THAIS TESSARI ZAMPIERI

**EFEITOS SEQUENCIAIS DO TREINAMENTO
FÍSICO SOBRE A PLASTICIDADE DE VIAS
OCITOCINÉRGICAS CENTRAIS EM RATOS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

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

São Paulo
2011

THAIS TESSARI ZAMPIERI

**EFEITOS SEQUENCIAIS DO TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE A PLASTICIDADE DE VIAS
OCITOCINÉRGICAS CENTRAIS EM RATOS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

**Orientadora: Prof^a Dr^a Lisete Compagno
Michelini**

Versão Original

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Zampieri, Thais Tessari.

Efeitos sequenciais do treinamento físico sobre a plasticidade de vias ocitocinérgicas centrais em ratos normotensos e hipertensos / Thais Tessari Zampieri. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Lisete Compagno Michelini.

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

Versão do título para o inglês: Sequential effect of aerobic training on the plasticity of central oxytocinergic system in normotensive and hypertensive rats.

Descritores: 1. Treinamento físico 2. Hipertensão 3. BDNF 4. Ocitocina 5. PVN 6. NTS I. Michelini, Lisete Compagno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB089/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thais Tessari Zampieri.

Título da Dissertação: Efeitos sequenciais do treinamento físico sobre a plasticidade de vias ocitocinérgicas centrais em ratos normotensos e hipertensos.

Orientador(a): Lisete Compagno Michelin.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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

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

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

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **057** nas fls. **57** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Lisete C. Michelini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Efeitos seqüenciais do treinamento físico e do treinamento físico associado à hipertensão sobre a plasticidade neuronal em vias autonômicas centrais"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Marina Tuppy, Kátia Burgi, Maria Tereza Jordão, Thais Zampieri, Douglas Costa Braga** 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 **26.08.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de agosto de 2008.

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

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

Dedico à minha família, incluindo desde os
meus pais, irmão, marido, avós, tios,
primos até meus amigos. Que mesmo de
longe sempre estavam presentes em meu
coração e mente me apoiando,
incentivando e confiando em mim.

AGRADECIMENTOS

À **Profª Drª Lisete Compagno Michelin**i, pela confiança depositada desde o início de minha monografia, pela orientação e principalmente pela compreensão além dos limites do ambiente de trabalho.

Ao **Prof.Dr. Javier Eduardo Stern**, pela confiança e oportunidade que me ofereceu em conhecer o desconhecido, e vivenciar outra realidade do “mundo da pesquisa”.

À **CAPES** e **FAPESP**, por auxiliar direta ou indiretamente na realização desta dissertação.

Ao **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, onde desenvolvi grande parte do meu trabalho de pesquisa e construir novos conhecimentos.

À **Medical College of Georgia**, onde realizei parte da minha pesquisa e tive oportunidade de conviver com pessoas de todas as partes do mundo.

A todos os integrantes do **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB/USP)**, que direta ou indiretamente ajudaram e contribuíram na realização desta dissertação.

Aos meus maravilhosos amigos da “**Galeradathais**”, que estão sempre presentes mesmo que a quilômetros de distância.

Ao **Norair, Cristina e Thiago**, por me amarem, darem força e estímulo para sempre continuar crescendo. Eu Amo muito vocês!

Ao **Felipe**, por ser meu companheiro e testemunha da minha vida. Por me incentivar e compreender. Você me completa! Te Amo!

“(...) Nos famosos experimentos de Hunter um camundongo alcançava a sua meta em um labirinto correndo em uma certa direção, mas quando um elemento do labirinto era substituído por um recipiente com água, o animal passava a atingir a meta por meio de movimentos natatórios. (...) embora incapaz de reproduzir os movimentos aprendidos por meio do treinamento, o rato era capaz de atingir a sua meta mediante a utilização de todos os meios ao seu dispor (...)”
Aleksandr Romanovich Luria, 1981

RESUMO

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

Nós investigamos o efeito sequencial do treinamento aeróbio (T) nas vias ocitocinérgicas (OTérgicas) em áreas centrais autonômicas, utilizando o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) como um indicador de plasticidade neuronal. WKY e SHR foram submetidos a T de baixa intensidade em esteira (55% VO₂ máximo) ou sedentarismo (S) por 8 semanas. Pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram aferidas semanalmente. De fatias do hipotálamo e tronco encefálico (~800 µm) foram coletados o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), partes dorsal e ventral do tronco encefálico (DBS e VBS). A expressão de RNAm de BDNF, OT e receptor de OT (OTR) foi estimada mediante PCR em tempo real. Outros cérebros foram fixados e foram realizados cortes (30 µm) do PVN, NTS e RVLM, para análises de imunofluorescência (microscopia confocal). T promoveu bradicardia de repouso (~12% de redução em ambos os grupos: SHR, T₂-T₈; WKY em T₈) e redução da PA (~6% nos SHR em T₈). Nos WKY T, a expressão de BDNF no PVN apresentou precoce e transiente aumento (2,5 vezes em T₁) e no DBS pico posterior com menor magnitude (1,5 vezes em T₁-T₂). Nos SHR T a expressão de BDNF foi menor e apareceu tardiamente (PVN = +1,4 vezes em T₄-T₈; DBS = +1,5 vezes em T₂-T₈); mas no VBS a expressão de BDNF também estava aumentada (1,8 vezes em T₁-T₈). Nestas áreas o conteúdo de BDNF foi similarmente aumentado em WKY e SHR de T₁-T₂ até T₈. As alterações do BDNF foram acompanhadas por aumento no conteúdo de OT induzidos pelo T no PVN (RNAm, 3 a 4 vezes maior; proteína 2,4 a 2,8 vezes maior, começando em T₂) e expressão de RNAm de OTR no DBS e VBS (1,5 a 2,2 vezes maior em T₂-T₈ e 1,3 a 1,6 vezes maior em T₁-T₄, respectivamente). Os resultados indicam que a plasticidade induzida pelo T no sistema OTérgico central ocorre precocemente no PVN comparado com outras áreas autonômicas, é mais rápido em WKY e precede as mudanças da FC. Os dados também mostram maior “turnover” do RNAm de BDNF no grupo SHR.

Palavras-chave: Treinamento físico. Hipertensão. BDNF. OT. PVN. NTS. RVLM.

ABSTRACT

ZAMPIERI, T. T. **Sequential effect of aerobic training on the plasticity of central oxytocinergic system in normotensive and hypertensive rats.** 2011. 91 p. Master's thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

We investigate time-course training (T) effects on oxytocinergic (OTergic) pathways within autonomic areas, using brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a index of neuronal plasticity. WKY and SHR were submitted to low-intensity T on treadmill (55% VO₂max) or kept sedentary (S) for 8 weeks. Mean arterial pressure (AP) and resting heart rate (HR) was measured at weeks zero, 1, 2, 4 and 8. Fresh brains slices interesting hypothalamus and brain stem (~800 µm on dry ice) were obtained for punching the paraventricular nucleus (PVN), the dorsal and ventral brain stem (DBS and VBS). BDNF, OT, OT receptor (OTR) mRNA expression were estimated by real time PCR. Other brains were fixed and cryoprotected; PVN, NTS and RVLM were sliced (30 µm) and incubated with anti-BDNF, anti-OT and 2^{ary} antibodies for immunofluorescence analysis (confocal microscopy). T equally improved treadmill performance and caused resting bradycardia (~12% reduction in both groups: SHR, from T₂ up to T₈; WKY at T₈). T were also efficient to reduce AP (~6% only in SHR at T₈). In trained WKY, PVN exhibited a precocious and transient BDNF expression increase (2.5-fold at T₁) with a late and smaller peak in DBS (1.5-fold at T₁-T₂). In trained SHR BDNF expression was smaller and/or appeared later (PVN=+1.4-fold, T₄-T₈; DBS=+1.5-fold, T₂-T₈); BDNF expression was also increased in the VBS (1.8-fold, T₁-T₈). In these areas BDNF protein content was similarly increased in WKY and SHR from T₁-T₂ up to T₈. BDNF changes were accompanied by increased T-induced OT content in the PVN (mRNA, 3 to 4-fold increase; protein 2.4 to 2.8-fold increase, starting at T₂) and OT receptor mRNA expression in the DBS and VBS (1.5 to 2.2-fold increase at T₂-T₈ and 1.3 to 1.6-fold increase at T₁-T₄, respectively). Results indicate that T-induced plasticity of central OTergic system occurs precociously in the PVN compared to other autonomic areas, is faster in WKY and precedes HR changes. Data also showed higher BDNF mRNA turnover in the SHR group.

Key words: Exercise training. Hypertension. BDNF. OT. PVN. NTS. RVLM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach – acetilcolina

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CATérgico – catecolaminérgico

cDNA – DNA complementar

CREB – “cAMP-response-element binding protein”

CVLM – área caudoventrolateral do tronco encefálico

dATP - desoxiAdenosina Trifosfatada

DBS – região dorsal do tronco encefálico

dCTP - desoxiCitidina Trifosfatada

dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada

DMV – núcleo motor dorsal do vago

DNA – ácido desoxirribonucléico

dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada

FC – frequência cardíaca

FRET – “Fluorescence Resonance Energy Transfer”

GABA – ácido gamma-aminobutírico

GAPDH - gliceraldeído fosfato dehidrogenase

HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

NA - núcleo ambíguo

NORérgico – noradrenérgico

NTS - núcleo do trato solitário

OT - ocitocina

OTérgico – ocitocinérgico

OTR – receptor de ocitocina

PA – pressão arterial

PB – tampão fosfato

PBS – tampão fosfato salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFD – paraformaldeído

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

RVLM - área rostroventrolateral do tronco encefálico

S – sedentário

SHR – “Spontaneously Hypertensive Rat”

SNC – sistema nervoso central

SON – núcleo supraótico

T – treinado

TBS – “Tissue Freezing Medium”

TF – treinamento físico de intensidade moderada

Trk - receptores tirosina-cinase

UBC – ubiquitina

VBS – região ventral do tronco encefálico

VP – vasopressina

VPérgico – vasopressinérgico

WKY – “Wistar Kyoto”

β2m - β-2 microglobulina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares, as quais facilitam controle autonômico da circulação durante o exercício.....23
- Quadro 1.** Tabela de dados para realização do teste de esforço máximo, correlacionando o tempo da corrida com a velocidade.....33
- Quadro 2.** Grupos experimentais divididos por linhagem (SHR e WKY), condição (S ou T) e tempo (0, 1, 2, 4 e 8 semanas).....34
- Figura 2.** Regiões de interesse: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), parte dorsal do tronco encefálico (DBS) e parte ventral do tronco encefálico (VBS).....37
- Quadro 3.** Sequência dos primers para HPRT, OT, OTR e BDNF utilizadas no experimento, designadas respectivas temperaturas de anelamento dos primers (TM) e tamanho do fragmento (pader de base) originado após PCR (amplicon).....41
- Figura 3.** Ganho de peso ao longo do protocolo experimental de treinamento físico (8 semanas) dos grupos WKY e SHR sedentários e treinados. *diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao sedentário correspondente.....47
- Figura 4.** Velocidade (km/h) atingida no primeiro teste máximo de animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). *diferença estatística ($p<0,05$).....48
- Figura 5.** A) Alteração sequencial no desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Testes de esforço máximo realizados no início, na 4ª e 8ª semanas dos protocolos (significâncias na Tabela 1); B) Efeito do T ou S sobre a capacidade física dos animais, obtida pela diferença de desempenho entre as semanas 8 e 0. * diferença em relação ao controle sedentário, + diferença em relação ao WKY_S. ($p<0,05$).....49

Figura 6. Pressão arterial média (PA) (A) e frequência cardíaca basal (FC) (B) ao longo de oito semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T) em animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Significâncias na Tabela 2.....51

Quadro 4. Linearidade, eficiência e inclinação para cada primer utilizados neste estudo (HPRT, OT, OTR e BDNF) testados em cada região central de interesse (PVN, DBS e VBS).....52

Figura 7. Alteração sequencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OT (A) e de BDNF (B) no PVN de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 3.....54

Figura 8. Alteração sequencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OTR (A) e de BDNF (B) no DBS de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 4.....56

Figura 9. Alteração sequencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OTR (A) e de BDNF (B) no VBS de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 5.....58

Figura 10. Imagens representativas de imunorreatividade a OT no PVN caudal de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. A região anatômica de referência para localização do PVN foi o terceiro ventrículo (3V), representado pela linha tracejada. Barra de escala = 50 µm.....60

Figura 11. Alteração sequencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de OT no PVN de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 6.....61

Figura 12. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no PVN caudal de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₁, T₈ e S₈. A região anatômica de referência para localização do PVN foi o 3V, representado pela linha tracejada. Barra de escala = 50 µm.....63

Figura 13. Alteração seqüencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no PVN de WKY e SHR' submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 7.....64

Figura 14. Imunofluorescência com dupla marcação com BDNF (vermelho, A e E) e OT (azul, B e F) no PVN caudal (A-D) e medial (E-H). A sobreposição das imagens de OT e BDNF é mostrada em C (PVN caudal) e G (PVN medial). A colocação de OT e BDNF é detalhada em D e H, que correspondem à ampliação das janelas ilustradas em C e G, respectivamente.....65

Figura 15. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no NTS de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) dos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. As regiões anatômicas de referência para localização do núcleo do trato solitário (NTS) foram: núcleo gracil (Gr); trato solitário (Sol); núcleo dorsal motor do vago (DMV) e núcleo hipoglosso (12 N). Barra de escala = 50 µm.....68

Figura 16. Alteração seqüencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no NTS de WKY e SHR' submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 8.....69

Figura 17. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no RVLM de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. As regiões anatômicas de referência para localização do RVLM foram: núcleo olivar inferior (IOD) e parte compacta do núcleo ambíguos (AmbC) visualizados e identificados por meio de microscopia ótica em campo escuro, demonstrados no canto inferior esquerdo de cada imagem sendo o quadrado (□) a região onde foi adquirida a imagem de imunofluorescência. Barra de escala = 50 µm.....71

Figura 18. Alteração seqüencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no RVLM de WKY e SHR' submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 9.....72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Velocidade máxima e ganho em desempenho (em km/h) atingidos nos testes de esforço máximo, realizados na semana 0, 4 e 8, dos animais WKY_S, WKY_T, SHR_S e SHR_T.....49
- Tabela 2** - Dados de pressão arterial média (PAM) (mmHg) e frequência cardíaca basal (FC) (bpm) registrados nos diferentes tempos (S₀, T₁, T₂, T₄, T₈, S₈) nos 2 grupos experimentais (WKY e SHR). Valores apresentados como média±erro.....51
- Tabela 3** - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OT e BDNF no PVN: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.....54
- Tabela 4** - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OTR e BDNF no DBS: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.....56
- Tabela 5** - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OTR e BDNF no VBS: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.....58
- Tabela 6** - Alterações na intensidade e densidade medidas por neurônio (UA) de OT no PVN: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais..61
- Tabela 7** - Alterações na intensidade e densidade medidas por neurônio (UA) de BDNF no PVN: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.....64

Tabela 8 - Alterações na intensidade e densidade medidas por neurônio (UA) de BDNF no NTS: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.....69

Tabela 9 - Alterações na intensidade e densidade medidas por neurônio (UA) de BDNF no RVLM: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.....72

SUMÁRIO

1	Introdução e Revisão de Literatura	19
1.1	<i>Controle neural da PA e FC.....</i>	<i>21</i>
1.2	<i>Modulação exercida pelas projeções suprabulbares sobre alterações do tônus autonômico durante ajustes da resposta cardiovascular ao exercício dinâmico e/ou treinamento aeróbio</i>	<i>23</i>
1.3	<i>Plasticidade Neuronal e T.....</i>	<i>26</i>
1.4	<i>Neurotrofina BDNF</i>	<i>27</i>
2	Objetivos.....	31
3	Material e Métodos.....	32
3.1	<i>Animais Experimentais.....</i>	<i>32</i>
3.2	<i>Treinamento Físico.....</i>	<i>32</i>
3.2.1	<i>Adaptação.....</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Teste de Esforço Máximo</i>	<i>33</i>
3.2.3	<i>Grupos Experimentais</i>	<i>34</i>
3.2.4	<i>Protocolo de Treinamento Físico de Baixa Intensidade.....</i>	<i>34</i>
3.3	<i>Canulação Arterial e Registro Direto da PA e FC</i>	<i>35</i>
3.4	<i>Técnica de PCR em Tempo Real.....</i>	<i>36</i>
3.4.1	<i>Obtenção de tecido cerebral.....</i>	<i>36</i>
3.4.2	<i>Extração de RNA total</i>	<i>37</i>
3.4.3	<i>Síntese de cDNA</i>	<i>38</i>
3.4.4	<i>Escolha do gene constitutivo</i>	<i>39</i>
3.4.5	<i>Teste de Linearidade e Eficiência</i>	<i>40</i>
3.4.6	<i>PCR (expressão de RNAm)</i>	<i>40</i>
3.5	<i>Expressão Protéica por Imunohistoquímica</i>	<i>42</i>
3.5.1	<i>Obtenção de tecido cerebral para técnica de imunohistoquímica.....</i>	<i>42</i>
3.5.2	<i>Fixação do cérebro</i>	<i>42</i>
3.5.3	<i>Cortes coronais do tecido alvo.....</i>	<i>42</i>
3.5.4	<i>Técnica de imunofluorescência com dupla marcação</i>	<i>43</i>
3.5.5	<i>Microscopia Confocal.....</i>	<i>43</i>
3.6	<i>Análise dos resultados</i>	<i>44</i>
3.6.1	<i>Treinamento Físico</i>	<i>44</i>

3.6.2 Pressão Arterial e Frequência cardíaca.....	44
3.6.3 Expressão Gênica.....	44
3.6.4 Imunofluorescência.....	45
4 Resultados	47
4.1 Animais Experimentais e Evolução do Peso Corporal	47
4.2 Efeitos do T e S sobre o Desempenho dos Animais	47
4.3 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca Basal	50
4.4 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Expressão Gênica de OT, OTR e BDNF.....	52
4.4.1 Teste de Linearidade e Eficiência	52
4.4.2. Efeitos sobre a Expressão Gênica de OT e BDNF no PVN.....	53
4.4.3 Efeitos sobre a Expressão Gênica de OTR e BDNF no DBS	55
4.4.4 Efeitos sobre a Expressão Gênica de OTR e BDNF no VBS	57
4.5 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Imunorreatividade para OT e BDNF.....	59
4.5.1 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de OT e BDNF no PVN	59
4.5.2 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de BDNF no DBS	66
4.5.3 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de BDNF no VBS.....	69
5 Discussão	73
6 Conclusão	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 Introdução e Revisão de Literatura

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial, caracterizada por níveis elevados e mantidos da pressão arterial (PA), sendo o principal fator de risco para doenças arteriais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, doença coronariana crônica, doença arterial periférica e insuficiência renal (CHOBANIAN et al., 2003). No Brasil a hipertensão é um dos problemas de saúde pública de maior prevalência na população, que atinge aproximadamente 20% dos adultos e 50% dos idosos, acarretando inúmeras mortes por doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). Em 2007 as doenças cardiovasculares representaram 29,4% dos óbitos totais, sendo que deste valor 31,4% foi devido ao acidente vascular encefálico, 30% à doença isquêmica do coração, 12.8% à hipertensão arterial sistêmica e 25.1% à outras causas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Uma vez estabelecida, a hipertensão requer tratamento constante uma vez que a redução da pressão arterial (PA) de indivíduos hipertensos incide na diminuição da morbidade e mortalidade e uma melhora na qualidade de vida. Mediante tal situação inúmeros tratamentos, para controle dos níveis pressóricos, têm sido estudados. Atualmente são utilizados para o controle da hipertensão, diuréticos, vasodilatadores, simpatolíticos, beta-bloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio e de receptores de angiotensina, inibidores da enzima conversora da angiotensina e de renina (CHOBANIAN et al., 2003). Além destes tratamentos farmacológicos, mudanças no estilo de vida tem sido cada vez mais incluídas entre as terapias anti-hipertensivas. Tais mudanças incluem restrição na ingestão de sal, controle do peso corporal, restrição no consumo de álcool e, principalmente, prática regular de exercício aeróbio (PESCATELLO et al., 2004).

Recentemente análises de correlação entre atividade física diária e risco de comprometimento em hipertensos, demonstraram que, independente de gênero, quanto mais treinado o indivíduo menor é o risco de apresentar complicações advindas da hipertensão arterial (BARENGO et al., 2005). Sendo assim, o treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada (T) tem sido indicado como uma das primeiras condutas terapêuticas, podendo ser indicado isoladamente no caso de hipertensão limitrofe ou em associação com os tratamentos farmacológicos, auxiliando na redução dos níveis pressóricos de indivíduos

hipertensos com diferentes graus de severidade (CHOBANIAN et al., 2003; PESCATELLO et al., 2004). Deste modo, o TF está sendo considerado um importante coadjuvante na prevenção e tratamento da hipertensão arterial.

Embora não sejam conhecidos com precisão os mecanismos que modulam os efeitos benéficos do TF em hipertensos, é sabido que o TF promove redução da pressão arterial (PA) do homem e em diferentes modelos experimentais de hipertensão, como por exemplo os ratos espontaneamente hipertensos (SHR – *spontaneously hypertensive rats*) considerados o melhor modelo da hipertensão essencial do homem (AMARAL et al., 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003). No entanto, a redução da PA não é observada em normotensos treinados, que à semelhanças dos hipertensos também apresentam redução da frequência cardíaca (FC) de repouso e menor resposta taquicárdica ao exercício dinâmico (TIPTON, 1999; AMARAL et al., 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003). Deste modo a eficácia do TF em reduzir a PA de indivíduos hipertensos parece ser devida a sua capacidade de reverter os diferentes mecanismos que condicionam o desenvolvimento e a manutenção do quadro hipertensivo.

Dentre os mecanismos propostos para se justificar a queda da PA e a melhora da perfusão tecidual induzidas pelo TF em indivíduos hipertensos citam-se a redução da FC e do débito cardíaco (VERAS-SILVA et al., 1997), a diminuição da resistência muscular esquelética, que determina a redução da resistência periférica total (AMARAL et al., 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; AMARAL e MICHELINI, 2011), o aumento da sensibilidade à insulina (GAUTIER e MAUVAIS-JARVOIS, 2001), alterações do balanço entre fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio, com consequente alteração da reatividade muscular (VANHOUTTE, 1996), a indução da angiogênese capilar na musculatura esquelética, reduzindo a rarefação vascular característica da hipertensão (AMARAL et al., 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003), o remodelamento de arteríolas musculares esqueléticas determinando a normalização da razão parede/luz (AMARAL et al., 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; AMARAL e MICHELINI, 2011).

Além destes mecanismos periféricos o T de baixa intensidade também modifica o controle neural da circulação, favorecendo o tônus parassimpático ao coração (HIGA et al., 2002; BRAGA et al., 2002; HIGA-TANIGUCHI et al., 2009) e reduzindo

o tônus simpático ao coração e vasos (KRIEGER; DA SILVA; NEGRÃO, 2001; CERONI et al., 2009; MICHELINI e STERN, 2009). Este mecanismo é de particular interesse porque também pode contribuir para a instalação da bradicardia de repouso que caracteriza o TF tanto em indivíduos hipertensos quanto normotensos. O tônus parassimpático e simpático ao coração e vasos fazem parte do controle autonômico da circulação, e são gerados no sistema nervoso central e controlados momento a momento por mecanismos reflexos neurais.

1.1 Controle neural da PA e FC

A regulação neural dos parâmetros cardiovasculares funciona como um arco-reflexo envolvendo receptores, aferências, centros de integração, eferências e efetores, além de alças hormonais. As respostas cardiovasculares podem ser integradas em diferentes níveis do sistema nervoso central. Em particular, o hipotálamo e o bulbo estão muito envolvidos com o controle autonômico da circulação como esquematizado na Figura 1, e melhor detalhado a seguir.

No bulbo situam-se várias áreas importantes para o controle cardiovascular como o núcleo do trato solitário (NTS), as áreas rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM) e os núcleos ambíguo (NA) e núcleo motor dorsal do vago (DMV). O arco reflexo básico, ou alça primária do controle cardiovascular, consiste num circuito envolvendo essas áreas bulbares que são ativados por informações aferentes provenientes de receptores localizados periféricamente (barorreceptores arteriais, os principais responsáveis pelo controle tônico do sistema cardiovascular) integram continuamente essas informações e via vago e simpático, ajustam continuamente as respostas do coração e dos vasos de resistência e de capacitância. Os barorreceptores detectam e sinalizam ao SNC informações sobre flutuações instantâneas da PA que são direcionadas ao NTS no bulbo dorsal, o qual consiste na primeira área do sistema nervoso central a integrar informações cardiovasculares. Do NTS são projetados neurônios glutamatérgicos que excitam o DMV e NA (onde se localizam os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do parassimpático que se projetam ao coração) e o CVLM no bulbo ventrolateral que contém neurônios gabaérgicos que se projetam ao RVLM. Este constitui o principal grupamento de neurônios pré-motores simpáticos que se projetam para a coluna intermédio-lateral onde se localizam os neurônios pré-ganglionares simpáticos que

se projetam aos pós-ganglionares simpáticos, responsáveis pela inervação simpática para o coração e vasos.

Desta forma elevações momentâneas da PA determinam ativação do NA e DMV (aumentando o tônus vagal ao coração) e do CVLM (que inibe o RVLM e o tônus simpático ao coração e vasos) determinando bradicardia, redução do inotropismo, aumento da capacitância venosa e vasodilatação reflexas as quais condicionam a redução da PA, levando-a novamente a níveis controle. De forma oposta quedas momentâneas da PA por não ativarem o NA, DMV e o CVLM, resultam em aumento do tônus simpático e redução simultânea do vagal, determinando taquicardia, aumento do inotropismo, redução da capacitância venosa e vasoconstrição reflexa com elevação da PA que novamente retorna aos valores basais. Esta circuitaria neuronal constitui a alça bulbar ou primária de regulação reflexa da PA (Figura 1) (MICHELINI, 2008; MICHELINI e STERN, 2009).

Além das projeções bulbares, o NTS e o CVLM também se projetam para estruturas diencefálicas (núcleo pré-ótico mediano, núcleo paraventricular do hipotálamo - PVN - e núcleo supraótico - SON) levando informações periféricas a áreas centrais de integração envolvidas na modulação do controle cardiovascular e nos ajustes circulatórios a diferentes situações comportamentais (MICHELINI, 2008). O PVN integrando informações vegetativas, neuroendócrinas e comportamentais, é de grande importância para o controle cardiovascular, particularmente durante o exercício físico. O NTS, que se constitui na primeira estação sináptica dos aferentes periféricos, envia projeções ascendentes ao PVN, e também recebe vias descendentes provenientes de núcleos hipotalâmicos como o PVN. O circuito neural NTS → PVN → NTS (Figura 1) constitui a alça suprabulbar de modulação do controle autonômico do sistema cardiovascular, ou alça secundária de controle cujos mecanismos supra-bulbares de integração modulam o funcionamento da alça bulbar, ajustando eficientemente a circulação sanguínea em diferentes situações como, por exemplo, o exercício físico.

Informações aferentes que chegam ao NTS e ao CVLM ascendem à áreas suprabulbares por neurônios catecolaminérgicos (CATérgicos) os quais se projetam direta ou indiretamente aos neurônios magnocelulares do PVN e SON (SAWCHENKO e SWANSON, 1981; KALIA et al., 1985) que sintetizam e liberam vasopressina (VP) e ocitocina (OT) no plasma via neurohipófise. Um grande

contingente das fibras CATérgicas do NTS projetam-se a neurônios parvocelulares do PVN que também são VPérgicos e OTérgicos, mas se projetam diretamente ao NTS e outras áreas bulbares fechando um circuito de modulação autonômica (DAMPNEY, 1994; MICHELINI e MORRIS, 1999; MICHELINI, 2001). Projeções monossinápticas recíprocas entre NTS e PVN (SAWCHENKO e SWANSON, 1981, 1982; KALIA et al., 1985) fornecem substrato anatômico para um importante e pronto sistema de controle através do qual o PVN pode ajustar as respostas autonômicas do sistema cardiovascular. Fornecem ainda substrato anatômico para a interação entre os dois mecanismos básicos de controle cardiovascular durante o exercício (o “comando central” e o “comando reflexo da circulação”) (MITCHELL, 1990).

Figura 1. Representação esquemática de como o treinamento aeróbio induz ajustes plásticos & funcionais em áreas bulbares e suprabulbares, as quais facilitam controle autonômico da circulação durante o exercício.
Fonte: adaptado de Michelini e Stern, 2009.

1.2 Modulação exercida pelas projeções suprabulbares sobre alterações do tônus autonômico durante ajustes da resposta cardiovascular ao exercício dinâmico e/ou treinamento aeróbio

Vários estudos têm contribuído para o entendimento de como as alças de modulação bulbar e suprabulbar medeia os ajustes funcionais e adaptativos do

controle cardiovascular frente a alterações transitórias de PA durante o exercício. Trabalho pioneiro de Brum et al. (2000) demonstrou que o T facilita a sinalização aferente pelos barorreceptores, aumentando em normotensos e hipertensos a sensibilidade do nervo depressor aórtico durante alterações da PA. Outros trabalhos demonstraram a eficácia do T em alterar a atividade de neurônios pré-autonômicos vasopressinérgicos (VPérgicos) e ocitocinérgicos (OTérgicos) que se projetam do PVN ao NTS.

Em relação as projeções VPérgicas, observou-se que:

- têm efeito tônico sobre o funcionamento do reflexo barorreceptor cardíaco porque o bloqueio de receptores V_1 no NTS aboliu a bradicardia reflexa, mas nenhuma alteração do reflexo foi observada após administração do bloqueador V_1 no líquido céfalo-raquidiano do 4º ventrículo (VP atuante como neurotransmissor), evidenciando a especificidade do efeito da VP neuronal (MICHELINI e BONAGAMBA, 1988; MICHELINI, 1994, 1998);
- a administração de VP no NTS não alterou a sensibilidade do reflexo, mas deslocou o “set point” do reflexo para níveis mais elevados de pressão e frequência cardíaca, diminuindo a resposta bradicárdica. Observou-se que este efeito da VP era devido à redução da inibição simpática durante elevações transitórias da PA, (MICHELINI e BONAGAMBA, 1988; MICHELINI, 1994, 1998);
- em ratos normotensos sedentários e treinados observou-se durante exercício dinâmico aumento do conteúdo endógeno de VP especificamente na região dorsal do bulbo (DBS que abrange o NTS), sugerindo ativação das projeções VPérgicas a esta área (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI e MORRIS, 1999); observou-se também não haver após TF alteração da densidade de receptores V_1 no NTS, mas aumento da sensibilidade destes receptores ao agonista exógeno (SOUZA; MICHELINI; FIOR-CHADI, 2001);
- pré-tratamento do NTS com antagonista V_1 não alterou a resposta pressora mas determinou redução da taquicardia do exercício em ratos sedentários e treinados, com resposta de maior magnitude nos indivíduos treinados (DUFLOTH; MORRIS; MICHELINI, 1997; MICHELINI e MORRIS, 1999).

Com relação as projeções OTérgicas do PVN ao complexo NTS/DMV, observou-se em ratos normotensos que:

- o exercício dinâmico, aumentou o conteúdo endógeno de OT no DBS (que abrange o NTS e DMV), de ratos treinados sem nenhuma alteração significativa nos ratos sedentários, sugerindo ativação das projeções Otérgicas apenas nos indivíduos treinados (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);
- o pré-tratamento do NTS com antagonista de receptores de OT (OT_R) não alterou a resposta pressora, mas potencializou a taquicardia do exercício apenas nos ratos treinados, determinando redução da taquicardia do exercício, sem nenhuma alteração de PA ou FC após bloqueio dos OT_R ratos sedentários submetidos ao exercício dinâmico (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001). Estas observações confirmam que o T ativava mecanismos Otérgicos suprabulbares do controle da FC apenas nos indivíduos treinados;
- a administração exógena de OT no NTS determinou, nos grupos treinados e sedentários, redução significativa e similar da taquicardia do exercício, sugerindo que o treinamento não alterava receptores, mas apenas a disponibilidade do neurotransmissor (aumentada após treinamento) (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001);
- coerentemente, demonstrou-se haver após TF marcante aumento da imunorreatividade para a OT no DBS (NTS/DMV), indicando importante efeito do TF em alterar a plasticidade de vias Otérgicas descendentes do hipotálamo ao tronco cerebral (MARTINS et al., 2005);
- o efeito 'bradicardizante' da OT foi confirmado pela presença de bradicardia de repouso nos indivíduos treinados (MARTINS et al., 2005) e pela alteração da bradicardia reflexa subsequente à administração de OT ou de antagonista de OT no NTS: houve, respectivamente, aumento ou redução da resposta bradicárdica durante hipertensões transitórias, sem alteração da taquicardia reflexa a hipotensões transitórias (HIGA et al., 2002);
- a especificidade das sinápses Otérgicas ao NTS em mediar o controle reflexo da FC, uma vez que nenhuma alteração foi observada após administração de OT ou de seu antagonista no líquido céfalo-raquidiano do 4º ventrículo, excluindo seu efeito como neurohormônio, e, que a facilitação da resposta bradicárdica era determinada pelo aumento da atividade vagal ao coração, sem alteração do tônus simpático (HIGA et al., 2002).

1.3 Plasticidade Neuronal e T

Os dados anteriormente mencionados demonstraram que o TF, além dos efeitos periféricos, também é capaz de alterar em indivíduos normotensos a plasticidade e a funcionalidade de vias peptidérgicas descendentes do hipotálamo ao NTS (MICHELINI, 2007). Além disso, têm-se demonstrado que a hipertensão é acompanhada por alterações no controle central do sistema cardiovascular como a depressão da modulação OTérgica resultando em redução do tônus vagal ao coração (HIGA et al., 2002; MARTINS et al., 2005). Observações feitas originalmente em ratos normotensos treinados e sedentários, foram recentemente estendidas aos hipertensos. Demonstrou-se em SHR que o T também facilitava a ativação de projeções OTérgicas do PVN ao NTS durante o exercício dinâmico, propiciando redução da taquicardia do exercício. Estas respostas, no entanto foram de menor magnitude que as observadas nos grupos normotensos (HIGA-TANIGUCHI et al., 2009) mas, confirmavam em ambos os grupos a potencialidade do T em alterar a plasticidade das vias peptidérgicas centrais.

Vários estudos têm portanto, demonstrado a potencialidade do T em modificar as vias OTérgicas do PVN ao tronco cerebral, facilitando o controle autonômico da circulação (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001; MARTINS et al., 2005; MICHELINI, 2007; HIGA-TANIGUCHI et al., 2009).

Observou-se também que o T era eficaz em alterar funcionalmente não só as projeções descendentes do PVN, mas também as vias ascendentes do NTS ao PVN. O T acompanhado de aumento do número e da densidade de botões sinápticos noradrenérgicos (NORérgicos) em neurônios OTérgicos do PVN que se projetavam ao NTS, indicando aumento da sinalização aferente ao hipotálamo após T (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007) e confirmando sua potencialidade em alterar a plasticidade neuronal de toda a alça de modulação suprabulbar do controle autonômico do sistema cardiovascular.

Contudo as alterações plásticas/funcionais das vias OTérgicas foram observadas somente ao final do protocolo de treinamento aeróbio de baixa intensidade que geralmente se estende por 2 semanas. Faz-se necessária uma investigação mais detalhada destas alterações no decorrer de todo o protocolo experimental para a caracterização do perfil temporal das alterações plásticas do

sistema OTérgico central induzidos pelo TF em indivíduos normotensos e hipertensos. É também importante investigar se as alterações plásticas são específicas de alguma área de controle cardiovascular, se ocorrem em toda a alça de modulação, e se são ou não temporalmente coincidentes. Além disso, torna-se também importante determinar se há ou não simultaneidade entre a plasticidade neuronal e respostas funcionais induzidas pelo TF como bradicardia de repouso observada em normotensos e hipertensos possibilitando a correlação entre respostas funcionais e a ocorrência de alterações plásticas na alça de controle cardiovascular.

1.4 Neurotrofina BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *brain derived neurotrophic factor*) surgiu no âmbito da pesquisa como sendo um “instrumento chave” mediador da eficiência sináptica, conectividade e a plasticidade neuronal dependente de atividade (COTMAN e BERCHTOLD, 2002). O BDNF está envolvido em mecanismos de sobrevivência e crescimento de vários subtipos de neurônios e em sinalizações rápidas, como mudanças na excitabilidade neuronal, na transmissão sináptica e na plasticidade neural (VAYNMAN et al., 2003), regulando os níveis de RNAm de dois produtos finais importantes no funcionamento de neurônios: cAMP-response-element binding protein (CREB, que têm a habilidade de modificar a função neural regulando a transcrição de genes) e a synapsin-I, relacionado à transmissão sináptica (VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2003, 2004).

Neurotrofinas regulam o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação de neurônios. Além destes efeitos clássicos, que são relativamente lentos, as neurotrofinas também medeiam respostas rápidas que modulam uma variedade de funções celulares tais como excitabilidade da membrana, transmissão sináptica e atividade dependente de plasticidade sináptica. Essas ações rápidas são mediadas principalmente por receptores tirosina-cinase (TrK) com canais iônicos e ionotrópicos na membrana plasmática.

Além de ter função neurotrófica, alguns estudos sugerem que o BDNF atua também como um neurotransmissor devido as seguintes evidências (WANG e ZHOU, 2002): 1) o BDNF é sintetizado em qualquer corpo neuronal (neurônio central

ou periférico), e sua expressão é atividade dependente; 2) o BDNF é transportado anterogradamente do corpo celular para os terminais nervosos, onde são estocados em vesículas; 3) o BDNF pode ser liberado em resposta à despolarização induzida por potássio ou estímulo nervoso; 4) o BDNF pode despolarizar neurônios e desencadear potenciais de ação rápidos (em milisegundos) com ligação em receptores específicos; 5) apesar do BDNF não ser rapidamente inativado por enzimas, os receptores Trk-B das células da glia provavelmente sejam responsáveis pelo seu controle negativo, um mecanismo requerido para neurotransmissão clássica mediada por neurotransmissores.

Já foi descrito na literatura que o BDNF localiza-se em neurônios hipotalâmicos e do tronco cerebral envolvidos no controle cardiovascular uma vez que RNAm e proteína BDNF foram localizadas em neurônios do PVN e também em neurônios CATérgicos do tronco cerebral (KAWAMOTO et al., 1996; CHO et al., 1999; YAN et al., 1997). Sabe-se também que o pró-BDNF, o precursor de BDNF, é liberado no espaço extracelular para dar origem ao BDNF maduro, que então se liga ao receptor específico (TrkB, tirosina-cinase), localizado nos elementos pré e pós-sinápticos (KUIPERS e BRAMHMA, 2006). O BDNF atua nos neurônios que apresentam os receptores TrkB, para desencadear potenciais de ação (WANG e ZHOU, 2002). Sugere-se também que o BDNF atua nos receptores TrkB de alta afinidade, expressos na maioria dos neurônios simpatoexcitatórios para modular, via mecanismos autonômicos centrais, o tônus simpático regulando a função cardiovascular (WANG e ZHOU, 2002).

O BDNF pode ser sintetizado e armazenado por neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos (KOHARA et al., 2001) e liberado de maneira atividade-dependente de dendritos e axônios terminais, sugerindo que esse atue como mensageiro sináptico de plasticidade atividade-dependente (HARTMANN; HEAMANN; LESSMANN, 2001). O modo de ação das neurotrofinas parece ser dependente de sua própria atividade, como em um *feed back* positivo com a própria proteína (BLUM e KONNERTH, 2004).

A interação da atividade neuronal e de neurotransmissores controla a expressão do gene para o BDNF; muitos interneurônios modulatórios (GABAérgicos) que fazem sinápsse com os neurônios glutamatérgicos podem afetar a expressão do BDNF. No entanto, o BDNF também pode modular funções de outros

neurotransmissores, é sugerido que o BDNF atue como um neuromodulador fisiológico que funciona como coadjuvante dos neurotransmissores (WANG e ZHOU, 2002). Estudos recentes têm demonstrando a participação do BDNF em neurônios tanto glutamatérgicos quanto GABAérgicos (TANAKA; SAITO; MATSUKI, 1997; BEM-ARI et al., 2007; FIORENTINO et al., 2009; BETLEY et al., 2009).

Outros estudos demonstraram que o BDNF promove efeitos distintos nos potenciais inibitórios pós-sinápticos dependendo do tipo celular no pós-sináptico. Em sinapses entre neurônio inibitório → excitatório, o BDNF diminui a amplitude destes potenciais, aparentemente pela redução da liberação de GABA pelo terminal pré-sináptico. Por sua vez, em sinapses entre neurônio inibitório → inibitório o BDNF altera a amplitude dos potenciais para valores mais positivos pela regulação da atividade do co-transportador K^+/Cl^- , o que sugere a ação do BDNF em diminuir a eficiência da transmissão inibitória (WARDLE e POO, 2003). Parece, portanto, que o BDNF atua potencializando tanto respostas glutamatérgicas (excitatórias) quanto GABAérgicas (inibitórias), porém por diferentes mecanismos demonstrado por Bolton et al. (2000).

Apesar dos mecanismos atividade-dependente no SNC terem um papel central na determinação dos níveis de RNAm de BDNF durante a atividade física fatores periférico iniciam uma cascata de fatores de crescimento no cérebro que pode alterar os mecanismos de plasticidade, a exemplo do IGF-1, um possível mediador da regulação gênica do BDNF (COTMAN e BERCHTOLD, 2002).

Estudos com experimentação animal e exercício voluntário repetitivo demonstraram que o aumento de RNAm e da proteína de BDNF no hipocampo, é modulado pela intensidade do exercício (ADLARD et al., 2004). Também foi observado após T aumento da expressão do BDNF e dos níveis de TrkB, sugerindo que o T pode promover um sistema de *feed back* positivo facilitando os efeitos do BDNF na plasticidade sináptica. Demonstrou-se ainda que o T aumentava os níveis de RNAm BDNF, bem como de outros marcadores de plasticidade neuronal como a proteína CREB e synapsin I, que têm a habilidade de modificar a função neuronal regulando a transcrição de genes e afetando a transmissão sináptica, respectivamente (VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2003).

Em conjunto estas observações sugerem que o BDNF, uma importante neurotrofina na regulação da estrutura e função sináptica, pode ser utilizado como

um indicador específico de plasticidade em vias centrais de controle cardiovascular durante o T.

Desta forma é nossa hipótese de trabalho que ao analisarmos nas mesmas áreas, nos mesmos tempos experimentais, a expressão simultânea de BDNF e de OT ou OTR, possamos caracterizar as alterações seqüenciais de plasticidade em vias OTérgicas centrais induzidas pelo T.

2 Objetivos

Frente às evidências experimentais citadas e utilizando o BDNF como um indicador de plasticidade neuronal dependente de atividade, buscamos no presente trabalho identificar em normotensos e hipertensos as alterações seqüenciais na expressão de BDNF, OT e OTR induzidas pelo T em diferentes áreas do controle cardiovascular associando as repercussões funcionais ao T. Foram objetivos específicos deste projeto, utilizando WKY e SHR sedentários (S) e treinados (T):

- 1) avaliar os efeitos sequenciais do TF sobre os valores basais de PA e FC (estudos funcionais) ao longo do tempo;
- 2) investigar ao longo dos protocolos de treinamento ou sedentarismo a expressão de RNAm de BDNF e OT no hipotálamo (PVN – área biossintética), e BDNF e OTR em áreas bulbares de projeção (DBS e VBS) utilizando a técnica de PCR em tempo real;
- 3) identificar ao longo dos protocolos de treinamento ou sedentarismo a presença e quantificar o conteúdo das proteínas BDNF e OT nas áreas biossintética e de projeção utilizando a técnica de imunofluorescência.

3 Material e Métodos

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade pesando entre 200-250 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Metade dos animais era da linhagem Wistar-Kyoto (WKY), que são animais normotensos, e a outra metade da linhagem SHR. Os animais foram alojados no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22° e 25 °C), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e alimentação. Os animais foram pesados semanalmente para acompanhar o ganho ou perda de massa corpórea. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com o Manual Institucional para Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Bioética do ICB (registrado sob nº057 na folha 57 do livro 02 para uso de animais em experimentação).

3.2 Treinamento Físico

O treinamento foi feito em esteira ergométrica (Inbramed, millenium) adaptada para ratos, com 10 raias de acrílico transparente, pintadas em sua porção frontal de preto (ambiente para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de corrida).

3.2.1 Adaptação

Duas semanas iniciais foram destinadas ao período de adaptação. A primeira semana serviu à adaptação ao novo ambiente (Biotério do Departamento de Fisiologia Cardiovascular), e a segunda à corrida na esteira (cinco sessões de 0,4-0,7 km/h, 0% inclinação, 10 minutos/dia). Os animais considerados inaptos a andar/correr na esteira foram excluídos do protocolo.

3.2.2 Teste de Esforço Máximo

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi medida individualmente através do teste de esforço máximo. O teste consiste em identificar a velocidade e tempo máximo que cada animal consegue correr, até a exaustão, na esteira ergométrica. O teste teve início com 0,3 km/h, sendo acrescentados a cada 3 minutos mais 0,3 km/h até a exaustão do animal (Quadro 1).

Quadro 1. Tabela de dados para realização do teste de esforço máximo, correlacionando o tempo da corrida com a velocidade.

Tempo de corrida	Velocidade
0 – 3 min	0,3 km/h
3 min 1 s – 6 min	0,6 km/h
6 min 1 s – 9 min	0,9 km/h
9 min 1 s – 12 min	1,2 km/h
12 min 1 s – 15 min	1,5 km/h
15 min 1 s – 18 min	1,8 km/h
18 min 1 s – 21 min	2,1 km/h

Cada animal realizou o teste de esforço 3 vezes durante o protocolo experimental. A primeira vez no início do protocolo de treinamento foi utilizada para determinar a capacidade aeróbia de cada animal, permitindo alocar-se animais com igual desempenho aos grupos experimentais (sedentário e treinado, descritos a seguir) e para se determinar a intensidade do treinamento. O segundo teste máximo foi realizado após a 4ª semana de treinamento para se determinar nova capacidade máxima e readaptar-se o protocolo de TF. O terceiro teste, foi realizado ao final do experimento (8 semanas) para a comparação do desempenho entre os grupos e para quantificar a eficácia do treinamento nos grupos normotensos e hipertensos.

Os animais dos grupos sedentários foram mantidos por período equivalente ao TF e colocados uma vez por semana na esteira por 5 minutos a 0,4-0,7 km/h, para manter a adaptação ao manuseio, à esteira e corrida. Estes também realizaram teste de esforço máximo nos mesmos períodos que os animais treinados.

3.2.3 Grupos Experimentais

WKY e SHR foram divididos em 2 grupos: sedentários (S) e treinados (T). Como o objetivo do presente trabalho foi avaliar os perfis temporais de expressão de RNAm e proteína de OT, OTR e BDNF em diferentes áreas de modulação do controle autonômico, vários subgrupos de S e T serão formados: S₀ – animal sedentário no início do protocolo experimental; S₈ – animal sedentário no final do protocolo experimental (8 semanas); T₁ – animal após 1 semana de treinamento; T₂ – animal após 2 semanas de treinamento; T₄ – animal após 4 semanas de treinamento; T₈ – animal após 8 semanas de treinamento. Serão formados, portanto, 12 subgrupos experimentais (Quadro 2):

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

Grupo 1 (n=13): WKY S ₀	Grupo 7 (n=13): SHR S ₀
Grupo 2 (n=13): WKY T ₁	Grupo 8 (n=13): SHR T ₁
Grupo 3 (n=13): WKY T ₂	Grupo 9 (n=13): SHR T ₂
Grupo 4 (n=13): WKY T ₄	Grupo 10 (n=13): SHR T ₄
Grupo 5 (n=13): WKY T ₈	Grupo 11 (n=13): SHR T ₈
Grupo 6 (n=13): WKY S ₈	Grupo 12 (n=13): SHR S ₈

3.2.4 Protocolo de Treinamento Físico de Baixa Intensidade

O protocolo de TF de baixa intensidade (50 – 60% da carga máxima atingida no teste de esforço) envolve um programa de exercício repetitivo realizado durante uma hora ao dia, cinco dias por semana durante 8 semanas. A intensidade escolhida (50 – 60% da velocidade máxima) tem sido indicada como a intensidade ideal para a obtenção de efeitos benéficos do treinamento sobre o sistema cardiovascular de hipertensos, como a redução da pressão e remodelamento de arteríolas (MELO et al., 2003). A intensidade do exercício foi aumentada gradativamente pela combinação da velocidade e duração do exercício até atingir a intensidade estabelecida.

3.3 Canulação Arterial e Registro Direto da PA e FC

Nos períodos previamente definidos (S_0 , T_1 , T_2 , T_4 , T_8 e S_8) os animais foram conduzidos à sala de Cirurgia do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para registro da PA e da FC. Para tal foram inseridas cânulas na artéria femoral, implantadas 24 horas antes da realização dos experimentos funcionais.

Para canulação arterial os animais foram previamente anestesiados com 100 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina. Para a realização das cirurgias foram utilizados procedimentos assépticos e lupa cirúrgica (Surgical Microscope – DFV – M90), com os animais mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37 °C). Foram realizadas tricotomia da região interna do membro posterior esquerdo e cervical. Através de incisão na altura da articulação coxo-femoral foi localizado o tronco vâsculo-nervoso e isolada artéria femoral onde foi introduzida e afixada a cânula de Tygon (0,028 mm de diâmetro interno) preenchida com solução fisiológica heparinizada (20 UI/ml). A extremidade foi exteriorizada através do espaço subcutâneo na região cervical e fixada com fio de algodão. Após realização dos procedimentos cirúrgicos os animais receberam dosagens adequadas de analgésico e antibiótico.

A PA e a FC basais foram registradas com o animal acordado e com livre movimentação, na própria gaiola, por 40 minutos, pelo menos 24 horas depois dos procedimentos cirúrgicos. A cânula arterial foi conectada ao sistema de registro (transdutor / pré-amplificador e Biotach Gould/ polígrafo Gould 3400 e/ou computador + placa de conversão A-D) e após estabilização dos parâmetros cardiovasculares, os valores basais de PA e FC foram obtidos.

A cânula arterial foi conectada a um tubo de polietileno (PE-100) e este a um transdutor eletromagnético (Statham, modelo P23Dd, Hato Rey, Puerto Rico) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier, Stemtech, Inc., USA). O sinal analógico do pulso de pressão arterial foi convertido para digital através de uma placa de conversão analógico-digital de 10 bits (Stemtech, Inc., USA) e em seguida, foi registrado batimento-a-batimento com uma frequência de amostragem de 2000 hertz por canal através do programa de aquisição de sinais biológicos (WINDAQ™ Waseform Browser, versão 2.19, DataQ Instruments, Inc.,

Akron, Ohio, USA). A frequência cardíaca foi derivada do intervalo de pulso da pressão arterial, batimento a batimento.

Os registros funcionais dos animais do grupo S ocorreram no início (S_0) e no final (S_8) do protocolo (controle temporal) e os dados dos animais do grupo T foram coletados com 1, 2, 4 e 8 semanas de treinamento (T_1 , T_2 , T_4 e T_8) (efeito do TF).

3.4 Técnica de PCR em Tempo Real

3.4.1 Obtenção de tecido cerebral

Após os registros funcionais (7-8 animais/grupo experimental) os animais foram novamente anestesiados para perfusão cerebral (solução salina estéril e tamponada). Foi feita uma incisão transversal no abdômen próximo ao diafragma, seguida de incisão do diafragma e costelas para acesso à cavidade torácica. O conjunto externo e costelas foi rebatido cranialmente, expondo o coração. Um cateter foi introduzido no ápice do ventrículo esquerdo até a emergência da aorta; em seguida uma pequena incisão no átrio direito foi feita para saída do sangue. A perfusão (Bomba Dosadora Peristáltica, Indústria Brasileira Milan) foi realizada com solução salina (~5 min) sob pressão, com valor semelhante ao registrado no animal consciente.

O animal foi então decapitado para rápida retirada do cérebro, que foi imediatamente transferido para uma “placa de petri” forrada com papel filtro, umedecida com solução salina e resfriada com gelo seco, para se evitar a ação de RNases. Após o congelamento do cérebro foram feitas fatias coronais (800-1000 μ m de espessura) do tronco cerebral e do hipotálamo. Feita a identificação do núcleo de interesse as regiões dorsal (DBS - referência anatômica o calamus scriptorius), e ventral do tronco cerebral (VBS - referência anatômica o núcleo ambíguos), e PVN do hipotálamo (referências anatômicas o quiasma óptico e terceiro ventrículo), foram removidos - “punches” com agulha romba (gauge 20”) de modo a padronizar o volume de cada amostra (~2,5 μ g) - além de se fazer uma melhor delimitação do núcleo de interesse (Figura 2). Cada núcleo de interesse foi armazenado em eppendorf previamente autoclavado e identificado contendo 500 μ l de TRIzol®

(Invitrogen Brasil, Cat. No. 15596-026), e imediatamente acondicionados em gelo seco. Após coleta as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Figura 2. Regiões de interesse núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), parte dorsal do tronco encefálico (DBS) e parte ventral do tronco encefálico (VBS).
Fonte: Paxinos e Watson, 1997.

3.4.2 Extração de RNA total

Todas as amostras coletadas tiveram RNA total extraído utilizando o protocolo do TRIzol[®] Reagent seguindo o manual do fabricante. O TRIzol[®] é um reagente comercial à base de fenol com a propriedade de lisar as células, estabilizar e proteger o RNA de enzimas presentes na própria célula.

As amostras foram retiradas do freezer -80 °C somente no momento da extração sendo sempre mantidas em gelo. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando-se pistilos de material plástico cujo formato combina perfeitamente com o formato do fundo do eppendorf. A mistura resultante foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e a seguir acrescida de 0,2 ml de clorofórmio (CHCl₃) por ml de Trizol para desproteinização (fase de separação). O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (fase de precipitação), lavado com etanol 75% (fase de lavagem) e dissolvido com H₂O ultra-pura previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01% (fase de diluição). O RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro ("Ultrospec 3100 pro", UV/Visible Spectrophotometer) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.4.3 Síntese de cDNA

Amostras de 2 µg de cada RNA total tratadas com DNase I, Amplification Grade (Cat. No. 18068-015, Invitrogen™) seguindo o protocolo padrão do fabricante foram submetidas à reação de transcrição reversa (kit “ImProm-II™ Reverse Transcriptase” - Cat. No. #A3802, Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O uso da DNase teve por objetivo eliminar qualquer contaminação das amostras com DNA genômico.

Primeiramente as amostras foram tratadas com DNase I. A DNase é uma enzima que digere o DNA genômico e muito utilizada no tratamento de amostras que requerem o RNA puro para posteriores análises. O uso da DNase teve por objetivo eliminar qualquer contaminação que as amostras pudessem ter com DNA genômico. Para a primeira etapa do tratamento com DNase foram acrescentados num tubo de 500 µL o volume predeterminado pela biofotometria de RNA total, 1 µL de tampão da enzima DNase I, 1 µL da própria enzima DNase I, e foi completado volume final para 10 µL com água DEPC. Esta solução foi então levada ao termociclador para o programa de 15 minutos a 25 °C.

Como o processo de transcrição reversa objetiva produzir uma fita complementar ao RNA molde dando origem a uma cópia de DNA (cDNA), é de extrema importância, que após a ação da DNase se faça a inibição da mesma. Do contrário a enzima passaria a degradar também as estruturas de interesse e não somente o contaminante. Para a inibição da DNase foi acrescentado 1µL de EDTA, ácido etilenodiaminotetracético, um agente quelante que inibe a atividade da DNase por quelar os íons Mg^{2+} . A solução foi então novamente ao termociclador por 10 minutos a 65 °C.

Para dar início à transcrição reversa, inicialmente foram acrescentados 1µL de primers randômicos (146 ng) (Random Primers, No Cat. 48190-011, Invitrogen™) à solução anteriormente formada. Estes primers randômicos são na maioria das vezes hexâmeros de oligodesoxiribonucleotídeos que se combinam a fita simples de RNA para que a enzima Transcriptase Reversa reconheça um sítio de início de transcrição. As soluções então foram levadas ao termociclador por 5 minutos a 70 °C, e colocadas em gelo por mais 5 minutos, para a adição de solução tamponante, $MgCl_2$, ImpronII (transcriptase reversa), RNaseOUT™ (Recombinant Ribonuclease

Inibitor, No.Cat. 10777-019, Invitrogen™) de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - No Cat. 10297-018, Invitrogen™). Os desoxirribonucleotídeos fosfatados dNTPs são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina): dATP (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada) e dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada). Novamente a solução foi levada ao termociclador por 5 minutos a 25 °C, seguido de 60 minutos a 42 °C, e 15 minutos a 70 °C. Terminada a reação as amostras foram devidamente armazenadas a -20 °C.

3.4.4 Escolha do gene constitutivo

O gene endógeno, ou constitutivo, é um gene expresso continuamente e em todas as células do organismo. Para o presente estudo foi utilizado um gene cuja expressão não se alterou com o tempo, com a atividade física e com a hipertensão. Em experimento piloto foram selecionadas 4 amostras cujas quantificações obtidas de RNA total foram semelhantes. Cada amostra possuía uma variante diferente do experimento: animal normotenso sedentário no início do experimento (WKY S₀), animal normotenso treinado do final do experimento (WKY T₈), animal hipertenso sedentário no início do experimento (SHR S₀) e animal hipertenso treinado ao final do experimento (SHR S₈). Os genes constitutivos utilizados para o teste foram o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), a ubiquitina (UBC), a β -2 microglobulina (β 2m) e a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT).

Os resultados de Ct obtidos pela reação de PCR em tempo-real para os genes constitutivos foram feitos pelo software “geNorm VBA applet for Microsoft Excel” que determina o gene de referência mais estável dentre um grupo de genes testados para um mesmo grupo de amostras. Os princípios matemáticos utilizados para a construção deste software foram descritos por Vandesompele et al. (2002).

Após análise neste software o gene testado que apresentou menor variação perante os tratamentos do presente estudo foi a Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT ou HGFRT), sendo o escolhido como gene endógeno.

3.4.5 Teste de Linearidade e Eficiência

Para determinar a linearidade e eficácia das reações de PCR, foram realizados testes com todos os primers de interesse (HPRT, OT, OTR e BDNF) para todas as regiões analisadas (PVN, DBS e VBS).

Uma amostra teste de cDNA de cada uma das regiões estudada, foi diluída serialmente (1:1, 1:5, 1:10 e 1:20) para realização da PCR em tempo real. A linearidade foi calculada com base nos Cts de amplificação das diluições em série. Para que uma reação seja considerada linear é esperado que R^2 seja o mais próximo de 1. Garantida a linearidade da reação foi determinada a quantidade de cDNA necessária para uma reação de PCR, além de informar a gama de concentrações que o rendimento da reação de PCR foi similar indicando que diferentes concentrações de RNAm podem ser analisados numa mesma PCR (DUSSAULT e POULIOT, 2006).

Em teoria é esperado que a cada ciclo de amplificação cada amplicon seja duplicado. No entanto, na realidade este resultado depende da eficiência em cada ciclo de amplificação. Deste modo os valores de Ct obtidos após PCR das amostras em diluições seriadas também prestaram ao cálculo da eficiência da reação para cada gene estudado, utilizando a fórmula: $Eff = [10^{(-1/inclinação)}] - 1$. Sendo assim, os valores ideais para inclinação e eficiência são -3,322 e 1, respectivamente.

3.4.6 PCR (expressão de RNAm)

A expressão do RNAm do BDNF e OT(R) foi estimada mediante PCR quantitativo em tempo real. A técnica de PCR em tempo real é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em cada ciclo. Para tal foi utilizada a técnica de coloração "SYBR Green" que segue o princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) que emite sinal de fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita, utilizando o kit Platinum® SYBR®green qPCR Super Mix-UDG (Cat. No. 11733-038, Invitrogen™). Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante: 12,5 µL Platinum Mix, 10,5 µL água DEPC, 0,5 µL de primer forward e 0,5 µL de primer reward e por fim, 1 µL de amostra.

Em todas as reações foram realizadas desnaturações iniciais a 95 °C por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (60 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s), seguindo para a curva de dissociação (95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto).

Os primers utilizados para estimar a expressão gênica de HPRT, OT, OTR e BDNF estão listados na Quadro 3 abaixo com os respectivos tamanhos (em pares de bases) de cada produto de PCR (amplicon). Os primers foram desenhados de modo a garantir especificidade da molécula estudada, além da qualidade do próprio par de primers selecionado. A posição dos primers utilizados neste estudo, com exceção do primer para BDNF, foram desenhados de forma a garantir que na sequência do amplicon existisse pelo menos um intron (região específica de DNA genômico que não faz parte da sequência estudada de RNAm), o que garantiu que mesmo havendo contaminação de alguma amostra com DNA genômico um par de primers não seria eficiente em amplificar tal sequência que compreenderia um fragmento muito maior do que o esperado.

Quadro 3. Sequência dos primers para HPRT, OT, OTR e BDNF utilizadas no experimento, designadas respectivas temperaturas de anelamento dos primers (TM) e tamanho do fragmento (pader de base) originado após PCR (amplicon).

gene	Referência	primers	TM	amplicon
HPRT	NM_012583.2	F: 5'-3' TTTGCTGACCTGCTGGATTAC R: 5'-3' ACTTTTATGTCCCCCGTTGA	53	125
			51	
OT	NM_012996.2	F: 5'-3' TAGACCTGGATATGCGCAAG R: 5'-3' CTCGGAGAAGGCAGACTCAG	51	272
			54	
OTR	NM_012871.2	F: 5'-3' ATCGTGTGCTGGACACCTTT R: 5'-3' AAGAGCATGGCAATGATGAA	54	98
			50	
BDNF	NM_012513.3	F: 5'-3' CCTACCCAGCTGTGCGGACC R: 5'-3' CAGGGACGTCGTCGTCAGACC	59	86
			59	

3.5 Expressão Protéica por Imunohistoquímica

3.5.1 Obtenção de tecido cerebral para técnica de imunohistoquímica

Após os registros funcionais 4-5 animais/grupo experimental foram destinados à imunohistoquímica para identificação, localização das proteínas BDNF e OT em tecido cerebral. Os animais foram anestesiados e perfundidos como descrito no item 3.4.a do projeto proposto, com exceção do fluido de perfusão, que para fixação foi utilizado primeiramente tampão fosfato-salino (PBS: 150-200ml, pH 7,4), seguido do fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato a 0,01 M, ~350 ml - PFD). Em seguida, os animais foram decapitados para remoção do cérebro.

3.5.2 Fixação do cérebro

Os cérebros foram pós-fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 (PB) por 4 horas a 4 °C e depois crioprotégidos em sacarose 30% em PBS a 4 °C por 2-3 dias. Os cérebros foram separados entre prosencéfalo e tronco encefálico e armazenados a -80 °C até a realização dos experimentos de imunohistoquímica.

3.5.3 Cortes coronais do tecido alvo

Os blocos correspondentes ao hipotálamo e tronco cerebral foram montados no pedestal do criostato (Leica, CM 3050, Germany), com auxílio de gel apropriado (Tissue Freezing Medium – TBS), para obtenção de cortes sequenciais de 30 µm abrangendo toda a extensão dos núcleos de interesse: PVN 1,3 a 2,3 mm do bregma; NTS: 13,6 a 14,3 mm; RVLM 11,6 a 13,2 mm (PAXINOS e WATSON, 1986). Os cortes coronais foram coletados em diferentes poços de placa de cultura contendo PBS a 0,01M e a seguir, processados para imunofluorescência.

3.5.4 Técnica de imunofluorescência com dupla marcação

Inicialmente foi realizada incubação dos cortes em soro equino 10% (Normal Horse Serum, Cat.No. S-2000, Vector Laboratories Inc.) por 1 hora com o objetivo de reduzir ligações inespecíficas. Após três lavagens com PBS 0,01M de 10 minutos, os cortes foram incubados com anticorpos-primários anti-BDNF (1:500) (Rabbit polyclonal to BDNF, Cat.No. ab6201, Abcam Inc.) durante 44 horas (24 horas à temperatura ambiente + 20 horas a 4 °C). Após três lavagens de 10 minutos com PBS 0,01M os cortes foram incubados com anticorpo secundário Cy3 (1:250) (CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L), Cat.No. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) durante 4 horas à temperatura ambiente. Após 3 outras lavagens com PBS 0,1M os cortes foram então incubados com anti-OT (1:10000) (Guinea pig anti-Oxytocin, Cat.No. T-5021(GHC8152), Peninsula Laboratories Inc Division of Bachem) por 20 horas a 4 °C. Após três lavagens de 10 minutos com PBS 0,01M os cortes foram incubados com anticorpo secundário AMCA (1:100) (AMCA-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L), Cat.No. 706-155-148, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) durante 4 horas a temperatura ambiente. Após 3 outras lavagens com PBS 0,1M os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas (0,5% de gelatina de pele bovina e 0,05% de CrK(SO₄)). As lâminas montadas foram secas ao ar livre em ambiente escuro. A montagem foi realizada com meio de montagem (VECTASHIELD® Mounting Medium, Cat.No. H-10000, Vector Laboratories Inc.) e lamínula, evitando-se a formação de bolhas.

3.5.5 Microscopia Confocal

As imagens foram capturadas em microscópio confocal, com aumento 182x. Foram padronizados para todas as imagens adquirir nos primeiros 10 µm do tecido 6 secções com intervalo de 1 µm entre cada secção. A excitação do laser utilizado para identificar a marcação feita com anticorpo secundário CY3 foi de 488 nm, enquanto que para identificar a marcação feita com anticorpo secundário AMCA foi de 633 nm.

3.6 Análise dos resultados

3.6.1 Treinamento Físico

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM padrão. Para análise dos dados obtidos com o teste de esforço máximo foi realizado ANOVA fatorial, para medidas repetidas no tempo, seguido pelo pós-teste de Ficher LSD. Para análise do ganho de capacidade física foi realizado ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Ficher LSD. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o software STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc.).

3.6.2 Pressão Arterial e Frequência cardíaca

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM padrão. Para analisar o efeito de tempo (idade), dos dados de PA e FC obtidos em S_0 e S_8 , foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo estes fatores o tempo (0 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Ficher LSD. Para analisar o efeito do T ao longo do tempo, os dados de PA e FC obtidos entre T_0 e T_8 , foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tempo (0, 1, 2, 4 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Ficher LSD. Para analisar os efeitos do T ao final do protocolo em relação ao sedentarismo, os dados de PA e FC obtidos em S_8 e T_8 , foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tratamento (S e T) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Ficher LSD. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o software STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc.).

3.6.3 Expressão Gênica

Para quantificação relativa dos resultados do PCR em tempo real, foi utilizado o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) para análise da eficiência a curva de amplificação individual de cada reação. A análise foi realizada de acordo com Schefe (2006) para o cálculo da $Ef^{\Delta\Delta CT}$, onde a média do grupo WKY S_0 de cada gene estudado por região analisada, foi utilizada como calibrador e igual a 100%.

Para analisar o efeito de tempo (idade), dos dados de expressão gênica obtidos em S₀ e S₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo estes fatores o tempo (0 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Fischer LSD. Para analisar o efeito do T ao longo do tempo, os dados de expressão gênica obtidos entre T₀ e T₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tempo (0, 1, 2, 4 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Fischer LSD. Para analisar o efeito do T em relação ao sedentarismo, os dados de expressão gênica obtidos em S₈ e T₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tratamento (S e T) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Fischer LSD. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o software STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc.).

3.6.4 Imunofluorescência

A imunorreatividade a OT e BDNF foi realizada de acordo com Higa-Tanigushi et al. (2007) e Biancardi, Campos e Stern (2010), quantificada pela mensuração de intensidade medida em unidades arbitrárias [(média da variação de tonalidade de pixels dentro da área de interesse – média da variação de tonalidade de pixels dentro da área de background)/número de neurônios] e densidade medida em porcentagem [(número de pixels que estão acima do limiar de detecção/número de pixels dentro da área de interesse)×100], dentro de uma área fixa sobreposta a cada região de interesse (PVN caudal, NTS e RVLM). O software utilizado para as análises de imagens foi o ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os pontos analisados foram escolhidos de acordo com os resultados previamente obtidos na quantificação de expressão relativa dos genes de interesse.

Para analisar o efeito de tempo (idade), dos dados de imunorreatividade obtidos em S₀ e S₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo estes fatores o tempo (0 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Fischer LSD. Para analisar o efeito do T ao longo do tempo, os dados de imunorreatividade obtidos entre T₀ e T₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tempo (0, 1, 2 e 8 semanas) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de Fischer LSD. Para analisar o efeito do T em relação ao sedentarismo, os dados de imunorreatividade obtidos em S₈ e T₈, foi realizado ANOVA de dois fatores, sendo os fatores o tratamento (S e T) e a condição (WKY e SHR), seguido pelo pós-teste de

Ficher LSD. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o software STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc.).

4 Resultados

4.1 Animais Experimentais e Evolução do Peso Corporal

Foram estudadas duas linhagens de ratos, uma normotensa (WKY) e outra hipertensa (SHR) que foram subdivididos em grupos treinados (T) e sedentários (S). Os protocolos experimentais propriamente ditos, iniciaram-se quando os animais tinham em torno de dois meses e meio de idade e quando os SHRs já tinham a hipertensão estabelecida; a duração do T foi de 8 semanas durante as quais os animais (WKY_T, WKY_S, SHR_T e SHR_S) tiveram o peso mensurado semanalmente.

Figura 3. Ganho de peso ao longo do protocolo experimental de treinamento físico (8 semanas) dos grupos WKY e SHR sedentários e treinados. *diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao sedentário correspondente

No início do protocolo observou-se diferença de peso dos animais (279 ± 7 e 232 ± 7 g em S₀, para WKY e SHR respectivamente; $p<0,0001$), sendo os SHR mais leves. O ganho ponderal durante os protocolos S e T foi similar para todos os grupos exceto os WKY_S. Os dados referentes ao ganho ponderal entre o início e fim dos protocolos são apresentados na Figura 3: observou-se diferença ($p<0,05$) entre T e S somente nos WKY, sendo os animais treinados os que apresentaram ao longo do treinamento menor ganho de peso corpóreo.

4.2 Efeitos do T e S sobre o Desempenho dos Animais

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada individualmente através de protocolo de teste esforço máximo escalonado em esteira ergométrica. Antes do início dos protocolos experimentais os grupos WKY e SHR apresentavam capacidades máximas distintas ($p<0,001$), ou seja, os WKY apresentavam menor

capacidade física ($1,11 \pm 0,04$ km/h) que os SHR ($1,59 \pm 0,05$, Figura 4), uma diferença de 43%. Devido à divisão homogênea dos animais entre os grupos sedentários e treinados, tanto SHR quanto WKY partiram de um mesmo nível de capacidade física (WKY_T : $1,11 \pm 0,03$ Km/h e WKY_S : $1,11 \pm 0,04$ Km/h; SHR_T : $1,63 \pm 0,04$ Km/h e SHR_S : $1,59 \pm 0,05$ Km/h, Tabela 1).

Figura 4. Velocidade (km/h) atingida no primeiro teste máximo de animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). *diferença estatística ($p < 0,05$).

Ao longo do treinamento tanto os SHR quanto os WKY apresentaram um aumento significativo da velocidade máxima nas semanas 4 e 8, sendo que no último teste atingiram as seguintes velocidades: SHR_T : $2,34 \pm 0,09$ Km/h; WKY_T : $1,85 \pm 0,07$ Km/h (Tabela 1). Por outro lado no grupo WKY_S não houve alteração significativa da capacidade máxima como observado no ultimo teste (WKY_S : $0,97 \pm 0,07$ Km/h), mas se observou nos SHR_S redução de desempenho (já aparente no segundo teste) com os animais atingindo a velocidade de $1,09 \pm 0,08$ Km/h.

A Figura 5A ilustra a evolução temporal de desempenho em esteira nos WKY e SHR sedentários e treinados. Observa-se que ambos os grupos treinados tiveram desempenho similar ao longo de todo o protocolo experimental. Por outro lado houve manutenção do desempenho dos WKY_S , mas pequena queda nos SHR_S .

Foi também calculado o ganho de capacidade física, determinado pela diferença entre velocidade máxima atingida na 8ª semana e a semana zero, indicativo da eficiência do treinamento físico (Tabela 1; Figura 5B). Houve aumento significativo em ambos os grupos treinados (SHR_T : $+0,54 \pm 0,08$ Km/h e WKY_T : $+0,58 \pm 0,07$). Os WKY_S não apresentaram alteração significativa ($-0,15 \pm 0,07$ Km/h), enquanto que os SHR_S apresentaram uma perda de desempenho ($-0,43 \pm 0,07$ Km/h). Adicionalmente, notamos que o ganho de desempenho após o treinamento

foi similar nos grupos SHR e WKY. Deste modo o protocolo adotado garantiu a eficiência do treinamento físico em aumentar igualmente a capacidade física, tanto em animais normotensos quanto em hipertensos (Figura 5B).

Tabela 1 - Velocidade máxima e ganho em desempenho (em km/h) atingidos nos testes de esforço máximo, realizados na semana 0, 4 e 8, dos animais WKY_S, WKY_T, SHR_S e SHR_T.

teste de esforço	WKY		SHR	
	Sedentário (n)	Treinado (n)	Sedentário (n)	Treinado (n)
semana 0	1,11±0,04 (45)	1,11±0,03 (108)	1,59±0,05 [‡] (49)	1,63±0,04 ^Δ (102)
semana 4	1,08±0,05 (25)	1,47±0,04 ^{*†} (52)	1,25±0,07 ^{*‡} (29)	2,07±0,07 ^{*†Δ} (46)
semana 8	0,97±0,07 (25)	1,85±0,07 ^{*†} (40)	1,09±0,08 [*] (30)	2,34±0,09 ^{*†Δ} (26)
ganho	(-)0,15±0,07 (27)	0,58±0,07 [#] (40)	(-)0,43±0,07 ^{o□} (26)	0,54±0,08 ^{#o} (30)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher *Diferente da semana 0 correspondente.
[†]Diferente do sedentário correspondente da mesma semana.
[‡]Diferente do sedentário WKY da mesma semana.
^ΔDiferente do treinado WKY da mesma semana. (p<0,05)
 ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher [#]Diferente do sedentário correspondente.
^oDiferente do sedentário WKY.
[□]Diferente do treinado WKY. (p<0,05)

Figura 5. A) Alteração seqüencial no desempenho em esteira (velocidade máxima alcançada) durante os protocolos de treinamento (T) ou sedentarismo (S) em normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Testes de esforço máximo realizados no início, na 4ª e 8ª semanas dos protocolos (significâncias na Tabela 1); B) Efeito do T ou S sobre a capacidade física dos animais, obtida pela diferença de desempenho entre as semanas 8 e 0. * diferença em relação ao controle sedentário, + diferença em relação ao WKY_S. (p<0,05)

4.3 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca Basal

Os dados dos registros funcionais de PAM (em mmHg) e FC (em b/min) por grupo experimental estão apresentados como média±EPM na Tabela 2 contendo os resultados das análises estatísticas, e ilustrados nas Figuras 6 (A e B). No início do protocolo (S_0) foi observada diferença entre os animais normotensos e hipertensos para PAM com $p<0,001$ (WKY = 123 ± 1 e SHR = 177 ± 2 mmHg). Para FC de repouso também foram encontradas diferenças entre os grupos com $p<0,05$, novamente com maiores valores observados nos hipertensos (WKY = 320 ± 8 e SHR = 379 ± 12 b/min) (Figura 6A).

Ao longo do treinamento a PAM dos animais normotensos permaneceu constante, não sendo observada diferença estatística entre T e S, que de modo geral apresentaram pressão média ao redor de 122 ± 1 mmHg. No entanto, com relação à FC observou-se diminuição ao longo do tempo nos animais T, enquanto que os S mantiveram a FC constante. Na 8ª semana a FC dos WKY_T era inferior a dos WKY_S (270 ± 7 vs. 309 ± 9 b/min, respectivamente, $p<0,05$), ou seja, uma redução de 12,6% da FC de repouso deste grupo. Este resultado pode ser observado na Figura 6B.

O treinamento determinou queda gradativa e mais precoce da FC em SHR_T quando comparado ao grupo WKY_T. Observou-se queda da FC de 8% na 2ª semana (347 ± 13 b/min) a qual se manteve a partir de então (332 ± 12 b/min), na 8ª semana, correspondendo a uma redução de 10,7% na FC basal). Além da queda de FC o treinamento aeróbio também foi capaz de promover queda significativa da PAM nos SHR_T na 8ª semana (169 ± 3 mmHg, correspondendo à redução de 5,6%, Figura 6 e Tabela 2).

Tabela 2 - Dados de pressão arterial média (PAM) (mmHg) e frequência cardíaca basal (FC) (bpm) registrados nos diferentes tempos (S₀, T₁, T₂, T₄, T₈, S₈) nos 2 grupos experimentais (WKY e SHR). Valores apresentados como média±EPM.

Grupo experimental	PAM (mmHg)		FC basal (b/min)	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S ₀	123±1 (15)	177±2 [#] (15)	320±8 (15)	379±13 [#] (15)
S ₈	122±1 (6)	179±4 [#] (6)	309±9 (6)	372±6 [#] (6)
T ₀	123±1 (15)	177±2 ^Δ (15)	320±8 (15)	379±13 ^Δ (15)
T ₁	122±1 (7)	179±3 ^Δ (7)	332±13 (7)	360±8 (7)
T ₂	121±2 (15)	175±2 ^Δ (15)	309±8 (15)	347±13 ^{†Δ} (15)
T ₄	122±2 (14)	178±2 ^Δ (14)	308±9 (14)	346±7 ^{†Δ} (14)
T ₈	122±1 (15)	169±3 ^{†Δ} (15)	270±7 [†] (15)	332±12 ^{†Δ} (15)
S ₈	122±1 (6)	179±4 [‡] (6)	309±9 (6)	372±6 [‡] (6)
T ₈	122±1 (15)	169±3 ^{\$‡} (15)	270±7 ^{\$} (15)	332±12 ^{\$‡} (15)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S₀ correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T₀ correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: ^{\$}Diferente de S₈ correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente (p<0,05).

Figura 6. Pressão arterial média (PA) (A) e frequência cardíaca basal (FC) (B) ao longo de oito semanas de sedentarismo (S) ou treinamento (T) em animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Significâncias na Tabela 2.

4.4 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Expressão Gênica de OT, OTR e BDNF

4.4.1 Teste de Linearidade e Eficiência

Os testes de linearidade e eficiência revelaram que todos os primers utilizados neste trabalho apresentam ótima eficiência para PCR em tempo real de amostras concentradas (1:1) e diluídas (até 1:20) (Quadro 4). Não se dosou a linearidade e eficiência do OT no DBS e VBS, porque a síntese de OT é praticamente realizada no PVN.

Quadro 4. Linearidade, eficiência e inclinação para cada primer utilizados neste estudo (HPRT, OT, OTR e BDNF) testados em cada região central de interesse (PVN, DBS e VBS).

primer	tecido	linearidade	eficiência	inclinação
HPRT	PVN	0,99	1,09	- 3,1
	DBS	0,99	0,97	- 3,3
	VBS	0,99	1,03	- 3,2
OT	PVN	0,99	0,92	- 3,5
	DBS	-	-	-
	VBS	-	-	-
OTR	PVN	0,96	1,15	- 3,0
	DBS	0,98	1,09	- 3,1
	VBS	0,99	0,92	- 3,5
BDNF	PVN	0,99	1,02	- 3,3
	DBS	0,99	0,94	- 3,4
	VBS	0,99	0,93	- 3,5

4.4.2. Efeitos sobre a Expressão Gênica de OT e BDNF no PVN

Os dados de expressão gênica ($\text{Eff}^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) calculados para análise de quantificação relativa de RNAm de OT e BDNF no PVN para os diferentes grupos experimentais estão apresentados como média $\pm$ erro na Tabela 3 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 7 (A e B).

Houve alteração na expressão do RNAm de OT nos WKY e SHR sedentários ao longo do tempo, sendo que os WKY apresentaram aumento de +48% dos valores em S_8 ($S_0 = 100,0 \pm 15,0$ vs. $S_8 = 148,6 \pm 21,5$) e SHR apresentaram redução de -54% ($S_0 = 119,3 \pm 6,2$ vs. $S_8 = 54,0 \pm 14,8$). Por outro lado, não houve alterações na expressão do RNAm de BDNF nos WKY e SHR sedentários ao longo do tempo ($S_0 = 100,0 \pm 9,5$ vs. $S_8 = 111,5 \pm 15,2$; $S_0 = 102,8 \pm 21,0$ vs. $S_8 = 105,4 \pm 7,1$, respectivamente).

Já o treinamento físico determinou aumento ($p < 0,05$) com diferenças na seqüência temporal na expressão de RNAm. Foi observado aumento marcante de RNAm para OT em WKY de +262% e em SHR de +342% em T_2 ($T_0 = 100,0 \pm 15,0$ vs. $T_2 = 362,2 \pm 79,5$; $T_0 = 119,3 \pm 6,2$ vs. $T_2 = 441,6 \pm 47,3$, respectivamente) com aumento mantido em WKY e retorno a níveis basais em SHR a partir da 4ª semana de treinamento (T_4 - T_8). Na oitava semana do protocolo experimental os WKY apresentaram aumento de +145% em T_8 ($S_8 = 148,6 \pm 21,5$ vs. $T_8 = 363,9 \pm 33,1$), enquanto os SHR não apresentaram alteração significativa ($S_8 = 54,0 \pm 14,8$ vs. $T_8 = 96,1 \pm 15,5$) (Figura 7A, Tabela 3).

Quanto à expressão relativa de BDNF, observou-se nos WKY um pico transitório em T_1 de +146% ($T_0 = 100,0 \pm 9,5$ vs. $T_1 = 245,7 \pm 37,5$), retornando a valores basais a partir de T_2 ; uma menor porém mantida elevação de RNAm de BDNF ocorreu nos SHR de +45% a partir de T_4 ($T_0 = 102,8 \pm 21,0$ vs. $T_4 = 144,3 \pm 13,7$). Na oitava semana do protocolo experimental os WKY_T não diferiram significativamente dos WKY_S ($S_8 = 111,5 \pm 15,2$ vs. $T_8 = 108,2 \pm 17,8$), enquanto os SHR apresentaram aumento de +40% em T_8 ($S_8 = 105,4 \pm 7,1$ vs. $T_8 = 147,4 \pm 8,7$) (Figura 7B, Tabela 3).

Tabela 3 - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OT e BDNF no PVN: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.

PVN				
Grupo experimental	OT		BDNF	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S ₀	100,0±15,0 (7)	119,3±6,2 (6)	100,0±9,5 (6)	102,8±21,0 (6)
S ₈	148,6±21,5* (6)	54,0±14,8*# (7)	111,5±15,2 (6)	105,4±7,1 (6)
T ₀	100,0±15,0 (7)	119,3±6,2 (6)	100,0±9,5 (6)	102,8±21,0 (6)
T ₁	298,5±60,0 [†] (6)	115,9±14,1 ^Δ (6)	245,7±37,5 [†] (6)	119,4±12,3 ^Δ (6)
T ₂	362,2±79,5 [†] (7)	441,6±47,3 [†] (7)	111,1±7,0 (6)	135,7±19,8 (6)
T ₄	243,5±46,3 [†] (7)	73,8±7,2 ^Δ (7)	83,5±8,5 (6)	144,3±13,7 ^{†Δ} (6)
T ₈	363,9±33,1 [†] (6)	96,1±15,5 ^Δ (5)	108,2±17,8 (6)	147,4±8,7 ^{†Δ} (6)
S ₈	148,6±21,5 (6)	54,0±14,8 [‡] (4)	111,5±15,2 (6)	105,4±7,1 (6)
T ₈	363,9±33,1 [§] (6)	96,1±15,5 [‡] (5)	108,2±17,8 (6)	147,4±8,7 ^{§‡} (6)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S₀ correspondente;

#Diferente de WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T₀ correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [§]Diferente de S₈ correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente (p<0,05).

Figura 7. Alteração sequencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OT (A) e de BDNF (B) no PVN de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 3.

4.4.3 Efeitos sobre a Expressão Gênica de OTR e BDNF no DBS

Os dados de expressão gênica ($\text{Eff}^{\Delta\Delta C_t}$) calculados para a quantificação relativa de RNAm de OTR e BDNF no DBS para WKY e SHR nos diferentes tempos experimentais são apresentados como média $\pm$ erro na Tabela 4 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 8 (A e B).

Já no início do protocolo experimental (S_0) a expressão relativa de OTR no DBS diferia entre WKY e SHR ($100,0\pm 6,8$ vs. $60,6\pm 8,5$, respectivamente), sendo reduzida nos SHR_S (-40% vs. WKY_S). Contudo, ao longo das 8 semanas a expressão de OTR no DBS de SHR_S alcançou os mesmos valores encontrados em WKY_S ($\text{WKY}_{S8} = 92,6\pm 2,3$; $\text{SHR}_{S8} = 103,3\pm 7,1$), representando ao longo do tempo um aumento de +72% nos SHR ($S_0 = 60,6\pm 8,5$ vs. $S_8 = 103,3\pm 7,1$).

O T promoveu aumento inicial (T_1 - T_2) na expressão de OTR em WKY_T e SHR_T de +130% e +66%, respectivamente, quando comparados ao grupo T_0 . No grupo WKY_T , a expressão de OTR continuou elevada entre T_4 - T_8 , porém com menor magnitude (+52% vs. T_0). Por sua vez os SHR_T apresentaram a partir de T_4 aumento progressivo da expressão de OTR, que foi de 107% até 160% nas semanas 4 e 8, quando apresentaram os mesmos valores encontrados em WKY_{T8} ($\text{WKY}_{T8} = 146,0\pm 19,5$; $\text{SHR}_{T8} = 159,8\pm 13,5$). Quando comparados aos respectivos controles sedentários (S_8), WKY_{T8} e SHR_{T8} apresentaram aumentos similares de +53% e +57%, respectivamente ($\text{WKY}_{S8} = 92,6\pm 2,3$ vs. $\text{WKY}_{T8} = 146,0\pm 19,5$; $\text{SHR}_{S8} = 103,3\pm 7,1$ vs. $\text{SHR}_{T8} = 159,8\pm 13,5$) (Figura 8A, Tabela 4).

Assim como no PVN, não houve diferença na expressão de RNAm de BDNF ao longo do tempo (S_0 = S_8) tanto para WKY_S quanto para SHR_S ($\text{WKY}_{S0} = 100,0\pm 4,8$ vs. $\text{WKY}_{S8} = 104,1\pm 3,3$; $\text{SHR}_{S0} = 99,3\pm 4,6$ vs. $\text{SHR}_{S8} = 107,4\pm 5,4$). O T determinou entre as 1ª e 2ª semanas de treinamento aumento na expressão de BDNF de +55% e +62% nos WKY_{T1-T2} e SHR_{T1-T2} respectivamente. Porém, a partir de T_4 a expressão de BDNF nos WKY_{T4} retornou a valores encontrados nos animais T_0 ($\text{WKY}_{T0} = 100,0\pm 4,8$ vs. $\text{WKY}_{T4} = 105,0\pm 4,5$). Por outro lado a expressão de BDNF no DBS em SHR_T manteve-se elevada em +60%, quando comparada aos SHR_{S8} ($\text{SHR}_{S8} = 107,4\pm 5,4$ vs. $\text{SHR}_{T8} = 166,5\pm 8,0$) (Figura 8B, Tabela 4).

Tabela 4 - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OTR e BDNF no DBS: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.

DBS				
Grupo experimental	OTR		BDNF	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S ₀	100,0±6,8 (7)	60,6±8,5 [#] (7)	100,0±4,8 (6)	99,3±4,6 (6)
S ₈	92,6±2,3 (7)	103,3±7,1 [*] (7)	104,1±3,3 (6)	107,4±5,4 (6)
T ₀	100,0±6,8 (7)	60,6±8,5 ^Δ (7)	100,0±4,8 (6)	99,3±4,6 (6)
T ₁	230,2±7,8 [†] (7)	124,5±8,8 ^{†Δ} (7)	147,0±6,3 [†] (6)	139,0±6,7 (6)
T ₂	229,5±15,4 [†] (7)	128,9±14,9 ^{†Δ} (7)	154,5±5,6 [†] (6)	185,1±10,5 [†] (6)
T ₄	158,0±10,2 [†] (7)	107,5±7,0 ^{†Δ} (7)	105,0±4,5 (6)	154,7±11,0 ^{†Δ} (6)
T ₈	146,0±19,5 [†] (7)	159,8±13,5 [†] (7)	108,2±3,4 (6)	166,5±8,0 ^{†Δ} (6)
S ₈	92,6±2,3 (7)	103,3±7,1 (7)	104,1±3,3 (6)	107,4±5,4 (6)
T ₈	146,0±19,5 ^{\$} (7)	159,8±13,5 ^{\$} (7)	108,2±3,4 (6)	166,5±8,0 ^{\$†} (6)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S₀ correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T₀ correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: ^{\$}Diferente de S₈ correspondente;

[†]Diferente do WKY correspondente (p<0,05).

Figura 8. Alteração sequencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OTR (A) e de BDNF (B) no DBS de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 4.

4.4.4 Efeitos sobre a Expressão Gênica de OTR e BDNF no VBS

Os dados de expressão gênica ($\text{Eff}^{\Delta\Delta C_t}$) calculados para a quantificação relativa de RNAm de OTR e BDNF no VBS para WKY e SHR nos diferentes tempos experimentais são apresentados como média±erro na Tabela 5 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 9 (A e B).

No VBS não houve diferença na expressão de RNAm de OTR ao longo do tempo ($S_0=S_8$) tanto para WKY_S quanto para SHR_S (WKY_{S0} = 100,0±4,3 vs. WKY_{S8} = 139,3±9,0; SHR_{S0} = 251,3±10,6 vs. SHR_{S8} = 284,9±31,6). Contudo, o grupo SHR_S apresentou expressão de OTR em torno de 2,25 vezes maior que os WKY_S (WKY_{S0} = 100,0±4,3 vs. SHR_{S0} = 251,3±10,6; WKY_{S8} = 139,3±9,0 vs. SHR_{S8} = 284,9±31,6, respectivamente)

O T promoveu aumento inicial (T_1) na expressão de OTR em WKY_T e SHR_T de +60% e +134%, respectivamente, quando comparados ao grupo T_0 (WKY_{T0} = 100,0±4,3 vs. WKY_{T1} = 160,5±9,7; SHR_{T0} = 251,3±10,6 vs. SHR_{T1} = 385,7±41,3). No grupo WKY_T, a expressão de OTR continuou elevada entre T_1 - T_4 , com magnitude de +54% vs. T_0 , que retornou a valores basais em T_8 (WKY_{S8} = 139,3±9,0 vs. WKY_{T8} = 133,8±3,6). Por sua vez os SHR_T apresentaram em T_2 uma diminuição transitória na expressão de RNAm de OTR, a qual novamente aumentou em T_4 (+95%) e por fim, similarmente com o observado nos WKY_T, retornou aos valores basais em T_8 (SHR_{S8} = 284,9±31,6 vs. SHR_{T8} = 308,4±23,8) (Figura 9A, Tabela 5)

Ao longo do tempo o T causou redução de 37% na expressão de RNAm de BDNF somente nos WKY (WKY_{S0} = 100,0±2,7 vs. WKY_{S8} = 63,3±9,1). Além disso, os WKY_T também não apresentaram alterações relevantes ao longo do protocolo experimental, ou seja, tanto WKY_T quanto WKY_S apresentam ao longo do tempo clara redução na expressão de RNAm de BDNF no VBS. Por outro lado, os SHR_T foram os únicos indivíduos que apresentaram aumento na expressão de RNAm de BDNF ao longo do T. Houve aumento fásico primeiramente em T_1 , de +79% (SHR_{T0} = 100,0±2,7 vs. SHR_{T1} = 167,0±9,7), menor aumento de 50% em T_2 (SHR_{T0} = 100,0±2,7 vs. SHR_{T2} = 138,2±8,1) atingindo +87% em T_8 (SHR_{S8} = 72,2±4,1 vs. SHR_{T8} = 175,1±8,5) (Figura 9B, Tabela 5).

Tabela 5 - Alterações na expressão relativa de RNAm (%) de OTR e BDNF no VBS: no tempo/idade (S₀-S₈); no treinamento ao longo do tempo (T₀-T₈) e no treinamento versus sedentarismo (S₈ vs. T₈) nos diferentes grupos experimentais.

VBS				
Grupo experimental	OTR		BDNF	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S ₀	100,0±4,3 (6)	251,3±10,6 [#] (7)	100,0±2,7 (6)	88,4±12,4 (7)
S ₈	139,3±9,0 (6)	284,9±31,6 [#] (7)	63,3±9,1* (6)	72,2±4,1 (7)
T ₀	100,0±4,3 (6)	251,3±10,6 ^Δ (7)	100,0±2,7 (6)	88,4±12,4 (7)
T ₁	160,5±9,7 [†] (7)	385,7±41,3 ^{†Δ} (7)	101,6±9,9 (7)	167,0±9,7 ^{†Δ} (6)
T ₂	149,8±5,1 [†] (7)	269,4±9,3 ^Δ (6)	68,2±5,9 [†] (7)	138,2±8,1 ^{†Δ} (7)
T ₄	153,2±13,1 [†] (8)	346,8±16,8 ^{†Δ} (7)	91,2±6,7 (8)	133,5±16,9 ^{†Δ} (8)
T ₈	133,8±3,6 (6)	308,4±23,8 ^{†Δ} (6)	54,1±7,6 [†] (6)	175,1±8,5 ^{†Δ} (7)
S ₈	139,3±9,0 (6)	284,9±31,6 [‡] (7)	63,3±9,1 (6)	72,2±4,1 (7)
T ₈	133,8±3,6 (6)	308,4±23,8 [‡] (6)	54,1±7,6 (6)	175,1±8,5 ^{§‡} (7)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S₀ correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T₀ correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [§]Diferente de S₈ correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente (p<0,05).

Figura 9. Alteração seqüencial da expressão relativa (em %) de RNAm de OTR (A) e de BDNF (B) no VBS de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 5.

4.5 Efeitos Sequenciais do T e S Sobre a Imunorreatividade para OT e BDNF

4.5.1 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de OT e BDNF no PVN

Na Figura 10 são apresentadas imagens representativas da imunorreatividade para a OT no PVN de WKY e SHR dos grupos S_0 , T_2 , T_8 e S_8 . Observa-se em ambos os grupos T intenso aumento na imunorreatividade para OT (mantido até T_8) sem alteração nos grupos sedentários S. É importante ressaltar que a expressão de RNAm feitas nos “punches” do hipotálamo vão de acordo as alterações de imunorreatividade ocorridas no PVN.

Os dados de intensidade e densidade calculados para análise de quantificação de imunorreatividade de OT no PVN, normalizados pelo número de neurônios, para os diferentes grupos experimentais estão apresentados como média $\pm$ EPM na Tabela 6 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 11 (A e B).

Não houve alteração na intensidade ou densidade de OT nos WKY e SHR S ao longo do tempo (intensidade: $WKY_{S_0} = 1,25\pm0,16$ vs. $WKY_{S_8} = 1,47\pm0,23$ e $SHR_{S_0} = 1,37\pm0,12$ vs. $SHR_{S_8} = 1,46\pm0,25$; densidade: $WKY_{S_0} = 0,56\pm0,06$ vs. $WKY_{S_8} = 0,40\pm0,04$ e $SHR_{S_0} = 0,68\pm0,06$ vs. $SHR_{S_8} = 0,51\pm0,07$) (Tabela 6).

Por sua vez o T determinou aumento significativo na intensidade de OT no PVN caudal. Foi observado aumento em T_2 de +219% em WKY e +155% em SHR ($T_0 = 1,25\pm0,16$ vs. $T_2 = 3,99\pm0,15$; $T_0 = 1,37\pm0,12$ vs. $T_2 = 2,95\pm0,19$, respectivamente), com elevações de menor magnitude mas significativas em T_8 ($WKY_{T_8} = 2,51\pm0,14$ e $SHR_{T_8} = 2,09\pm0,43$, correspondendo a aumentos de 100% e 53% respectivamente) (Figura 11A, Tabela 6).

Ao final dos protocolos WKY_T vs. WKY_S apresentaram aumento na intensidade de OT de 70% ($2,51\pm0,14$ vs. $1,47\pm0,23$), enquanto que a alteração de +43% observada nos SHR_T vs. SHR_S ($2,09\pm0,43$ vs. $1,46\pm0,25$) não atingiu nível de significância (Figura 11A, Tabela 6).

Quanto à densidade de OT medida por neurônio no PVN caudal, observou-se em T_2 aumento equivalente entre WKY e SHR de +212 e +165% ($WKY_{T_0} = 0,56\pm0,06$ vs. $WKY_{T_2} = 1,75\pm0,11$; $SHR_{T_0} = 0,68\pm0,06$ vs. $SHR_{T_2} = 1,80\pm0,24$), com retorno aos valores basais na semana 8 ($WKY_{S_8} = 0,40\pm0,04$ vs. $WKY_{T_8} = 0,75\pm0,08$; $SHR_{S_8} = 0,51\pm0,07$ vs. $SHR_{T_8} = 0,48\pm0,08$) (Figura 11B, Tabela 6).

Figura 10. Imagens representativas de imunorreatividade a OT no PVN caudal de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. A região anatômica de referência para localização do PVN foi o terceiro ventrículo (3V), representado pela linha tracejada. Barra de escala = 50 μm.

Tabela 6 - Alterações na intensidade e densidade (UA) de OT no PVN: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.

PVN				
Grupo experimental	OT (intensidade)		OT (densidade)	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S_0	1,25±0,16 (5)	1,37±0,12 (4)	0,56±0,06 (5)	0,68±0,06 (4)
S_8	1,47±0,23 (5)	1,46±0,25 (4)	0,40±0,04 (5)	0,51±0,07 (5)
T_0	1,25±0,16 (5)	1,37±0,12 (4)	0,56±0,06 (5)	0,68±0,06 (4)
T_2	3,99±0,15 [†] (5)	2,95±0,19 ^{†A} (4)	1,75±0,11 [†] (5)	1,80±0,24 [†] (4)
T_8	2,51±0,14 [†] (5)	2,09±0,43 [†] (4)	0,75±0,08 (5)	0,48±0,08 (4)
S_8	1,47±0,23 (5)	1,46±0,25 (4)	0,40±0,04 (5)	0,51±0,07 (4)
T_8	2,51±0,14 [§] (5)	2,09±0,43 (4)	0,75±0,08 [§] (5)	0,48±0,08 (4)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S_0 correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T_0 correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [§]Diferente de S_8 correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

Figura 11. Alteração seqüencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de OT no PVN de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 6.

Na Figura 12 são apresentadas imagens representativas da imunorreatividade a BDNF no PVN caudal de WKY e SHR pertencentes aos grupos S_0 , T_1 , T_8 e S_8 . Observa-se que o T foi acompanhado de aumento inicial na imunorreatividade para o BDNF no PVN caudal de ambos os grupos, o qual se manteve elevado até T_8 nos SHRT. Também para o BDNF a expressão gênica obtida em “punches” do hipotálamo está coerente com as alterações induzida pelo T na imunorreatividade do PVN.

Os dados de intensidade e densidade calculados para análise de quantificação de imunorreatividade de BDNF no PVN, normalizados pelo número de neurônios, para os diferentes grupos experimentais estão apresentados como média $\pm$ EPM na Tabela 7 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados na Figura 13 (A e B).

Houve alterações na intensidade e na densidade de BDNF nos WKY e SHR sedentários ao longo do tempo; a intensidade diminuiu -41% nos SHR ($SHR_{S_0} = 0,27\pm0,02$ vs. $SHR_{S_8} = 0,16\pm0,03$), enquanto que a densidade aumentou parcialmente +48% e +52% em ambos os grupos ($WKY_{S_0} = 0,46\pm0,06$ vs. $WKY_{S_8} = 0,68\pm0,09$ e $SHR_{S_0} = 0,44\pm0,03$ vs. $SHR_{S_8} = 0,67\pm0,05$), respectivamente (Tabela 7).

Na intensidade de BDNF medida por neurônio no PVN caudal foi observado aumento em T_1 - T_2 de +48% e +52% em WKY quando comparado a T_0 ($T_0 = 0,21\pm0,02$ vs. $T_1 = 0,31\pm0,03$ vs. $T_2 = 0,32\pm0,02$), sem alteração nos SHR ($T_0=T_1=T_2=T_8$). Ao final dos protocolos os WKY_T não apresentaram alteração significativa vs. WKY_S ($S_8 = 0,18\pm0,03$ vs. $T_8 = 0,20\pm0,02$), enquanto os SHR_T vs. SHR_S apresentaram aumento de + 50% ($S_8 = 0,16\pm0,03$ vs. $T_8 = 0,24\pm0,04$) (Figura 13A, Tabela 7).

Quanto à densidade de OT medida por neurônio no PVN caudal, observou-se em T_1 aumento equivalente entre WKY e SHR de +132% e +218% ($WKY_{T_0} = 0,46\pm0,06$ vs. $WKY_{T_1} = 1,07\pm0,05$; $SHR_{T_0} = 0,44\pm0,03$ vs. $SHR_{T_1} = 1,40\pm0,12$), com retorno aos valores basais em WKY ($S_8 = 0,68\pm0,09$ vs. $T_8 = 0,48\pm0,04$) e aumento de +48% em SHR ($S_8 = 0,67\pm0,05$ vs. $T_8 = 0,99\pm0,07$) (Figura 13B, Tabela 7).

Figura 12. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no PVN caudal de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₁, T₈ e S₈. A região anatômica de referência para localização do PVN foi o 3V, representado pela linha tracejada. Barra de escala = 50 μ m.

Tabela 7 - Alterações na intensidade e densidade (UA) de BDNF no PVN: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.

PVN				
Grupo experimental	BDNF (intensidade)		BDNF (densidade)	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S_0	0,21±0,02 (5)	0,27±0,02 [#] (4)	0,46±0,06 (5)	0,44±0,03 (4)
S_8	0,18±0,03 (5)	0,16±0,03* (4)	0,68±0,09* (5)	0,67±0,05* (4)
T_0	0,21±0,02 (5)	0,27±0,02 (4)	0,46±0,06 (5)	0,44±0,03 (4)
T_1	0,31±0,03 [†] (5)	0,28±0,03 (4)	1,07±0,05 [†] (5)	1,40±0,12 [†] (4)
T_2	0,32±0,02 [†] (5)	0,29±0,02 ^Δ (4)	0,73±0,07 (5)	0,62±0,04 [†] (4)
T_8	0,20±0,02 (5)	0,24±0,04 (4)	0,48±0,04 [†] (5)	0,99±0,07 [†] (4)
S_8	0,18±0,03 (5)	0,16±0,03 (4)	0,68±0,09 (5)	0,67±0,05 (4)
T_8	0,20±0,02 (5)	0,24±0,04 ^{\$‡} (4)	0,48±0,04 ^{\$} (5)	0,99±0,07 ^{\$‡} (4)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S_0 correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T_0 correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: ^{\$}Diferente de S_8 correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

Figura 13. Alteração sequencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no PVN de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 7.

Sendo um dos objetivos deste trabalho caracterizar as alterações sequenciais de plasticidade em vias OTérgicas centrais induzidas pelo T utilizando o BDNF como um indicador de plasticidade, o protocolo de imunofluorescência adotado foi de dupla marcação que nos permitiu observar e comprovar a presença de BDNF especificamente em neurônios OTérgicos.

Na Figura 14 estão apresentadas imagens sobrepostas da marcação de OT e BDNF do mesmo corte histológico. Ambas as proteínas BDNF (corada em vermelho) e OT (marcada em azul) colocalizam-se em neurônios do PVN localizados em diferentes subnúcleos: o posterior (objeto deste estudo e que contém muitos neurônios pré-autonômicos que se projetam ao NTS, RVLM e medula espinhal, estando envolvidos no controle cardiovascular), bem como nos subnúcleos localizados no PVN medial como o ventromedial e *dorsal cap* (parvocelulares que se projetam ao tronco cerebral) e o lateral, também identificado como magnocelular, que se projeta à neurohipófise, e é responsável pela liberação de OT no plasma. Com este tipo de análise podemos sugerir que as alterações observadas na expressão gênica mensurada em “punches” do hipotálamo e imunorreatividade de BDNF se estendem as alterações desta proteína ocorridas em neurônios OTérgicos.

Figura 14. Imunofluorescência com dupla marcação com BDNF (vermelho, A e E) e OT (azul, B e F) no PVN caudal (A-D) e medial (E-H). A sobreposição das imagens de OT e BDNF é mostrada em C (PVN caudal) e G (PVN medial). A colocalização de OT e BDNF é detalhada em D e H, que correspondem à ampliação das janelas ilustradas em C e G, respectivamente.

4.5.2 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de BDNF no DBS

Na Figura 15 são apresentadas imagens representativas da imunorreatividade para o BDNF no NTS de WKY e SHR pertencentes aos grupos S_0 , T_2 , T_8 e S_8 . Observa-se que o T foi acompanhado de grande aumento na imunorreatividade em ambos os grupos, que se manteve até o fim do treinamento principalmente nos SHR_T . Estas imagens confirmam ainda que as alterações induzidas pelo T na expressão de RNAm de BDNF no DBS são traduzidas em proteína e estão presentes no NTS.

Os dados de intensidade e densidade calculados para análise de quantificação de imunorreatividade de BDNF no NTS para os diferentes grupos experimentais estão apresentados como média $\pm$ EPM na Tabela 8 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 16 (A e B).

Já no início do protocolo experimental (S_0) a intensidade de BDNF medida por neurônio no NTS diferia entre WKY e SHR ($0,20\pm0,02$ vs. $0,30\pm0,04$, respectivamente), sendo aumentada nos SHR_S (+50% vs. WKY_{S_0}). Contudo, ao longo das 8 semanas a intensidade de BDNF no NTS de SHR_S apresentou pequena diminuição ($SHR_{S_0} = 0,30\pm0,04$; $SHR_{S_8} = 0,23\pm0,03$) enquanto que os WKY_S apresentaram aumento ao longo tempo ($WKY_{S_0} = 0,20\pm0,02$; $WKY_{S_8} = 0,36\pm0,03$). Quanto a densidade de BDNF medida por neurônio no NTS não foram observadas diferenças entre os grupos WKY e SHR, porém os SHR apresentaram uma diminuição de -40% ao longo do tempo ($SHR_{S_0} = 0,43\pm0,05$ vs. $SHR_{S_8} = 0,60\pm0,05$) (Tabela 8).

O T nos WKY e SHR foi acompanhado por aumento equivalente em T_2 de +260% e +133% na intensidade de BDNF, respectivamente ($WKY_{T_0} = 0,20\pm0,02$ vs. $WKY_{T_2} = 0,72\pm0,14$; $SHR_{T_0} = 0,30\pm0,04$ vs. $SHR_{T_2} = 0,70\pm0,08$), com retorno aos valores basais nos WKY na semana 8 ($WKY_{S_8} = 0,36\pm0,03$ vs. $WKY_{T_8} = 0,43\pm0,02$) e manutenção em SHR ($SHR_{S_8} = 0,60\pm0,05$ vs. $SHR_{T_8} = 0,71\pm0,07$) (Figura 16A, Tabela 8).

Na densidade de BDNF medida por neurônio no NTS foi observado aumento em T_2 de +179% em WKY e de menor magnitude em de +144% em SHR ($WKY_{T_0} = 0,53\pm0,04$ vs. $WKY_{T_2} = 1,48\pm0,10$; $SHR_{T_0} = 0,43\pm0,05$ vs. $SHR_{T_2} = 1,05\pm0,10$). Nos

SHR_T houve aumento adicional em T₈ (1,61±0,12). Ao final dos protocolos experimentais tanto WKY quanto os SHR mantiveram aumentos de +166% e 168% vs. seus respectivos controles (WKY_{S8} = 0,51±0,05 vs. WKY_{T8} = 1,36±0,08; SHR_{S8} = 0,60±0,05 vs. SHR_{T8} = 1,61±0,12) (Figura 16B, Tabela 8).

Figura 15. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no NTS de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) dos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. As regiões anômicas de referência para localização do núcleo do trato solitário (NTS) foram: núcleo gracil (Gr); trato solitário (Sol); núcleo dorsal motor do vago (DMV) e núcleo hipoglosso (12 N). Barra de escala = 50 μm.

Tabela 8 - Alterações na intensidade e densidade (UA) de BDNF no NTS: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.

NTS				
Grupo experimental	BDNF (intensidade)		BDNF (densidade)	
	WKY (n)	SHR (n)	WKY (n)	SHR (n)
S_0	0,20±0,02 (5)	0,30±0,04 [#] (4)	0,53±0,04 (5)	0,43±0,05 (4)
S_8	0,36±0,03* (5)	0,23±0,03* [#] (4)	0,51±0,05 (5)	0,60±0,05* (4)
T_0	0,2±0,02 (5)	0,30±0,04 (4)	0,53±0,04 (5)	0,43±0,05 (4)
T_2	0,72±0,14 [†] (5)	0,70±0,08 [†] (4)	1,48±0,10 [†] (5)	1,05±0,10 ^{†Δ} (4)
T_8	0,43±0,02 [†] (5)	0,71±0,07 ^{†Δ} (4)	1,36±0,08 [†] (5)	1,61±0,12 ^{†Δ} (4)
S_8	0,36±0,03 (5)	0,23±0,03 [‡] (4)	0,51±0,05 (5)	0,60±0,05 (4)
T_8	0,43±0,02 (5)	0,71±0,07 ^{§‡} (4)	1,36±0,08 [§] (5)	1,61±0,12 ^{§‡} (4)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: *Diferente de S_0 correspondente;

[#]Diferente de WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T_0 correspondente;

^ΔDiferente do WKY correspondente (p<0,05).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [§]Diferente de S_8 correspondente;

[‡]Diferente do WKY correspondente (p<0,05).

Figura 16. Alteração seqüencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no NTS de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 8.

4.5.3 Efeitos sobre o Conteúdo Protéico de BDNF no VBS

Na Figura 17 são apresentadas imagens representativas da imunorreatividade a BDNF no RVLM de WKY e SHR pertencentes aos grupos S_0 , T_2 , T_8 e S_8 . Observa-se que o T foi acompanhado de importante aumento na imunorreatividade a BDNF no

RVLM de ambos os grupos, o qual se manteve até o final do protocolo. Pode ser notado que as alterações de expressão de RNAm quantificado em “punches” do VBS induzidas pelo T, coincidem com as alterações na imunorreatividade ao BDNF no RVLM em ambos os grupos experimentais.

Os dados de intensidade e densidade calculados para análise de quantificação de imunorreatividade de BDNF no RVLM para os diferentes grupos experimentais estão apresentados como média±EPM na Tabela 9 contendo os resultados das análises estatísticas, e representados graficamente na Figuras 18 (A e B).

Já no início do protocolo experimental (S_0) a intensidade de BDNF no RVLM diferia entre WKY e SHR sedentários ($1,20 \pm 0,15$ vs. $2,22 \pm 0,29$, respectivamente), sendo aumentada nos SHR_S (+85% vs. WKY_S). Contudo, ao longo das 8 semanas a intensidade de BDNF de SHR_S diminuiu e alcançou valores similares aos encontrados em WKY_S ($WKY_{S0} = 1,20 \pm 0,15$ vs. $WKY_{S8} = 0,82 \pm 0,06$), representando ao longo do tempo uma redução de -67% nos SHR_S ($SHR_{S0} = 2,22 \pm 0,29$ vs. $SHR_{S8} = 0,73 \pm 0,06$). Por outro lado a densidade de BDNF no RVLM iniciou igual em WKY e SHR ($0,76 \pm 0,00$ vs. $0,93 \pm 0,11$, respectivamente) e reduziu ao longo do tempo em -% somente nos WKY ($WKY_{S0} = 0,76 \pm 0,00$ vs. $WKY_{S8} = 0,49 \pm 0,04$) (Tabela 9).

O T promoveu aumento inicial (T_2) na intensidade de BDNF no RVLM somente nos WKY em +76% ($WKY_{T0} = 1,20 \pm 0,15$ vs. $WKY_{T2} = 2,12 \pm 0,36$), que permaneceu elevado até a semana 8 em +33% ($WKY_{S8} = 0,82 \pm 0,06$ vs. $WKY_{T8} = 1,09 \pm 0,09$). No grupo SHR o T demonstrou ser eficiente em minorar o efeito de redução da intensidade de BDNF ao longo do tempo, uma vez que na semana 8 os animais treinados apresentaram aumento de +86% em relação aos sedentários ($SHR_{S8} = 0,73 \pm 0,06$ vs. $SHR_{T8} = 1,36 \pm 0,16$) (Figura 18A, Tabela 9).

Quanto à densidade de BDNF no RVLM, foi observado ao longo do treinamento aumentos a partir de T_2 em WKY e SHR de +67% e +38%, respectivamente ($WKY_{T0} = 0,76 \pm 0,00$ vs. $WKY_{T2} = 1,27 \pm 0,21$; $SHR_{S0} = 0,93 \pm 0,11$ vs. $SHR_{T2} = 1,28 \pm 0,17$), que se mantiveram até o final do protocolo experimental ($WKY_{S8} = 0,49 \pm 0,04$ vs. $WKY_{T8} = 1,41 \pm 0,09$; $SHR_{S8} = 0,76 \pm 0,12$ vs. $SHR_{T8} = 1,48 \pm 0,09$) (Figura 16B, Tabela 9).

Figura 17. Imagens representativas de imunorreatividade a BDNF no RVLM de WKY (a esquerda) e SHR (a direita) pertencentes aos grupos S₀, T₂, T₈ e S₈. As regiões anatômicas de referência para localização do RVLM foram: núcleo olivar inferior (IOD) e parte compacta do núcleo ambíguos (AmbC) visualizados e identificados por meio de microscopia ótica em

campo escuro, demonstrados no canto inferior esquerdo de cada imagem sendo o quadrado (□) a região onde foi adquirida a imagem de imunofluorescência. Barra de escala = 50 μ m.

Tabela 9 - Alterações na intensidade e densidade (UA) de BDNF no RVLM: no tempo/idade (S_0 - S_8); no treinamento ao longo do tempo (T_0 - T_8) e no treinamento versus sedentarismo (S_8 vs. T_8) nos diferentes grupos experimentais.

RVLM				
Grupo experimental	BDNF (intensidade)		BDNF (densidade)	
	WKY	SHR	WKY	SHR
	(n)	(n)	(n)	(n)
S_0	1,20 $\pm$ 0,15 (5)	2,22 $\pm$ 0,29 [#] (4)	0,76 $\pm$ 0,00 (5)	0,93 $\pm$ 0,11 (4)
S_8	0,82 $\pm$ 0,06 (5)	0,73 $\pm$ 0,06 [*] (4)	0,49 $\pm$ 0,04 [*] (5)	0,76 $\pm$ 0,12 [#] (4)
T_0	1,20 $\pm$ 0,15 (5)	2,22 $\pm$ 0,29 ^{Δ} (4)	0,76 $\pm$ 0,00 (5)	0,93 $\pm$ 0,11 (4)
T_2	2,12 $\pm$ 0,36 [†] (5)	2,72 $\pm$ 0,17 ^{Δ} (4)	1,27 $\pm$ 0,21 [†] (5)	1,28 $\pm$ 0,17 [†] (4)
T_8	1,09 $\pm$ 0,09 (5)	1,36 $\pm$ 0,16 [†] (4)	1,41 $\pm$ 0,09 [†] (5)	1,48 $\pm$ 0,09 [†] (4)
S_8	0,82 $\pm$ 0,06 (5)	0,73 $\pm$ 0,06 (4)	0,49 $\pm$ 0,04 (5)	0,76 $\pm$ 0,12 [‡] (4)
T_8	1,09 $\pm$ 0,09 ^{$\S$} (5)	1,36 $\pm$ 0,16 ^{$\S$‡} (4)	1,41 $\pm$ 0,09 ^{$\S$} (5)	1,48 $\pm$ 0,09 ^{$\S$} (4)

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: ^{*}Diferente de S_0 correspondente;
[#]Diferente de WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: [†]Diferente de T_0 correspondente;
 ^{Δ} Diferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Fisher: ^{$\S$} Diferente de S_8 correspondente;
[‡]Diferente do WKY correspondente ($p < 0,05$).

Figura 18. Alteração sequencial da intensidade (UA) (A) e densidade (UA) (B) de BDNF no RVLM de WKY e SHR submetidos ao treinamento (T) ou sedentarismo (S). Significâncias na Tabela 9.

5 Discussão

A diferença de peso observada no início do protocolo experimental, entre as diferentes linhagens utilizadas (WKY>SHR) pode ser justificada pelo fato de os SHR serem animais simpatotônicos (BRODY e O'NEILL, 1984) o que implica em comportamento mais agitado, representando um maior gasto energético diário. No decorrer do protocolo de treinamento houve aumento gradual de peso, pois os animais começaram o treinamento com 2 meses e meio de vida, ou seja, ainda estavam em fase de desenvolvimento ponderal.

SHR também apresentaram melhor desempenho em esteira no início dos protocolos. Dados obtidos com a realização dos testes de esforço máximo e cálculo do ganho de capacidade física mostraram que ambos os grupos treinados aumentaram o desempenho no decorrer do protocolo experimental enquanto que os sedentários tiveram a capacidade inalterada (WKY) ou diminuída (SHR). Importante ressaltar que tanto animais WKY quanto SHR apresentaram ganhos equivalentes de capacidade física, o que garante que o protocolo de treinamento adotado foi equivalente em ambos os grupos. Já os animais sedentários, os SHR apresentaram maiores perdas de capacidade física que os WKY. Estes dados reproduzem observações anteriores de Higa-Taniguchi et al. (2007) e Felix e Michelini (2007), indicando ganho de desempenho entre SHR e WKY treinados e perda de desempenho nos SHR sedentários. Porém, o desempenho, atingido pelos animais treinados no presente estudo, foi ligeiramente inferior que os encontrados por esses autores, uma vez que o protocolo de T que utilizamos compreendeu dois meses, ou seja, um mês a menos do que o utilizado anteriormente.

As mensurações de PA e FC mostraram que os SHR encontravam-se já no início dos experimentos na fase estabelecida de hipertensão, apresentando valores de PA e FC significativamente mais elevados que seus controles WKY. A hipertensão espontânea realmente caracteriza-se por níveis elevados de PA e FC (BRODY e O'NEILL, 1994). O T não alterou a PA de WKY_T, que permaneceu ao redor de 122 ± 1 mmHg mas diminui a FC em até 12,6% em relação aos WKY_S. Já os SHR apresentaram tanto queda da FC quanto da PA (-10,7% e -5,6%, respectivamente). Estes resultados corroboram resultados anteriores de nosso e outros laboratórios indicando queda da PA e FC em hipertensos e apenas da FC em

normotensos (AMARAL et al., 2000, 2001; MELO et al., 2003; FELIX e MICHELINI, 2007; CERONI et al., 2009; PESCATELLO et al., 2004; TIPTON, 1999).

A originalidade deste trabalho foi que enquanto todos os trabalhos anteriores analisaram os efeitos do T ao final do protocolo, analisamos seus efeitos sequenciais, observando que a redução significativa da FC basal se faz mais precocemente nos SHR que nos WKY (T_2 vs. T_8) enquanto que a redução da PA que só ocorre nos SHR aparece mais tardiamente (T_8).

Além de avaliar as alterações temporais de PA e FC durante T em animais WKY e SHR, outro dado original do presente estudo foi avaliar simultaneamente a expressão gênica de OT e BDNF em áreas centrais de controle autonômico. Para isso foi necessário estudo detalhado para a escolha do gene constitutivo a ser utilizado como referência para os cálculos posteriores de expressão dos genes de interesse. Os testes com diferentes genes constitutivos (GAPDH, UBC, $\beta 2m$ e HPRT) revelaram que o HPRT foi o gene que apresentou menor variação perante as diferentes variáveis do presente trabalho, e por isso foi escolhido como gene endógeno (ou de referência) a ser utilizado. A HPRT é uma purina que catalisa a conversão de hipoxantina e guanina em seus respectivos mononucleotídeos. Grande parte das purinas resultantes da degradação do DNA endógeno é reaproveitada para síntese de novos nucleotídeos. O HPRT é um gene de controle interno constitutivamente expresso e que apresenta níveis notavelmente altos no cérebro de mamíferos (MELDGAARD et al., 2006; GILSBATH et al., 2006; TOKUYAMA et al., 1999), o que subsidia sua utilização como gene constitutivo para o presente estudo.

Os resultados relativos à sequência temporal de alterações funcionais e alterações na expressão do sistema OTérgico central (quantificadas pelo PCR em tempo real e confirmada pela imunofluorescência) em diferentes áreas de integração autonômica, foram originais, mostrando algumas observações interessantes. No PVN dos WKY_T o aumento intenso, abrupto e não mantido da expressão de RNAm de BDNF foi acompanhado de aumento simultâneo, mas duradouro do conteúdo protéico de BDNF e de OT. Por outro lado, no PVN dos SHR_T o aumento na expressão de BDNF foi menos intenso, pouco mais tardio, mas que se manteve elevado durante todo o treinamento, sendo também acompanhado de elevação simultânea da irOT, o que indica concentração elevada de ambos os peptídeos

durante o protocolo experimental. Aumentos na expressão de BDNF induzido pelo exercício já havia sido observado por Vayman et al. (2003) e Adlard et al. (2004) no hipocampo de ratos. Os dados do presente trabalho indicam que o treinamento aeróbio também induz plasticidade em áreas de controle autonômico, sugerindo adicionalmente que a manutenção de níveis elevados da proteína BDNF, necessária para mediar a plasticidade neuronal dependente de atividade em neurônios OTérgicos foi propiciada, nos SHR, por síntese contínua da proteína (indicada pela manutenção de níveis elevados de RNAm de BDNF durante todo o período de treinamento). Já nos WKY, a manutenção de níveis elevados da proteína BDNF no PVN durante o treinamento foi induzida por aumento transitório da síntese de RNAm de BDNF, o que sugere menor “turnover” de BDNF em normotensos submetidos ao treinamento. Em ambos os casos o aumento da imunorreatividade para OT no PVN posterior induzido pelo treinamento foi simultâneo e/ou precedido pelo aumento da imunorreatividade para o BDNF nos mesmos neurônios, o que sugere intensa plasticidade neuronal desencadeada pelo exercício físico repetitivo.

O treinamento aeróbio de baixa intensidade também desencadeia alterações plásticas em neurônios do NTS. Nos WKY o aumento moderado e transitório na expressão de RNAm de BDNF (entre as semanas 1 e 2) foi acompanhado de intensa síntese da proteína, a qual se manteve significativamente elevada durante todo o período de treinamento. Nos SHR o conteúdo protéico de BDNF também se manteve elevado durante o treinamento, sendo, no entanto, acompanhado de síntese aumentada de seu RNAm durante todo o período experimental. Estes dados também sugerem maior “turnover” de BDNF no NTS dos SHR, os quais necessitam de síntese contínua do RNAm para manter os níveis elevados da proteína. A elevação induzida pelo treinamento no conteúdo de BDNF no NTS de normotensos e hipertensos determinou em ambos os grupos aumento na síntese de RNAm do receptor de OT, que atua no sentido de aumentar a modulação OTérgica nesta área.

O treinamento também foi eficaz em determinar alterações plásticas em neurônios pré-motores simpáticos localizados no RVLM. Nos SHR o treinamento induziu aumento significativo e mantido da síntese de RNAm de BDNF, o qual foi acompanhado de aumento simultâneo e mantido de seu conteúdo protéico. Já nos WKY treinados o aumento da concentração protéica de BDNF não foi precedido de aumento significativo da síntese de seu RNAm. Também para esta área de controle

autônomo a plasticidade neuronal dependente de atividade nos SHR parece ser mantida por síntese continuada de RNAm de BDNF, mas por um menor “turnover” nos WKY. Nestes grupos, o conteúdo aumentado de BDNF determinou elevação de pequena magnitude, não mantida da síntese de RNAm do receptor de OT no RVLM. Infelizmente a falha na detecção do conteúdo protéico do receptor de OT nos impossibilitou a confirmação dos dados de RNAm no RVLM e NTS.

Em conjunto estas observações indicam que o treinamento induz a síntese de BDNF no PVN, NTS e RVLM, o qual medeia a plasticidade dependente de atividade em neurônios OTérgicos do PVN (aumento da densidade de neurônios OTérgicos, sugestivo de maior atividade) e em neurônios localizados no NTS e no RVLM, onde também medeia plasticidade dependente de atividade (aumento da síntese de receptores de OT, os quais ao serem inseridos na membrana celular, intensificariam a ação de OT liberada localmente pelas projeções descendentes do PVN a estas áreas).

Já havia sido demonstrado que o treinamento por 112 semanas causava aumento na expressão de RNAm de OT no PVN de normotensos e hipertensos (MICHELINI e STERN, 2009). Também Callahan et al. (1989,1982) que alterações na produção de OT no PVN promoviam alterações diretas em suas áreas de projeção no tronco cerebral. A novidade deste trabalho foi demonstrar que o aumento na expressão/conteúdo de OT no PVN e do receptor de OT em áreas de projeção são bastante precoces, aparecendo entre a primeira e segunda semanas de treinamento, precedendo portanto, o aparecimento dos efeitos benéficos do treinamento na instalação da bradicardia de repouso, que aparece a partir da segunda semana nos SHR_T e na oitava semana nos WKY_T.

Trabalhos anteriores também já haviam sugerido o envolvimento do sistema OTérgico central na modulação da FC durante modulação do reflexo barorreceptor e durante o exercício dinâmico (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001; HIGA et al., 2002). As observações do presente trabalho, quantificando as alterações sequenciais do conteúdo de OT (RNAm e proteína) e sua repercussão funcional sobre a FC basal, indicam a precocidade que ocorrem os ajustes do controle autônomo e sugerem uma relação causa-efeito entre alterações plásticas no sistema OTérgico central e a indução da bradicardia de repouso durante o desenvolvimento de um protocolo de treinamento aeróbio.

Os fatos de os efeitos do treinamento na indução da bradicardia de repouso manifestar-se precocemente nos SHR talvez esteja relacionado ao déficit do controle OTérgico em hipertensos (MARTINS et al., 2005). Realmente ratos SHR sedentários quando comparados aos WKY sedentários apresentam menor expressão de receptores de OT no complexo solitário-vagal (diferentes valores em S_0 na Figura 3A) além de apresentarem elevada FC basal e intensa depressão do controle reflexo da FC (CERONI et al., 2009). Nos SHR o pronto aumento no conteúdo de OT no PVN e de receptores de OT no NTS (que ocorrem em T_2) contribuiria com a redução significativa da FC basal também observada em T_2 . Nos WKY, que apresentam maior concentração de receptores no NTS/DMV, menor FC basal e elevada sensibilidade do controle reflexo da FC (CERONI et al., 2009) o aumento do conteúdo de OT no PVN e de receptores de OT no NTS (que também ocorrem em T_2 e se mantém até o final do treinamento) só manifestam o efeito de redução de FC mas tardiamente. Não obstante, como documentando neste trabalho, o treinamento aeróbio de baixa intensidade foi eficaz em reduzir a FC basal e aumentar a expressão do peptídeo na área biossintética e do receptor em áreas de projeção em ambos os grupos de animais, confirmando a potencialidade do treinamento em facilitar a expressão/funcionamento do sistema OTérgico central não só no animais controle, como também nos SHR, portadores de déficit autonômico/funcional.

Neste trabalho procuramos também investigar a alça PVN – RVLM, de grande importância no controle da atividade simpática. Uma observação interessante documentada pelos resultados do presente trabalho foi o elevado conteúdo de receptores de OT no RVLM de SHR sedentários (S_0 de SHR vs. WKY na Figura 9A) e a elevação na expressão de RNAm de BDNF e OTR no RVLM de SHR treinados. Ou seja, a hipertensão espontânea, caracterizada por déficit no controle OTérgico ao NTS/DMV (MARTINS et al., 2005) confirmada pelos presentes resultados (vide redução da expressão de RNAm do receptor de OT no DBS, Figura 8A), é acompanhada por elevada expressão de RNAm do receptor de OT no RVLM na situação basal, ou seja SHR_S vs. WKY_S . Em trabalho recente Chan et al. (2010) observaram que a administração central de angiotensina II causava aumento na síntese de BDNF no RVLM, de modo a remediar o aumento a produção de espécies reativas de oxigênio e alteração da regulação neural da PA promovidos pela angiotensina II. Mecanismos que determinam a plasticidade neuronal no RVLM na

hipertensão e treinamento aeróbio devem ser melhor investigados no futuro. O interesse de se investigar as alterações plásticas também no VBS é que, embora seja conhecida a projeção de neurônios pré-autonômicos do PVN ao RVLM, região em que se situam os neurônios pré-motores simpáticos (BIANCARDI et al., 2010), muito pouco se sabe sobre os efeitos cardiovasculares desencadeados pela ativação de receptores de OT nesta região como também são praticamente desconhecidos os efeitos do treinamento nesta via autonômica.

Sabe-se 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 ativação de receptores de OT no RVLM promove formação de inositol trifosfato com conseqüente liberação de Ca^{2+} no espaço intracelular, o que determina aumento na excitabilidade celular e despolarização (GIMPL e FAHRENHOLZ, 2001) aumentando o tônus simpático. Quanto aos efeitos do treinamento na plasticidade de neurônios do RVLM, observou-se apenas aumento no conteúdo protéico de BDNF, em WKY e SHR, indicativo de plasticidade neuronal, acompanhado de aumento transitório na síntese de RNAm de OT.

A expressão relativa de OT no PVN ao longo das 8 semanas de sedentarismo apresentou ligeiro aumento nos WKY, mas queda nos SHR, que no entanto não se traduziram em alterações significativas do conteúdo protéico. Estas alterações sugerem um comprometimento da eficiência da síntese de OT no PVN de SHR, o que pode vir a se agravar com o envelhecimento. Realmente estudo anterior com SHR pouco mais velhos mostrou redução da síntese de RNAm de OT no PVN (MARTINS et al., 2005). No mesmo sentido Keck et al. (2000) verificaram que a idade alterava o padrão de liberação de OT e VP hipotalâmico.

Um aspecto importante a ser considerado é como o exercício físico repetitivo causa alterações na expressão/funcionalidade de neurônios OTérgicos do hipotálamo. Li et al. (1997) já haviam sugerido que a contração muscular repetitiva é eficiente em estimular neurônios OTérgicos do PVN, o qual por sua vez controlava respostas cardiovasculares (PETERSON, 2002; COOTE, 2005). Estas informações

iniciais sugerem um efetivo sistema de controle. Brum et al. (2000) mostraram que o treinamento aeróbio de baixa intensidade aumentava a sensibilidade do nervo depressor aórtico em sinalizar ao NTS as alterações pressoras, sugerindo uma facilitação da atividade da alça bulbar de regulação da PA. Trabalhos de nosso laboratório também demonstraram que o treinamento aeróbio: 1) aumentava a sinalização aferente do NTS ao PVN (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007); 2) induzia importante plasticidade de neurônios pré-autônômicos do PVN, aumentando a arborização dendrítica e a área de superfície dos neurônios (MICHELINI e STERN, 2009); 3) aumentava a excitabilidade de neurônios OTérgicos e VPérgicos do PVN que se projetam ao NTS (JACKSON et al., 2005) facilitando suas ações nas áreas de projeção (MICHELINI, 2007). Estas observações mostram que o treinamento ativa a alça supra-bulbar de modulação e portanto os neurônios OTérgicos do PVN.

Experimento recente de nosso laboratório (CAVALLERI et al., 2011, in press) mostrando que a desnervação sino-aórtica reduz drasticamente a expressão gênica e protéica de OT no PVN ao mesmo tempo em que bloqueia a instalação da bradicardia de repouso, confirmando que a ativação dos barorreceptores e das alças bulbar e supra-bulbar de modulação são de fundamental importância para desencadear o mecanismo que determina alterações plásticas e funcionais nos neurônios OTérgicos do PVN e na expressão de receptores de OT em áreas de projeção.

Recentemente a microcirculação cerebral foi também identificada como fonte de fatores que podem influenciar a geração e sobrevivência neuronal e em especial a liberação de BDNF no tecido cerebral (KIM; HEMPSTEAD; MADRI, 2004). Experimentos *in vitro* demonstraram que a hipóxia, a qual deve ocorrer durante sessões de exercício, estimula o aumento da expressão e liberação de BDNF por células endoteliais de vasos cerebrais cuja produção e liberação é potencializada pela presença de espécies reativas de oxigênio oriundas do estresse oxidativo (WANG et al., 2006) bastante evidente nos SHR (PETERSON; SHARMA; DAVISSON, 2006; ZIMMERMAN e DAVISSON, 2004).

Outro aspecto a ser considerado é o intenso (cerca de 2 vezes ou mais) e precoce (entre T₁-T₂) aumento da expressão de BDNF observado no PVN e DBS dos WKY e no DBS e VBS dos SHR e que foi acompanhado de grande aumento da expressão de OT no PVN de ambos os grupos. É bastante provável que este

aumento inicial do BDNF seja determinado por reação de estresse ao exercício além do efeito do treinamento per se. A exposição dos animais a uma situação nova pode promover reação de estresse. Foi demonstrado anteriormente que a fase inicial do treinamento é acompanhada por liberação do hormônio liberador de corticotrofina do PVN (YANAGITA et al., 2007) e por aumento de corticosterona plasmática (REAL et al., 2010). Smith et al. (1995) e Givalois et al. (2004) já haviam sugerido que o estresse determinava aumento do BDNF no PVN, o qual atuava no sentido de ativar neurônios sintetizadores do hormônio liberador de corticotrofina e VP. O aumento simultâneo da síntese de OT teria também a função de contrabalançar a reação de estresse inicial (SZCZEPANSKA-SADOWSKA, 2008; UVNÄS-MOBERG, 1997; WSOL et al., 2008) uma vez que os efeitos da OT se fazem no sentido de favorecer a resposta bradicardizante seja durante elevações transitórias da PA (ROGERS e HERMANN, 1985; HIGA et al., 2002; MICHELINI, 2007), seja durante o exercício dinâmico (BRAGA et al., 2000; MICHELINI, 2001, 2007; HIGA-TANIGUCHI et al., 2009; MICHELINI e STERN, 2009).

Independente do grande aumento na ativação gênica nas semanas 1-2 que reflete a somatória de efeitos do treinamento e da reação inicial estresse, é importante ressaltar que o treinamento causa aumento mantido na expressão gênica/protéica de BDNF e OT no PVN e de BDNF e receptor de OT em áreas de projeção. Estas alterações plásticas no sistema OTérgico central, determinando aumento de sua densidade em normotensos e hipertensos treinados, aumentam o controle vagal do coração, determinando a instalação da bradicardia de repouso, a qual caracteriza o treinamento aeróbio.

6 Conclusão

Os dados do presente trabalho indicam que o treinamento aeróbio de baixa intensidade induz plasticidade neuronal em vias OTérgicas que se projetam do PVN ao NTS e RVLM. Há nos corpos celulares de neurônios OTérgicos de normotensos e hipertensos aumento intenso e precoce, mas mantido na síntese de OT no PVN, indicativo da maior atividade destes neurônios. Há ao mesmo tempo aumento da expressão de receptores de OT no NTS e RVLM (mais intenso no NTS) sugestivo de maior atividade destas vias autonômicas centradas nestas áreas. A correlação temporal entre a plasticidade de neurônios OTérgicos, precedendo e/ou aparecendo simultaneamente à instalação da bradicardia de repouso durante o treinamento, indica uma possível correlação causa efeito.

Além disto, o elevado “turnover” de BDNF e a intensa síntese de RNAm de receptor de OT nos SHR sugerem a importância de plasticidade induzida por treinamento em facilitar neste grupo a modulação OTérgica de hipertensos.

REFERÊNCIAS*

ADLARD, P. P.; PERREAU, V. M.; ENGESSER-CESAR, C.; COTMAN, C. W. The time course of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. **Neuroscience Letters**, v. 363, p. 43-48, 2004.

ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**, v. 39, p. 275-280, 2002.

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

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

BADOER E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardio vascular regulation. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 28, p. 95–99, 2001.

BARENGO, N. C. H. U. G.; KASTARINE, N. M.; LAKKA, T. A.; PEKKARINEN, H.; NISSINEN, A.; TUOMILEHTO, J. Low physical activity as a predictor for antihypertensive drug treatment in 25-64-years-old populations in Eastern and south-western Finland. **Journal of Hypertension**, v. 23, p. 293-299, 2005.

BEN-ARI, Y.; GAIARSA, G. L.; TYZIO, R.; KHAZIPOV, R. GABA: a Pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. **Physiology Review**, v. 87, p. 1215-1284, 2007.

BETLEY, J. N.; WRIGHT, C.; KAWAGUCHI, Y.; ERDELYI, F.; SZABO, G.; JESSELL, T. M.; KALTSCHMIDT, J. A. Stringent specificity in the construction of a GABAergic pre-synaptic inhibitory circuit. **National Institutes of Health Public Access**, v. 139, p. 161-174, 2009.

* De acordo com:

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

BIANCARDI, V. C.; CAMPOS, R. R.; STERN, J. E. Altered balance of γ -aminobutyric acidergic and glutamatergic afferent inputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of renovascular hypertensive rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 518, p. 567-585, 2010.

BLUM, R.; KONNERTH, A. Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. **Physiology**, v. 20, p. 70-78, 2004.

BOLTON, M. M.; PITTMAN, A. J.; LO, D. C. Brain-Derived Neurotrophic Factor Differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 3221-3232, 2000.

BRAGA, D. C.; MORI, E.; LIGA, K. T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Central Oxytocin Modulates exercise induced tachycardia. **Am. Jour. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 278, p. 1474-1482, 2000.

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P. Role of central catecholaminergic Systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p. 727-741, 1984.

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

CALLAHAN, M. F.; KIRBY, R. F.; CUNNINGHAM, J. T.; ESKRIDGE-SLOOP, S. L.; JOHNSON, A. K.; MCCARTY, R.; GRUBER, K. A. Central oxytocin systems may mediate a cardiovascular response to acute stress in rats. **American Journal of Physiology**, v. 256, n. 5, pt. 2, p. H1369-H1377, 1989.

CALLAHAN, M. F.; THORE, C. R.; SUNDBERG, D. K.; GRUBER, K. A.; O'STEEN, K.; MORRIS, M. Excitotoxin paraventricular nucleus lesions: stress and endocrine reactivity and oxytocin mRNA levels. **Brain Research**, v. 597, n. 1, p. 8-15, 1992.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent signaling drives oxytocinergic pre-autonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **American Journal of Physiology**, 2011. In Press.

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

CHAN, S. H.; WU, C. W. J.; CHANG, A. Y. W.; HSU, K. S.; CHAN, J. Y. H. Transcriptional Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rostral Ventrolateral Medulla by Angiotensin II: Significance in Superoxide Homeostasis and Neural Regulation of Arterial Pressure. **Circulation Research**, v. 107, p. 1127-1139, 2010.

CHO, H. J.; YOON, K. T.; KIM, H. S.; LEE, S. J.; KIM, J. K.; KIM, D. S.; LEE, W. J. Expression of brain-derived neurotrophic factor in catecholaminergic neurons of the rat lower brainstem after colchicine treatment or hemorrhage. **Neuroscience**, v. 92, p. 901-909, 1999.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

COOTE, J.H. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 2, p. 169-173, 2005.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neuroscience**, v. 25, p. 295-301, 2002.

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

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 27, p. R1271-R1282, 1997.

DUSSALT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of Messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, v. 8, p. 1-10, 2006.

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 780-785, 2007.

FIorentino, H.; KUCZEWSKI, N.; DIABIRA, D.; FERRAND, N.; PANGALOS, M. N.; PORCHER, C.; GAIARSA, J. L. GABA_B receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 11650-11661, 2009.

GAUTIER, J. F.; MAUVAIS-JARVOIS, F. Physical exercise and insulin sensitivity. **Diabetes & Metabolism**, v. 27, p. 255-260, 2001.

GILSBACH, R.; KOUTA, M.; BÖNISCH, H.; BRÜSS, M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. **Biotechniques**, v. 40, p. 173-177, 2006.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiology Review**, v. 81, p. 629–683, 2001.

GIVALOIS, L.; NAERT, G.; RAGE, F.; IXART, G.; ARANCIBIA, S.; TAPIA-ARANCIBIA, L. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 27, n. 3, p. 280-295, 2004.

HARTMANN, M.; HEAMANN, R.; LESSMANN, V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. **EMBO Journal**, v. 20, p. 5887-5897, 2001.

HIGA, K. T.; MORI, E.; VIANA, F. F.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary vagal complex. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. R537-R545, 2002.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; SILVA, F. C.; SILVA, H. H.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. 1717-1727, 2007.

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

JOSHI, S.; KAPUR, J. Slow intracellular accumulation of GABA_A receptor δ subunit is modulated by brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 164, p. 507-519, 2009.

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

KAWAMOTO, Y.; NAKAMURA, S.; NAKANO, S.; OKA, N.; AKIGUCHI, I.; KIMURA, J. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. **Neuroscience**, v. 74, p. 1209-1226, 1996.

KECK, M. E.; HATZINGER, M.; WOTJAK, C. T.; LANDGRAF, R.; HOLSBOER, F.; NEUMANN, I. D. Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 1487-1494, 2000.

KIM, H.; LI, Q.; HEMPSTEAD, B. L.; MADRI, J. A. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 33538–33546, 2004.

KOHARA, K.; KITAMURA, A.; MORISHIMA, M.; TSUMOTO, T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. **Science**, v. 291, p. 2919-2923, 2001.

KRIEGER, E. M.; DA SILVA, G. J.; NEGRÃO, C. E. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 338-347, 2001.

KUIPERS, S. D.; BRAMHMA, C. R. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: New insights and implications for therapy. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 9, p. 580-586, 2006.

LI, J.; HAND, G. A.; POTTS, J. T.; MITCHELL, J. H. Identification of hypothalamic vasopressin and oxytocin neurons activated during the exercise pressor reflex in cats. **Brain Research**, v. 752, n. 1-2, p. 45-51, 1997.

MACK, S.O.; KC, P.; WU, M.; COLEMAN, B. R.; TOLENTINO-SILVA, F. P.; HAXHIU, M. A. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 826-834, 2002.

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

MELDGAARD, M.; FENGER, C.; LAMBERTSEN, K. L.; PEDERSEN M. D.; LABEDY, R.; FINSEN, B. Validation of two reference genes for mRNA levels studies of murine disease models in neurobiology. **Journal of Neuroscience**, v. 156, p. 101-110, 2006.

MELO, R. M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L. C. Training-induced, Pressure-lowering effects in SHR. **Hypertension**, v. 42, p. 851-857, 2003.

MICHELINI, L. C. A New Modulator of Cardiovascular Control during Exercise. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 206-220, 2001.

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory controls: reflex mechanisms and changes during exercise. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 396-376, 2007.

MICHELINI, L. C. Endogenous vasopressin and the central control of heart rate during dynamic exercise. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1185-1195, 1998.

MICHELINI, L. C. Fisiologia Cardiovascular. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008. p.375-604.

MICHELINI, L. C. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreflex control of heart rate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1017-1032, 1994.

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

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. H. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius of conscious rats. **Hypertension**, v. 11, p. 1.75-1.79, 1988. Suppl I.

MICHELINI, L. C.; MORRIS, M. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 897, p. 198-211, 1999.

MITCHELL, J. H. Neural control of the circulation during exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 22, p. 141-154, 1990.

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

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 3rd ed. Orlando, Flórida: Academic Press, 1997.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUAHR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A. Exercise and Hypertension. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 35, p. 533-553, 2004.

PETERSON, J. R.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 8, p. 232-241, 2006.

PETERSSON, M. Cardiovascular effects of oxytocin. **Progress in Brain Research**, v. 139, p. 281-288, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 13, p. 62-66, 2003.

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

ROGERS, R. C., HERMANN, G. E. Dorsal medullary oxytocin, vasopressin, oxytocin antagonist, and TRH effects on gastric acid secretion and heart rate. **Peptides**, v. 6, p. 1143-1148, 1985.

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

SAWCHENKO, P.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the Paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 205, p. 260-272, 1982.

SCHEFE, J. H.; LEHMANN, K. E.; BUSCHMANN, I. R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, p. 901-910, 2006.

SMITH, M. A.; MAKINO, S.; KIM, S. Y.; KVETNANSKY, R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3743-3750, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 13, p. 256-312, 2006.

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

SOUZA, C. G.; MICHELINI, L. C.; FIOR-CHADI, D. R. Receptor changes in the nucleus tractus solitarius of the rat after exercise training. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, p. 1471-1476, 2001.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, p. 61-89, 2008.

TANAKA, T.; SAITO, H.; MATSUKI, N. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2959-2966, 1997.

TIPTON, C. M. Exercise training for treatment of hypertension: a review. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 9, p. 104, 1999.

TOKUYAMA, W.; HASHIMOTO, T.; LI, Y. X.; O KUNO, H.; MIYADHITA, Y. Quantification of neurotrophin-3 mRNA in the rat hippocampal subregions using the RT-PCR-based coamplification method. **Brain Research Protocols**, v. 4, p. 407-414, 1999.

UVNÄS-MOBERG, K. Oxytocin linked antistress effects--the relaxation and growth response. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, v. 640, p. 38-42, 1997.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 0034.1-0034.12, 2002.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in hypertension. **Journal of Hypertension Suppl.**, v. 14, p. s83-93, 1996.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v. 20, p. 2580-2590, 2004.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. **Neuroscience**, v. 122, p. 647-657, 2003.

VERAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K. C.; GAVA, N. S.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. H2627-2631, 1997.

WANG, H.; WARD, N.; BOSWELL, M.; KATZ, D. M. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1665-1670, 2006.

WANG, H.; ZHOU, X. F. Injection of brain-derived neurotrophic factor in the rostral ventrolateral medulla increases arterial blood pressure in anaesthetized rats. **Neuroscience**, v. 112, p. 967-975, 2002.

WARDLE, R. A.; POO, M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 8722-8732, 2003.

WSOL, A.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; KOWALEWSKI, S.; PUCHALSKA, L. Oxytocin in the cardiovascular responses to stress. **Jour. Physiol. and Pharmacol.**, v. 59, p. 123-127, 2008.

YAN, Q.; ROSENFELD, R. D.; MATHESON, C. R.; HAWKINS, N.; LOPEZ, O. T.; BENNET, L.; WELCHER, A. A. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in adult rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 378, p. 135-157, 1997.

YANAGITA, S.; AMEMIYA, S.; SUZUKI, S.; KITA, I. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. **Life Science**, v. 80, n. 4, p. 356-363, 2007.

ZIMMERMAN, M. C.; DAVISSON, R. L. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 84, p. 125-149, 2004.