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 42: 851–857, 2003.
- Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol* 94: 947–960, 2009.
- Morrison JFB, Pallot DJ, Sheen R, Dhanasekaran S, Mensah-Brown EPK. The effects of age and streptozotocin diabetes on the sympathetic innervations in the rat penis. *Mol Cell Biochem* 295: 53–58, 2007.
- Mueller PJ. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. *J Appl Physiol* 102: 803–813, 2007.
- Osborn JW, Fink GD. Region specific changes in sympathetic nerve activity in angiotensin II-salt hypertension. *Exp Physiol* 95: 61–68, 2010.
- Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 59: 178–193, 1986.
- Parrish DC, Gritman K, Van Winkle DM, Woodward WR, Bader M, Habecker BA. Postinfarct sympathetic hyperactivity differentially stimulates expression of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H99–H106, 2008.
- Ramchandra R, Hood SG, Frithiof R, May CN. Discharge properties of cardiac and renal sympathetic nerves and the impaired control of blood volume in heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1247–R1253, 2009.
- Saltzman D, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. The microvasculature in skeletal muscle. VI. Adrenergic innervation of arterioles in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* 44: 263–273, 1992.
- Sangaleti CT, Crescenzi A, Michelini LC. Endogenous angiotensin and pressure modulate brain angiotensinogen and AT1a mRNA expression. *Hypertension* 43: 317–323, 2004.
- Santajuliana D, Hornfeldt BJ, Osborn JW. Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 35: 45–54, 1996.
- Sternini C, Brecha N. Distribution and colocalization of neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res* 241: 93–102, 1985.
- Swissa M, Zhou S, Tan AY, Fishbein MC, Chen PS, Chen LS. Atrial sympathetic and parasympathetic nerve sprouting and hyperinnervation induced by subthreshold electrical stimulation on the left stellate ganglion in normal dogs. *Cardiovasc Pathol* 17: 303–308, 2008.
- Thompson JM, O'Callaghan CJ, Kingwell BA, Lambert GW, Jennings GL, Esler MD. Total norepinephrine spillover, muscle sympathetic nerve activity and heart-rate spectral analysis in a patient with dopamine  $\beta$ -hydroxylase deficiency. *J Auton Nerv Syst* 55: 198–206, 1995.
- Yoshimoto M, Miki K, Fink GD, King A, Osborn JW. Chronic angiotensin II infusion causes differential responses in regional sympathetic nerve activity in rats. *Hypertension* 55: 644–651, 2010.